



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia Química
Departamento de Processos Químicos

**DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSO PARA PRODUÇÃO DE
CAFEÍNA E TEOFILINA DEMETILASES POR *RHIZOPUS*
DELEMAR EM FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO
UTILIZANDO CASCA DE CAFÉ COMO SUBSTRATO**

Cristiane Vanessa Tagliari

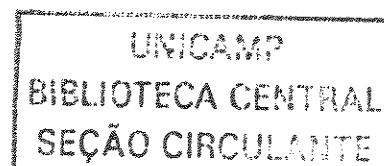
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Telma Teixeira Franco

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de
Engenharia Química como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de Doutor
em Engenharia Química.

Campinas-SP

Dezembro 2003



642501/2003

IDADE 9K
CHAMADA Unicamp
T128d
EX
MBO BC/ 51651
OC 16-117-04
D K
IEÇO 11,00
ATA 16/04/2004
CPD

CM00196714-0

Bib, id: 314775

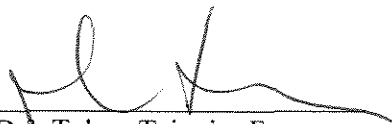
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

T128d Tagliari, Cristiane Vanessa
Desenvolvimento de bioprocesso para produção de
caféina e teofilina demetilases por *Rhizopus delemar* em
fermentação no estado sólido utilizando casca de café
como substrato / Cristiane Vanessa Tagliari. --Campinas,
SP: [s.n.], 2003.

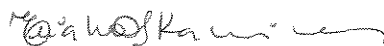
Orientadores: Telma Teixeira Franco e Carlos Ricardo
Soccol
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Caféina. 2. Fermentação. 3. Enzimas de fungos.
4. Biodegradação. I. Franco, Telma Teixeira. II. Soccol,
Carlos Ricardo. III. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Tese de Doutorado defendida por Cristiane Vanessa Tagliari e aprovada em 19 de dezembro de 2003 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



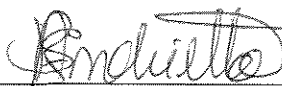
Prof.^a. Dr.^a. Telma Teixeira Franco
(Orientadora)



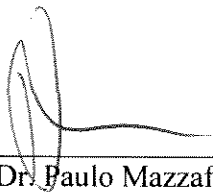
Prof.^a. Dr.^a. Eliana Setsuko Kamimura



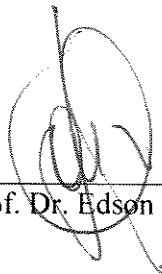
Dr.^a. Aline Carvalho da Costa



Prof. Dr. Silvio Roberto Andrietta



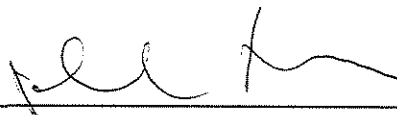
Prof. Dr. Paulo Mazzafera



Prof. Dr. Edson Tomaz

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado em Engenharia Química.

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized cursive letters, positioned above a horizontal line.

Orientador

DEDICATÓRIA

Ao meu marido Ubiratã e ao
meu filho Vinícius, pela
paciência, apoio e incentivo,
imprescindíveis para seguir
em frente.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pela bolsa concedida e pelo suporte financeiro ao projeto.

À Prof^ª. Dr^ª. Telma T. Franco pela orientação, compreensão e por suas sugestões e questionamentos, que me incentivaram a buscar cada vez mais conhecimentos, contribuindo assim para a minha formação acadêmica.

Ao Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol pela co-orientação e por suas pertinentes observações que, baseadas na sua experiência profissional, contribuíram muito para a conclusão do trabalho.

À Universidade Estadual de Campinas e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química; em especial, para todos os professores e funcionários, que são responsáveis pelo funcionamento do curso.

Aos professores Eliana Setsuko Kamimura, Aline Carvalho da Costa, Sílvia Andrietta e Paulo Mazzafera pela revisão e julgamento deste trabalho.

Ao colega Zoran e à amiga Mônica pelas sugestões na correção do trabalho.

Aos estagiários de iniciação científica pelo apoio prestado durante os trabalhos experimentais; em especial à Raquel K. Sanson pela dedicação e amizade.

A toda a minha família e a minha sogra pelo incentivo e apoio fundamental para que eu pudesse me dedicar ao trabalho.

Aos amigos Geraldo, Miriam e Mônica, um agradecimento especial, por me receberem em sua família durante os anos de mestrado e doutorado.

Enfim, seria difícil, em uma simples frase agradecer a todos os meus amigos e colegas dos Laboratórios de Engenharia Bioquímica da UNICAMP e de Processos Biotecnológicos da UFPR, que compartilharam comigo as alegrias e as tristezas e que contribuíram não com o trabalho somente, mas para o meu crescimento profissional e pessoal; a todos muito obrigado.

RESUMO

Avanços na biotecnologia, principalmente na área de tecnologia enzimática e de fermentações, oferecem oportunidades para a utilização econômica de resíduos agro-industriais. A casca obtida durante o processamento do café por via seca tem sido pouco empregada quando comparada com volume em que é gerada. Este resíduo poderia ser mais utilizado se compostos tóxicos como cafeína e taninos fossem removidos. Fungos filamentosos são capazes de assimilar cafeína e taninos de um meio sintético líquido ou de resíduos de café. Existem poucos trabalhos sobre a detoxificação da casca de café e esta nunca foi relatada com cepas de *Rhizopus delemar*. A via de degradação da cafeína por este microrganismo e as enzimas envolvidas neste processo também não estão descritas na literatura. O objetivo deste trabalho foi agregar valor a casca de café por fermentação no estado sólido com *R. delemar*, investigar a via de degradação da cafeína e caracterizar as enzimas envolvidas neste bioprocessamento. As condições de fermentação da casca de café por *R. delemar* foram otimizadas e os melhores níveis de detoxificação (86% de redução da cafeína e 60% de taninos) foram obtidos em frascos de Erlenmeyer com 75% de umidade inicial, 10^6 esporos/g substrato seco, pH 6,5 e 28°C. A cinética do processo fermentativo foi conduzida no biorreator de colunas com as condições otimizadas previamente e indicou que o desenvolvimento do fungo filamentoso e a sua respiração foram relacionados com a degradação de cafeína e de açúcares totais presentes na casca de café. A fase exponencial de crescimento microbiano foi encontrada entre 3 e 5 dias, quando foi detectado máximo consumo de O_2 e após a máxima produção das enzimas e degradação da cafeína. Valores máximos de atividade enzimática, 1,8 e 3,3 U/g s.s. para a cafeína e a teofilina demetilase respectivamente, foram obtidos após 2 dias de fermentação em frascos de Erlenmeyer. O extrato enzimático foi estável após estocagem a 2°C e o K_m estimado, a temperatura e o pH ótimos foram respectivamente 150 μ M, 30°C e pH 6,5 para a cafeína demetilase e 180 μ M, 30°C e pH 7,4 para a teofilina demetilase. Os resultados mostraram boas perspectivas para a utilização de *Rhizopus sp.* em processos de detoxificação da casca de café e novas oportunidades poderão surgir para a utilização deste bioproduto e para a aplicação do extrato enzimático obtido neste processo.

Palavras chave: Descafeinação, fermentação, cafeína, demetilases, biorreator, *Rhizopus*.

ABSTRACT

Advances in biotechnology, mainly in the area of enzymes and fermentation technology, offer potential opportunities for economic utilization of agro-industrial residues. The coffee husk obtained during dry processing of coffee has been poorly utilized when compared with the produced volume. Removing the toxic compound as caffeine and tannin, this residue could be more utilized. Filamentous fungi are able to assimilate caffeine and tannins from liquid synthetic media or coffee residue. There are few works about coffee husk detoxification and it was never described with strains of *Rhizopus delemar*. The caffeine degradation pathway and the enzymes involved in this process have not been described in the literature to. The aim of this work was to improve the nutritive value of coffee husk by solid-state fermentation with *R. delemar*, to investigate the caffeine degradation pathway and to characterize enzymes involved in this bioprocess. The conditions of coffee husk fermentation by *R. delemar* were optimized and the best detoxification levels (86% of caffeine and 60% of tannin reduction) were obtained in Erlenmeyer flasks with 75% initial moisture, 10^6 spores/g dry substrate, at pH 6.5 and 28°C. The kinetic of fermentative process was carried out in packed bed column bioreactor using the conditions previously optimized and showed that the development of filamentous fungi and its respiration was related with caffeine degradation and total sugars presents in coffee husk. The exponential phase of microbial growth was achieved between 3 and 5 days, when was detected maximal O₂ consumption and after the maximum production of enzymes and caffeine degradation. The maximum activities, 1.8 and 3.3 U/g d.s. for caffeine and theophylline demethylase respectively, were achieved at 2 days of fermentation in Erlenmeyer flasks. The enzymatic extracts were stable after storage at 2°C and the K_m estimated, the optimum temperature and pH were respectively 150µM, 30°C and pH 6.5 for caffeine demethylase and 180µM, 30°C and pH 7.4 for theophylline demethylase. The results showed good prospects of using *Rhizopus sp.* for the coffee husk detoxification and would open new opportunities for the utilization of this byproduct and for enzymatic extract application.

Keywords: Decaffeination, fermentation, caffeine, demethylases, bioreactor, *Rhizopus*.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
NOMENCLATURA	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2. 1. CAFÉ	3
2. 1. 1. <i>Importância Sócio-Econômica do Café no Brasil</i>	3
2. 1. 2. <i>Descrição Geral da Planta de Café</i>	4
2. 1. 3. <i>Processamento do Café</i>	5
2. 2. RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO DO CAFÉ.....	8
2. 2. 1. <i>Compostos Indesejáveis da Casca de Café</i>	9
2. 2. 1. 1. <i>Cafeína</i>	9
2. 2. 1. 2. <i>Taninos</i>	10
2. 3. FERMENTAÇÃO	12
2. 3. 1. <i>Fermentação Submersa</i>	12
2. 3. 2. <i>Fermentação no Estado Sólido</i>	13
2. 3. 2. 1. <i>Parâmetros de Controle da Fermentação no Estado Sólido</i>	14
2. 3. 2. 2. <i>Otimização das Condições de Cultivo</i>	19
2. 3. 2. 3. <i>Biorreatores usados em Fermentação no Estado Sólido</i>	21
2. 3. 2. 4. <i>Substrato</i>	22
2. 4. MICRORGANISMO	22
2. 4. 1. <i>Fungos</i>	23
2. 4. 1. 1. <i>Rhizopus sp</i>	24
2. 5. ENZIMAS	25
2. 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
3. CAFFEINE DEMETHYLASES.....	36
3.1 SOURCES AND PRODUCTION OF THE ENZYMES	37

3.1.1. Caffeine and related methylxanthines	37
3.1.2. Biosynthesis and catabolism of caffeine in plants	39
3.1.3. Caffeine degradation by mammalian enzymes	41
3.1.4. Caffeine degradation by bacterial enzymes	42
3.1.5. Caffeine degradation by fungal enzymes	45
3.2. CAFFEINE DEMETHYLASES ASSAY.....	47
3.3. CAFFEINE DEMETHYLASES PURIFICATION AND CHARACTERIZATION	48
3.4. CONCLUSIONS AND FUTURE PERSPECTIVES.....	51
3.5. REFERENCES	51
4. RESULTADOS: ARTIG O 1 - DEVELOPMENT OF A BIO PROCESS TO IMPROVE THE NUTRITIVE VALUE OF COFFEE HUSK: OPTIMIZATION OF SOLID-STATE FERMENTATION PARAMETERS	57
5. RESULTADOS: ARTIGO 2 - RELATION BETWEEN GROWTH KINETICS, ENZYMES PRODUCTION AND METHYLXANTHINES DEGRADATION BY <i>RHIZOPUS</i> SP. IN SOLID-STATE FERMENTATION	77
6. RESULTADOS: ARTIG O 3 - CHARACTERIZATION OF CAFFEINE AND THEOPHYLLINE DEMETHYLASES FROM FILAMENTOUS FUNGI.....	97
7. CONCLUSÕES	109
8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	110
ANEXOS	112

NOMENCLATURA

μ	Velocidade específica de crescimento
μL	microlitro
[S]	Concentração de substrato
ART	Açúcares Redutores Totais
BSA	Proteína (albumina bovina)
CD	Cafeína demetilase
CHE	Coffee husk extract
CHEA	Coffee husk extract agar medium
CO_2	Dióxido de carbono
FES	Fermentação no Estado Sólido
F_{in}	Fluxo de entrada
F_{out}	Fluxo de saída
g d. m.	gram of dry matter
g d. s.	gram of dry substrate
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
kDa	quilo Dalton
K_m	Constante cinética de Michaelis-Mentem
LPB	Laboratório de Processos Biotecnológicos
m	Coeficiente de manutenção
mM	milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
O_2	Oxigênio
OUR	Taxa de consumo de oxigênio
P	Produto
PDA	Photodiode array detector
Q	Specific rate
r_p	Taxa de formação de produto
RQ	Quociente respirométrico
r_s	Taxa de consumo de substrato

S	Substrato
SCP	Single Cell Protein
SSF	Solid-State Fermentation
TD	Teofilina demetilase
t_d	Tempo de duplicação
U	Unidade de atividade enzimática
UV	Detector ultravioleta
V	Velocidade da reação
v/v	Volume/volume
w/v	massa/volume
X	Biomassa
$Y_{p/x}$	Conversão biomassa em produto
Y_{x/o_2}	Rendimento de biomassa baseado no consumo de O_2
$Y_{x/s}$	Rendimento de biomassa baseado no consumo substrato

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos dez anos, a média da produção mundial de café foi de 97 milhões de sacas de 60 Kg por ano e o Brasil, maior produtor, foi responsável por 28% desta (IAPAR, 2003). Durante as etapas que envolvem a colheita e o processamento do café mais de 2 toneladas de resíduos são gerados anualmente no mundo (Machado, 2002).

Atualmente, existe uma crescente tendência em agregar valor ou utilizar os resíduos agrícolas de forma eficiente. Entre os processos já desenvolvidos que envolvem a utilização de resíduos agro-industriais como matéria prima de baixo custo está a produção de etanol, “single cell protein” (SCP), enzimas, aminoácidos, cogumelos comestíveis entre outros (Pandey *et al.*, 2001).

A técnica de fermentação no estado sólido (FES) tem-se demonstrado uma boa alternativa para o aproveitamento destes resíduos. O baixo custo, a redução dos problemas de contaminação e a não necessidade de um controle rigoroso dos parâmetros fermentativos são algumas das vantagens da sua utilização (Soccol & Vandenberghe, 2003).

Apesar da elevada quantidade de resíduos gerados durante o processamento do café, pouco tem sido usado para outras finalidades além do seu uso como adubo orgânico. Quanto à sua utilização na formulação de rações, a presença de cafeína e taninos diminui sua aceitação e palatabilidade (Mazzafera, 2002).

Com a remoção destes compostos indesejáveis ou com a degradação parcial a um nível aceitável novas possibilidades surgiriam para a sua utilização. Microrganismos capazes de metabolizar os compostos tóxicos dos resíduos de café utilizando estes como substrato em fermentação estão sendo pesquisados. A utilização de um microrganismo “GRAS” (Generally Recognized as Safe) favoreceria a aplicação deste fermentado como complemento de ração animal, em processos de ensilagem ou como substrato para formação de produtos de maior valor agregado.

Este trabalho objetivou agregar valor à casca de café degradando os compostos tóxicos por fermentação no estado sólido com *Rhizopus delemar*, estudar a via de

degradação da cafeína e caracterizar as enzimas envolvidas neste bioprocesso, visto que não há relatos na literatura sobre a via de degradação da cafeína por este fungo filamentoso.

A apresentação deste trabalho foi distribuída em cinco capítulos, sendo que os dois primeiros tratam da revisão bibliográfica e nos outros três os resultados estão apresentados na forma de artigos (que serão submetidos à publicação). O primeiro artigo trata da otimização das condições de fermentação da casca de café por *Rhizopus* sp. O segundo, envolve o estudo cinético do processo, abrangendo o monitoramento do crescimento microbiano através da respiração, o acompanhamento da degradação da cafeína e das metilxantinas e a cinética de produção das enzimas envolvidas nas primeiras etapas da via metabólica. No terceiro artigo as enzimas cafeína demetilase e teofilina demetilase são extraídas e caracterizadas. Os anexos apresentam resultados adicionais que não constam em nenhum dos artigos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. 1. Café

O Brasil é o maior produtor mundial com 28% da produção (Figura 1), seguido da Colômbia, Indonésia, México e Vietnã com 14, 7, 5 e 5% respectivamente; a África participa com 20%, sendo Costa do Marfim o principal país produtor e América Central com 14%. A produção mundial de café, em média, nos últimos 10 anos, foi de 97 milhões de sacas de 60Kg (IAPAR, 2003).

O Brasil e a Colômbia são os países com maior participação em exportação, correspondendo 23% e 14% respectivamente. Entre os países de maior consumo, está os EUA, em torno de 18 milhões de sacas por ano, seguido da Alemanha e Brasil, com 11,4 milhões de sacas consumidas (IAPAR, 2003).

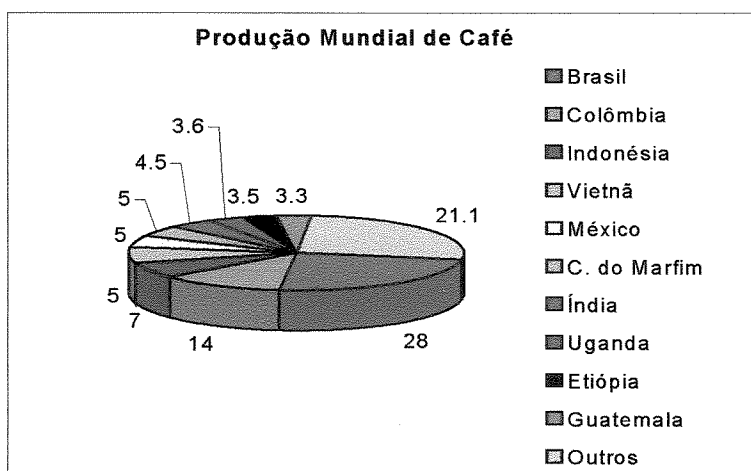


Figura 2.1. Maiores produtores mundiais de café (IAPAR, 2003).

2. 1. 1. Importância Sócio-Econômica do Café no Brasil

O café é uma importante fonte geradora de renda e empregos no País: na lavoura, na indústria e no comércio. A cadeia agroindustrial do café é composta por atividades

produtivas que envolvem o produtor de insumos, o produtor rural, a cooperativa, a indústria de torrefação e moagem, a indústria de café solúvel, os exportadores, atacadistas e varejistas.

No Brasil, existem aproximadamente 2,2 milhões hectares cultivados com cafezais, distribuídos principalmente nos estados de Minas Gerais (42%), Espírito Santo (23%), São Paulo (8%), Paraná (7%), e Bahia (7%), (Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 2003).

Outro setor de relevante importância sócio-econômica é o setor de industrialização, representado pelas indústrias de torrefação e moagem e pelas indústrias de café solúvel, com estimativa de consumo de 11 milhões e 2 milhões de sacas respectivamente, gerando aproximadamente US\$ 17 milhões em receita (ABIC, 2002 e Pagnoncelli, 2002).

2. 1. 2. Descrição Geral da Planta de Café

O cafeeiro pertence ao grupo das plantas Fanerógamas, classe *Angiosperma*, subclasse *Dicotiledônea*, ordem *Rubiales*, família das *Rubiáceas*, gênero *Coffea*. As espécies *Coffea arabica* (café arábica) e *Coffea canephora* (café robusta), são as únicas cultivadas em grande escala no mundo, representando, praticamente, 100% de todo o café comercializado. O cafeeiro se desenvolve melhor em clima quente e úmido, típico das regiões tropicais, é uma planta de porte arbustivo que pode alcançar naturalmente 12 metros, mas é mantido entre 2 e 3 metros para facilitar a colheita dos frutos.

Os frutos do café (Figura 2.2), também denominados de cerejas devido ao seu aspecto exterior, são agrupados nos ramos em globomérulos. A Figura 2.3 apresenta o corte longitudinal deste fruto com as diferentes camadas de tecidos. A casca de café é formada pelo epicarpo e pelo mesocarpo. O mesocarpo é recoberto pela epiderme, possui uma camada de 5mm de tecido esponjoso, rico em açúcares e pectinas, que engloba os grãos. Os grãos são revestidos por uma membrana dupla: a primeira denominada endocarpo (pergaminho) é de cor marrom claro e de consistência dura; a segunda é a espermodermis (película prateada), é aderente ao grão e bem mais fina que a anterior. Os grãos são

compostos de um endosperma, de um cotilédone e de um embrião situado na base do grão sobre a face interna (Perraud, 1996 & Brand, 1999).



Figura 2.2. Ramo de cafeeiro com frutos.

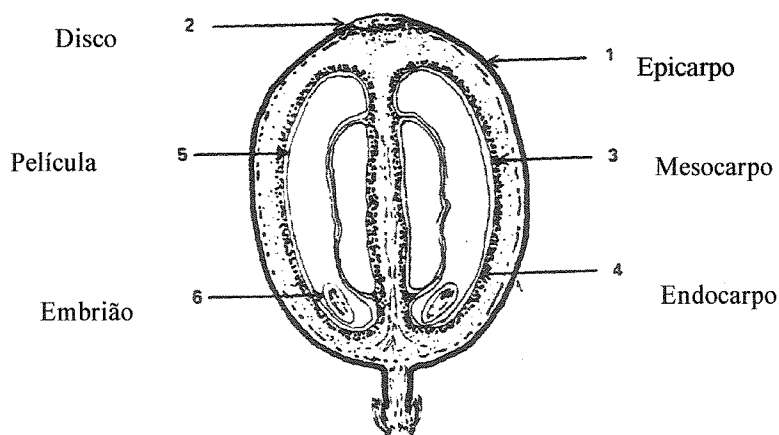


Figura 2.3. Corte longitudinal de um fruto de café (Bressani, 1978).

2. 1. 3. Processamento do Café

O método utilizado para processar o fruto de café não tem sofrido grandes modificações com o passar dos anos. O café é plantado a partir de mudas produzidas em

viveiros. O plantio é feito em espaços projetados para permitir um bom crescimento e o trabalho de manutenção das árvores, do solo e da colheita. No Brasil, a maior parte dos produtores faz a colheita retirando todos os frutos dos ramos ao mesmo tempo (conhecido como derriça). Nos países da América Latina e Central (Colômbia, Costa Rica, Jamaica) a colheita é feita fruto a fruto, escolhendo somente os que estiverem totalmente maduros (Pagnoncelli, 2002).

Os frutos colhidos são submetidos a várias operações para a retirada dos constituintes da parte externa do grão, existindo duas técnicas para a obtenção do grão descascado (Figura 2.4). Os cafés tratados por via úmida, também chamados de cafés lavados, são provenientes da América Central e Colômbia. O processamento por via úmida resulta numa bebida menos encorpada e mais ácida devido à fermentação resultante das trinta horas que os frutos permanecem nos tanques de lavagem. Neste método o café fica visualmente mais uniforme, pois a colheita é manual. A operação demanda água em abundância, gerando além dos resíduos sólidos, grande quantidade de efluentes líquidos com alta DBO (Machado, 2002).

No Brasil, o processo mais utilizado é o por via seca, responsável por 80% do processamento do café arábica e praticamente todo o café robusta. Este processo proporciona uma bebida mais encorpada e menos ácida, devido a maior concentração de açúcar na semente. A colheita é feita por derriça, o que causa um aspecto visual não uniforme (Perraud, 1996).

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 da terra, asfalto ou argila e são secos até que a umidade dos grãos fique em torno de 11%. Pelo processo de secagem artificial, os grãos são secos por convecção forçada até o mesmo teor de umidade (Masson *et al.*, 1984 e 1985).

Depois da secagem, o café passa para a etapa de limpeza (beneficiamento), 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, em descascadores de percussão ou fricção. Nestas máquinas o café é impulsionado violentamente pela rotação de um cilindro horizontal contra lâminas de aço. Dessa forma, os tecidos secos (epicarpo,

mesocarpo e endocarpo) que o envolviam são quebrados e, em consequência, são separados das sementes. A separação das cascas é feita por ventilação. O café descascado é selecionado, embalado e enviado para a indústria de torrefação e de fabricação de café solúvel (Machado, 2002).

Portanto, os principais resíduos gerados para a obtenção do café com qualidade comercial são a casca (resultante do processamento por via seca), a polpa (resultante do processamento por via úmida cuja composição é semelhante a da casca) e a mucilagem (resultante da etapa de fermentação do processo úmido).

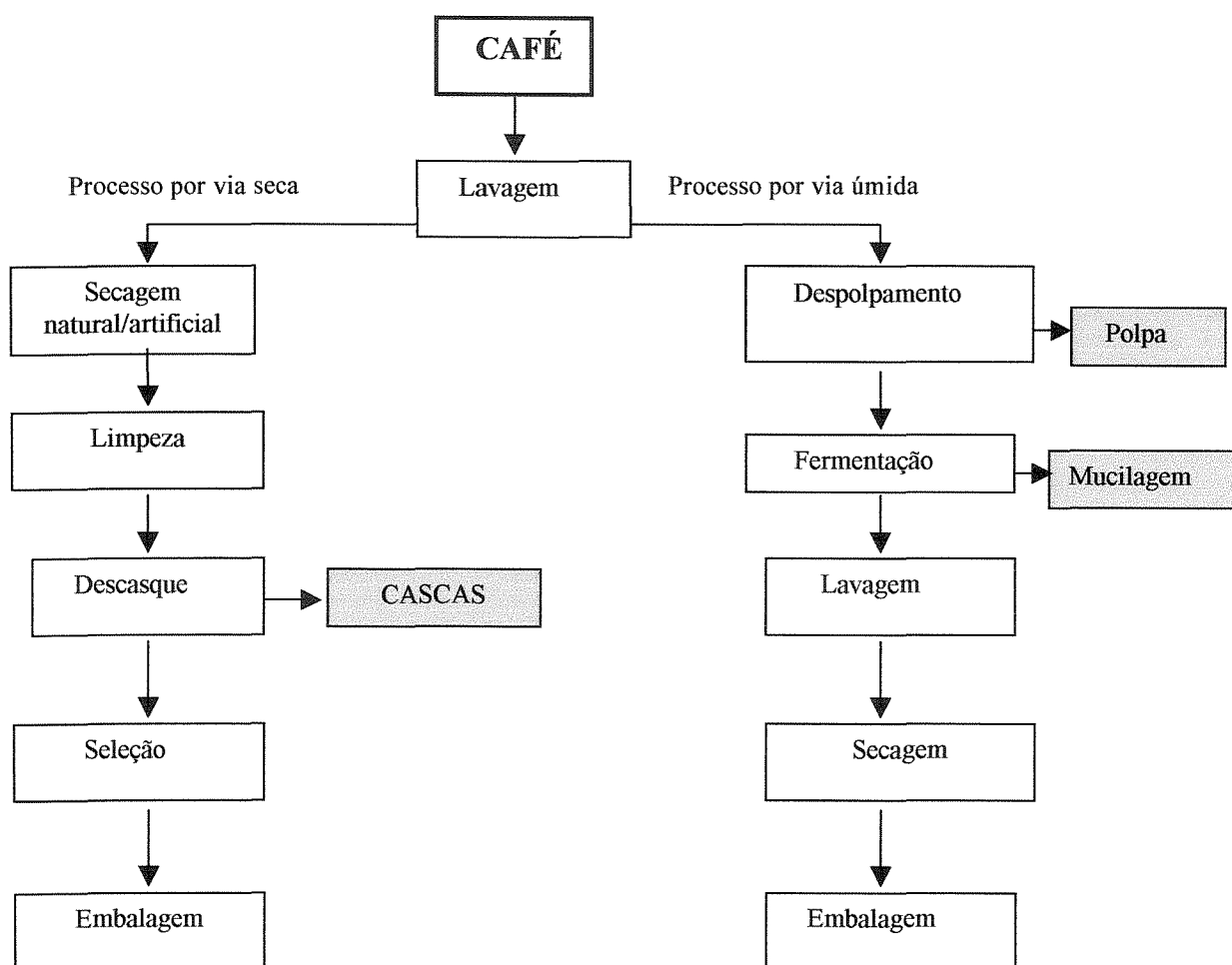


Figura 2.4. Fluxograma do processamento de café por via seca e por via úmida.

2. 2. Resíduos do Processamento do Café

O processamento do café por via seca gera aproximadamente de 40% de casca (Figura 2.5), chegando a uma produção anual superior a um milhão de toneladas no Brasil. Apenas uma pequena quantidade deste resíduo é aproveitada como adubo orgânico e o restante é empilhado nas fazendas de beneficiamento, causando um grande problema ambiental (Machado, 2002).



Figura 2.5. Casca de café.

Apesar da grande disponibilidade destes resíduos, existem poucos trabalhos na sua caracterização e possível aplicação. A utilização da casca e polpa do café como adubo orgânico, composto para silagem (Pagnoncelli, 2002) ou complemento de ração animal tem despertado interesse devido a sua composição, que é semelhante a do grão (Tab. 2.1 e 2.2).

Tabela 2.1. Composição do café e de seus subprodutos (em base seca).

Componentes (%)	Grão	Casca	Polpa
Proteína bruta	9,5 - 15,9	6,8	8,4 - 12,8
Extrato etéreo	5,0 - 13,0	1,5	2,2 - 2,9
Cinzas	10,0 - 20,0	6,3	5,0 - 9,4
Celulose + hemicelulose	2,5 - 4,5	31,86	20
Açúcares redutores		26,5	9,6 - 12,4
Taninos	2,0	9,3	1,8 - 8,56
Cafeína	1,8 - 2,6	1,2	0,7 - 1,3

Fonte: Elias, 1978 e Brand, 1999.

Tabela 2.2. Composição mineral da polpa de café.

Elemento	Conteúdo
Potássio (mg %)	1765
Cálcio (mg %)	554
Fósforo (mg %)	116
Sódio (mg %)	100
Ferro (mg %)	15
Boro (ppm)	26
Manganês (ppm)	6,25
Cobre (ppm)	5,0
Zinco (ppm)	4,0
Magnésio (ppm)	Traços

Fonte: Elias, 1978.

A presença de compostos antifisiológicos e antinutricionais como cafeína e polifenóis nos resíduos de café tem limitado suas aplicações. A casca e a polpa de café detoxificadas também podem ser utilizadas como substrato para produção de biomassa ou de biomoléculas de interesse comercial tais como ácidos orgânicos (Vanderberghe *et al.*, 1999), hormônio vegetal (Machado, 2001), enzimas (Pandey *et al.*, 2000) e compostos aromáticos (Medeiros *et al.*, 2000).

2. 2. 1. Compostos Indesejáveis da Casca de Café

2. 2. 1. 1. Cafeína

A cafeína é uma purina pertencente à família dos alcalóides. É encontrada em muitas espécies de vegetais, sendo as mais conhecidas o café (grãos e folhas), o chá (folhas), o cacau (grãos) e a erva-mate (folhas). Cafeína é o nome genérico da 1,3,7 trimetil-xantina, de fórmula molecular $C_8H_{10}N_4O_2$ e massa molar de 194,2 g/mol. É um alcalóide solúvel em água (1g dissolve em 46mL), em água a 80 °C (1:5,5), em água em ebulição (1:1,5), em álcool (1:66), em clorofórmio (1:5,5) e fracamente solúvel éter (Merck Index, 1989).

Quando ingerida, a cafeína atua como estimulante do sistema nervoso central (incluindo estimulação respiratória), é diurética, provoca a estimulação do músculo cardíaco e relaxamento do músculo liso (especialmente o músculo brônquico) (Clarke, 1986).

Envenenamento fatal no homem pela ingestão de cafeína é raro, contudo, a dose letal a curto prazo de cafeína em adultos pareça ser 5 a 10g (aproximadamente 100 xícaras de café), reações indesejáveis podem ser observadas após a ingestão de 1g (Goodman & Gilman, 1996).

Em estudos da utilização da polpa de café como parte da ração dada a diferentes tipos de animais foram observados vários efeitos, entre eles baixa taxa de ingestão, baixa digestibilidade e retenção de nitrogênio. O aumento de ácidos graxos em ovelhas pode ser atribuído à ação lipolítica da cafeína (Braham et al., 1973). O efeito diurético da cafeína contida na polpa pode explicar a perda de nitrogênio pela urina. O consumo de grandes quantidades de polpa de café por ruminantes provoca disfunções fisiológicas tais como queda de pêlos, problemas de pele e um aumento da secreção urinária (Brand, 1999).

A via de degradação da cafeína em humanos e animais é diferente da observada em microrganismos. As primeiras etapas de degradação da cafeína por microrganismos envolvem uma seqüência de reações de demetilação. O metabolismo da xantina segue a via clássica de degradação das purinas, levando à formação de uréia. A seqüência de demetilação diferencia a via bacteriana da fúngica, enquanto na primeira o primeiro produto de degradação é a teobromina, na segunda é a teofilina (Hakil, 1999). Mais detalhes da degradação da cafeína por via biológica estão apresentados no capítulo 3.

2. 2. 1. 2. Taninos

Os taninos são compostos fenólicos de elevada massa molar (500 a 3000) que podem se ligar a proteínas, celulose e pectina para formar compostos insolúveis, comprometendo a atividade biológica principalmente das proteínas. São solúveis em água e possuem grupos hidroxilas e carboxilas suficientes para formar fortes complexos com

proteínas e outras macromoléculas. Os taninos são subdivididos em taninos hidrolisáveis e taninos condensados (proantocianidinas) (Lekha & Lonsane, 1997).

A presença de elevados teores de taninos tem limitado o uso da polpa de café em alimentação animal (Clifford & Ramirez-Martinez, 1991).

A aplicação de compostos contendo taninos na nutrição animal é indesejável devido a sua habilidade de formar complexos com várias moléculas, incluindo carboidratos, proteínas, polissacarídeos e enzimas envolvidas na digestão de proteínas e carboidratos. Os taninos podem reduzir a ingestão de rações pela diminuição da palatabilidade devido a sua adstringência (Brand, 1999).

Também foi evidenciado que os compostos fenólicos diminuem consideravelmente a absorção de ferro e interferem na absorção da tiamina (Bressani, 1978).

A dosagem letal de ácido tânico via oral para ratos é de 6,0 g/kg (Merck Index, 1989).

O metabolismo de degradação de taninos se dá em uma única etapa com a formação de glicose e ácido gálico/m-digálico como pode ser observado na Figura 2.6. Essa reação é catalisada pela enzima tanino acetil-hidrolase (tanase) (Lekha & Lonsane, 1997).

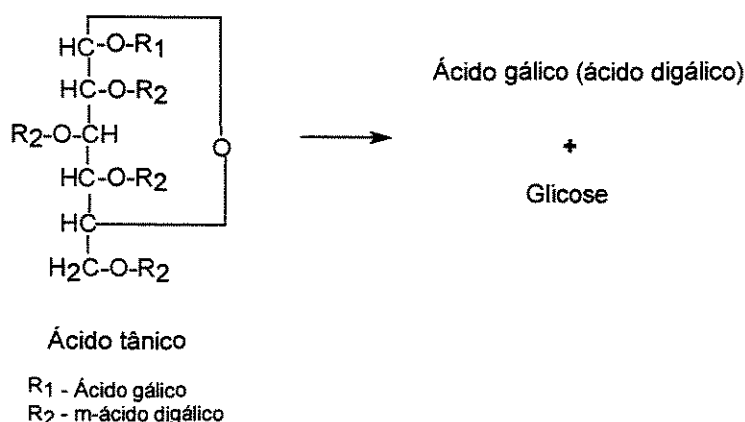


Figura 2.6: Metabolismo de degradação de taninos

Menezes et al. (1994) mostraram que uma cepa de *Lactobacillus plantarum* foi apta a degradar 90% dos taninos da polpa de café em 8 dias de incubação a 32°C. Menezes &

Romeiro (1996) aplicaram a polpa tratada na alimentação de ratos (20% da dieta), foi observado um aumento de peso comparando com o controle.

2. 3. Fermentação

A fermentação é um conjunto de reações biológicas de oxirredução produtoras de energia. Neste processo as alterações químicas produzidas no substrato orgânico são ocasionadas por enzimas elaboradas pelos microrganismos fermentadores (JAY, 1994).

Os processos fermentativos geralmente são desenvolvidos em três escalas, O primeiro estágio envolve o estudo em escala de laboratório que é iniciado pela seleção do microrganismo e conduzida por procedimentos microbiológicos relativamente simples, usando placas de Petri e Erlenmeyers. Selecionado o microrganismo, passa-se para a otimização do meio e das condições de cultivo. Esta etapa é seguida por uma investigação em planta piloto para determinar as condições de operação do biorreator com volume de até 200L. O estágio final é a transferência do estudo para a planta ou produção em escala industrial (Stanbury & Whitaker, 1984).

Em processos fermentativos, o crescimento do microrganismo no biorreator pode ocorrer de três maneiras, em batelada, batelada alimentada ou em processo contínuo. As reações no biorreator podem ser na presença ou ausência de oxigênio, em culturas estáticas ou agitadas e em meio líquido ou sólido. O microrganismo pode estar livre ou fixo por imobilização ou por aderência natural (Tagliari, 1999).

2. 3. 1. Fermentação Submersa

A fermentação submersa é aquela onde o substrato está dissolvido na fase líquida. Na fermentação submersa o meio de cultivo está qualitativa e quantitativamente mais equilibrado e homogêneo quando comparado com a fermentação no estado sólido. Por isso permite uma regulação mais uniforme do metabolismo microbiano, um melhor controle das

trocas gasosas e os metabólitos quando excretados no meio, são mais fáceis de serem removidos (Pagnoncelli, 2002).

2. 3. 2. Fermentação no Estado Sólido

Fermentação no Estado Sólido (FES) geralmente é definida como crescimento de microrganismos e formação de produtos em meio sólido ou semi-sólido praticamente na ausência de água livre. O meio neste caso é matéria orgânica, com a umidade ajustada à atividade de água apropriada ao microrganismo (Pandey & Soccol, 1998).

A história e desenvolvimento da (FES) têm sido revisada por vários autores (Aidoo *et al.*, 1982; Hesseltine, 1977). Numerosas fermentações alimentares e agrícolas baseadas neste princípio têm sido praticadas há séculos em todo mundo. Essa fermentação, ainda pouco estudada no Brasil, é muito desenvolvida nos países orientais, particularmente Japão, China e Coreia (Soccol, 1994). A Tabela 2.3 apresenta setores econômicos da agroindústria, agricultura e fermentação industrial que utilizam a FES em seus processos.

As vantagens e desvantagens da (FES) quando comparada com o processo submerso são de difícil generalização, porém, as vantagens citadas com maior frequência e que tentam justificar o interesse crescente pela (FES) são apresentadas por Lonsane *et al.* (1992); Cannel & Moo-Young (1980):

- menor espaço ocupado pela planta e fermentadores para uma produção,
- pequena quantidade de efluentes para tratamento,
- obtenção de produtos concentrados, ou seja, menor quantidade de solvente para extração,
- possibilidade de exclusão das etapas de concentração e/ou extração,
- redução dos problemas de contaminação,
- substrato simples e de baixo custo,
- a esterilização é muitas vezes desnecessária,
- ausência de espuma,
- eliminação da necessidade de rigoroso controle sobre diversos parâmetros durante a fermentação.

Por sua vez, as principais desvantagens da fermentação sólida em relação à submersa são a remoção de calor, a dificuldade de medição de parâmetros como pH, perda de umidade nas fermentações de longa duração e dificuldade na medição da biomassa devido à forte ligação do microrganismo com o substrato.

Tabela 2.3. Aplicações da FES em diferentes setores econômicos (Raimbault, 1997)

Setor Econômico	Aplicação	Exemplos
Indústria Alimentícia	Alimentos tradicionais	Koji, Tempeh, queijos fermentados
	Produção de cogumelos	<i>Agaricus, Pleurotus, Shiitake</i>
	Bioconversão de resíduos	Bagaço de cana, casca de café, compostagem, ensilagem
	Aditivos alimentares	aromas, gorduras essenciais, ácidos orgânicos
Agricultura	Biocontrole, bioinseticidas	<i>Beauveria, Metarrhizium, Trichoderma</i>
	Crescimento de plantas, hormônios	Giberelinas, <i>Rhizobium, Trichoderma</i>
Fermentação Industrial	Enzimas	amilases, celulases, proteases, pectinases, xilanases
	Antibióticos	penicilina, probióticos
	Ácidos orgânicos	ácidos cítrico, fumárico, gálico, láctico
	Etanol	
	Metabólitos fúngicos	Hormônios

2.3.2.1. Parâmetros de Controle da Fermentação no Estado Sólido

Fatores ambientais como temperatura, pH, atividade de água, níveis de oxigênio e concentrações de nutrientes e produtos afetam significativamente o crescimento microbiano e formação de produtos. Em culturas submersas o controle ambiental é relativamente simples pela homogeneidade da suspensão microbiana de células, da solução nutritiva e dos

produtos na fase líquida. O baixo teor de umidade na FES proporciona um menor volume de reator por massa de substrato que em fermentação submersa e, também, simplifica a recuperação do produto. Entretanto, alguns problemas são encontrados a respeito de mistura, troca de calor, transferência de oxigênio, controle de umidade, localização dos gradientes de pH e níveis de nutrientes e produtos, como consequência da heterogeneidade do meio. Assim, os microrganismos selecionados para FES devem ser mais tolerantes a variadas condições de cultivo (Raimbault, 1997).

A seguir será feita uma pequena explanação a respeito dos principais parâmetros de controle da FES.

a) Umidade e atividade de água (a_w)

Na FES a quantidade máxima de água presente no meio é função da capacidade de retenção do substrato. Um aumento do líquido no seio da matriz está diretamente relacionado com aumento do risco de contaminação bacteriana, menor porosidade, diminuição da difusão de oxigênio, redução do volume de gás e, conseqüentemente, menor troca gasosa que, porém, deverá estar presente em quantidade suficiente para não limitar o crescimento dos microrganismos (Cannel & Moo-Young, 1980).

A_w do substrato é definida como a umidade relativa da atmosfera gasosa em equilíbrio com o substrato, sendo expressa como:

$$a_w = - Vm\phi / 55,5$$

onde: V = número de íons formados

m = concentração molar do soluto

ϕ = coeficiente osmótico molar

55,5 = concentração molar de uma solução aquosa de água pura

Assim, a água pura possui uma $a_w = 1,00$ e a_w diminuirá com o aumento de solutos. Bactérias normalmente crescem em altas a_w , enquanto alguns fungos e leveduras podem crescer em valores menores (0,6 – 0,7). Os microrganismos capazes de manter seu metabolismo a baixas a_w são os melhores para processos de fermentação no estado sólido (Doelle, 1985).

b) pH

Os microrganismos reagem de maneira diferente ao pH do meio. Assim, pode-se dizer que bactérias, especialmente as patogênicas, geralmente preferem valores de pH próximos à neutralidade, enquanto fungos e leveduras crescem melhor em pH ácido. Porém, pH menor que 2,0 inibe o crescimento para a vasta maioria dos microrganismos (Doelle, 1985).

Apesar do pH ser um dos fatores críticos, o monitoramento e controle do pH durante a fermentação não é usualmente feito em FES. A capacidade de tamponamento eficiente de alguns substratos assim como o uso de solução salina inicial elimina a necessidade de controle de pH durante o processo fermentativo, pois permitem que, durante o crescimento, o pH não varie bruscamente (Soccol, 1994; Raimbault & Alazard, 1980).

c) Temperatura

Durante as fermentações líquidas em reatores de mistura, o calor produzido pelos microrganismos durante a respiração é instantaneamente dissipado. Na FES, a forte densidade do micélio, o baixo teor de água e a ausência de mistura podem conduzir a um acúmulo de calor. Tal acúmulo está diretamente relacionado ao tipo de microrganismo e à profundidade do substrato e é prejudicial ao desenvolvimento do mesmo. Dessa forma, diferentes métodos de controle, tais como circulação forçada de ar, manutenção do reator em ambiente com temperatura controlada, utilização de jaquetas com circulação de água ou imersão em banho termostático são utilizados para manter a temperatura entre 25-32 °C, que são os valores usuais para FES. De qualquer forma, até o presente momento, o acúmulo de calor constitui um inconveniente sério no caso de reatores sólidos de maior escala fazendo-se necessário um grande número de estudos de engenharia para resolução deste problema (Soccol, 1994).

d) Aeração e Trocas gasosas

A importância da aeração está em manter condições de aerobiose, facilitar a dessorção de CO₂, regular a temperatura e a umidade do substrato.

Em culturas aeróbicas submersas o fornecimento de oxigênio é muitas vezes o fator limitante do crescimento, devido à sua baixa solubilidade em água. Por outro lado, um processo no estado sólido proporciona um acesso livre do oxigênio atmosférico ao substrato. Assim, a aeração é mais simples que no processo submerso pela sua alta taxa de difusão no filme aquoso sobre a partícula sólida, além da grande superfície de contato entre a fase gasosa, sólida e micelial.

e) Estimativa da biomassa

A biomassa é um parâmetro fundamental para a caracterização do crescimento microbiano. A determinação direta da biomassa em FES é muito difícil devido a problemas de separação entre a biomassa microbiana e o substrato. Em processos envolvendo fungos este problema é mais acentuado, pois suas hifas penetram fornecendo forte ligação do micélio com o substrato. Existem duas categorias de medidas da biomassa em FES: estimativa direta ou indireta (quantificação de componentes da biomassa e a medida metabólica). A seguir serão explicados os fundamentos de ambos os métodos (Raimbault, 1997).

Estimativa direta: A recuperação completa da biomassa fúngica é possível apenas para cultivo em filtros de membranas, uma vez que a membrana previne a penetração das hifas no substrato. O micélio completo pode ser recuperado simplesmente soltando-o da membrana, e pesando-o diretamente ou depois de secagem. Este método, porém, não pode ser utilizado na maioria dos processos de FES, sendo usado apenas como calibração de outros processos indiretos de estimativa da biomassa. Observações por microscópio eletrônico também podem representar um bom modo de apreciar o crescimento do fungo em FES. De qualquer forma a medida direta exata da biomassa em FES é uma questão muito complicada, sendo que outras aproximações são mais usuais. Para tanto se pode considerar a equação estequiométrica global do crescimento microbiano:



Uma vez determinada a estequiometria da equação acima, pode-se, a partir da variação de um componente, determinar a evolução dos outros (Raimbault, 1997).

Componentes da biomassa: A biomassa também pode ser estimada pela medida de componentes específicos, uma vez que sua composição é constante e estável. Os principais componentes utilizados para tal prática são: ácidos nucleicos, proteína, glucosamina, ergosterol e medidas físicas (diferença de condutividade elétrica entre a biomassa e o substrato).

Medida Metabólica da Biomassa: A biomassa também pode ser medida pela produção de enzimas, metabólitos primários ou então pelo metabolismo de respiração celular.

O consumo de O_2 e conseqüentemente produção de CO_2 é o resultado da respiração, o processo metabólico pelo qual os microrganismos aeróbicos retiram a maior parte de sua energia de crescimento. Essas atividades metabólicas são, portanto, associadas ao crescimento e podem ser utilizadas para a biossíntese de biomassa. À medida que os compostos de carbono são metabolizados, eles são convertidos em biomassa e dióxido de carbono. A produção de CO_2 causa a diminuição do peso do substrato fermentado ao longo do crescimento, e a quantidade de perda de peso pode ser correlacionada com o crescimento que ocorreu. A estimativa do crescimento baseada na produção de CO_2 ou consumo de O_2 assume que o metabolismo destes dois componentes é completamente associado ao crescimento, o que significa que a quantidade de biomassa produzida por unidade de gás metabolizado é constante, o que nem sempre ocorre (Raimbault, 1997).

Medida do metabolismo dos gases é mais eficiente se for considerado um modelo de correlação. A aplicação destes modelos envolvendo predição do crescimento a partir de tomadas das taxas de O_2 e CO_2 requer o uso de técnicas numéricas para resolver equações diferenciais. Se há disponibilidade de equipamento de monitoramento estes modelos de correlação são uma ferramenta poderosa de estimativa de biomassa uma vez que medidas contínuas *on-line* podem ser feitas (Raimbault, 1997).

2. 3. 2. 2. Otimização das Condições de Cultivo

A otimização de uma fermentação envolve um grande número de fatores e o produto formado depende do material onde o microrganismo foi selecionado, do meio de cultivo utilizado e das condições de crescimento. Os microrganismos devem ser cultivados e motivados a formar o produto desejado em um biorreator contendo a composição do meio de cultivo ótima para o microrganismo e os parâmetros de crescimento como temperatura e aeração devem ser controlados.

Os planejamentos fatoriais foram introduzidos por G. E. P. Box na década de 1950. Sua aplicação vem crescendo exponencialmente desde a revolução da informática e a facilidade do uso de softwares para análises estatísticas (Barros *et al.*, 1996).

Atualmente, a necessidade de minimizar custos vem incentivando engenheiros de processos a analisar previamente as implantações de sistemas, com o objetivo de determinar faixas de operação que continuem garantindo um bom rendimento sem prejuízos na produtividade, situação esta imprescindível para a viabilidade de um processo. Em processos biotecnológicos geralmente é observada a influência de muitas variáveis, onde a importância de cada uma deve ser determinada. Portanto, o planejamento experimental é uma ferramenta de trabalho muito útil para melhor compreensão do sistema.

Esta metodologia estatística é útil para uma redução no número de experimentos práticos a serem realizados, minimizando tempo e custos operacionais, além de se obter uma análise mais racional dos resultados baseada nas probabilidades estatísticas. Contudo, toda interpretação dos resultados deve ser fundamentada no senso crítico de análise do processo também.

a) Triagem das Variáveis: A primeira etapa para a otimização de um processo é o *screening* das variáveis. O objetivo nesta etapa é a redução do problema, ou seja, investigar quais as variáveis que exercem influência de forma significativa no processo estudado. O Planejamento Fatorial de 2 níveis é normalmente utilizado para este primeiro estudo (Haaland, 1989; Barros *et al.*, 1996).

Em muitas situações o pesquisador não conhece todas as variáveis que afetam significativamente a resposta de um processo. Para não excluir, de forma arbitrária, fatores potencialmente importantes, é conveniente incluir no estudo, neste estágio, o maior número possível de variáveis. É possível fazer isso sem aumentar o número de ensaios, usando-se Planejamentos Fracionários ao invés de Fatoriais Completos (Box *et al.*, 1978).

Obter a informação desejada realizando um número de ensaios correspondentes a uma fração do mesmo é possível por dois motivos. Primeiro, o número de efeitos de interação de ordem alta aumenta dramaticamente com o número de fatores. Muitas vezes esses efeitos têm valores pequenos e são destituídos de qualquer importância prática. Como na analogia da expansão em série de uma função, os efeitos principais tendem a ser maiores que as interações de dois fatores, que por sua vez, são mais importantes que as interações de três fatores, e assim por diante. Essa tendência naturalmente se acentua para efeitos de ordem mais elevada. Como esses efeitos em geral não são significativos, não há necessidade de fazer todos os ensaios de um planejamento completo só para determiná-los. Em segundo lugar, quando o número de variáveis aumenta, crescem as chances de que uma ou mais variáveis não afetem significativamente a resposta, seja por meio de efeitos principais ou por meio de efeitos de interação (Barros *et al.*, 1996).

Portanto, para investigar 6 variáveis em dois níveis utilizando um planejamento fatorial completo seriam necessários 64 experimentos. Para investigar a mesma quantidade de variáveis utilizando um planejamento fracionário com resolução IV seriam necessários 16 experimentos.

Planejamento Fatorial Completo: $2^6 = 64$ experimentos

Planejamento Fracionário: $2^{6-2} = 2^4 = 16$ experimentos

b) Otimização: Quando o objetivo principal do pesquisador é otimizar o seu sistema, ou seja, maximizar ou minimizar algum tipo de resposta, torna-se necessária uma investigação mais detalhada do processo. Este estudo requer muita informação sobre cada variável, portanto somente os fatores com influência significativa devem ser incluídos.

A Metodologia de Superfícies de Resposta (ou RSM, de *Response Surface Methodology*) é uma técnica de otimização baseada no emprego de planejamentos fatoriais, introduzida por G. E. P. Box na década de 50, e que desde então tem sido usada com grande sucesso na modelagem de diversos processos industriais.

A Metodologia de Superfícies de Resposta é constituída de duas etapas distintas: modelagem e deslocamento. Essas etapas são repetidas tantas vezes quantas forem necessárias, com o objetivo de atingir uma região ótima (mínima ou máxima) da superfície investigada. A modelagem normalmente é feita ajustando-se modelos lineares ou quadráticos a resultados experimentais obtidos a partir de planejamentos fatoriais. O deslocamento se dá sempre ao longo do caminho de máxima inclinação de um determinado modelo, que é a trajetória na qual a resposta varia de forma mais pronunciada.

2. 3. 2. 3. Biorreatores usados em Fermentação no Estado Sólido

Em processo de fermentação, o biorreator é o ambiente para o crescimento e atividade dos microrganismos e suas reações metabólicas. Os fermentadores mais utilizados para o processo no estado sólido estão descritos a seguir.

a) Fermentador de Bandejas: Os fermentadores de bandeja são os mais simples e também os mais utilizados de todos os tipos e podem ser de madeira, metálicos ou plásticos. A matéria-prima é umedecida, esterilizada, resfriada, inoculada e distribuída em bandejas. Essas são arranjadas umas sobre as outras, de maneira que fique um espaço apropriado entre elas para a aeração. A fermentação ocorre em estufa, que é aquecida até o processo entrar na fase exotérmica, a partir do que o ar insuflado passa a manter a temperatura e a umidade nos níveis desejados. O processo requer grande área operacional, e sua operação quase impede uma automação (Cannel & Moo-Young, 1980; Pandey, 1991).

b) Fermentador de Coluna: Consiste em uma coluna plástica ou de vidro, colocada na vertical e com um leito fixo de substrato. Pode ser encamisada para controle de temperatura através de circulação de água. Alternativamente, o conjunto de colunas pode

ser mantido em uma atmosfera de temperatura controlada. Esse tipo de fermentador é o mais usado em estudos de laboratório e possui normalmente 7cm de diâmetro e 20cm de altura, com entrada para circulação de ar em seu topo ou base (Pandey, 1991).

c) Fermentador de Tambor Rotativo: Consiste em um reator horizontal, de forma cilíndrica, com dispositivo de rotação e com entrada e saída de ar. A entrada e a saída de ar devem ser acopladas às extremidades do tambor, preferencialmente no centro, ou estar em diversos pontos em todo o comprimento do mesmo. A mistura do substrato neste tipo de biorreator é normalmente dada pela rotação, e a intensidade desta depende do objetivo requerido e do microrganismo utilizado. Em alguns processos contínuos, grandes tambores inclinados e com rotação contínua são usados com excelentes efeitos (Pandey, 1991).

2.3.2.4. Substrato

Praticamente quaisquer produtos naturais ou de natureza orgânica, podem servir como substrato para processos fermentativos (Soccol, 1995).

A seleção adequada do substrato é de fundamental importância para o sucesso de qualquer tipo de fermentação. Para o caso do processo FES, os substratos sólidos são constituídos basicamente de polímeros orgânicos, que se caracterizam pela insolubilidade em água e pela capacidade de promover o crescimento microbiano, mesmo sem a adição de nutrientes suplementares. Os resíduos de origem agro-industrial são os substratos mais utilizados neste processo, tais como: casca ou polpa de café, farelo de cereais, palhas, bagaço de cana, cascas de frutas processadas, batata, farinha de cereais, mandioca, entre outros (Gutierrez-Rojas & Torres, 1992).

2.4. Microrganismo

As bactérias, os fungos e as leveduras têm notável poder de reprodução e por meio das diversas formas e agentes de contaminação, encontram-se amplamente distribuídos na

natureza. O desenvolvimento de um microrganismo depende diretamente de duas condições, que podem selecionar a flora microbiana que irá agir sobre o substrato. Esses dois fatores são a existência de nutrientes e a umidade conveniente. A umidade do material em decomposição é, contudo, fator determinante. Os fungos podem se desenvolver em ou sobre um material com teor de umidade bem inferior ao exigido pelas bactérias (Borzani *et al.*, 1975).

2. 4. 1. Fungos

Os fungos são microrganismos multicelulares, filamentosos, de aspecto algodinoso e se apresentam em várias cores. As células são eucarióticas e a reprodução é por meio de esporos, com poucas exceções (Pelczar *et al.*, 1981).

Os fungos filamentosos apresentam uma série de vantagens em relação às leveduras e as bactérias, uma vez que são mais resistentes a variações de pH, de temperatura e de agitação. Estes microrganismos apresentam ainda maior facilidade de recuperação (filtração ou peneiramento) (Araújo *et al.*, 1976).

De um modo geral, os substratos para o crescimento de fungos são similares aos das bactérias. O carbono, assim como o nitrogênio, são vitais para o crescimento de microrganismos em geral, pois são constituintes básicos da matéria celular dos seres vivos. O efeito da relação C/N é um fator fundamental a ser estudado com o objetivo de fornecer ao fungo as condições ótimas de crescimento. Para a produção da biomassa microbiana, relações C/N entre 4,7 e 42 foram estudadas por Soccol (1994); o objetivo do estudo era o enriquecimento protéico de bagaço de mandioca por fermentação em meio sólido, com *Rhizopus oryzae*. Neste estudo a maior produção de biomassa foi conseguida com relação C/N de 4,7; relações C/N maiores limitavam o crescimento do fungo, levando a valores menores de proteína no produto fermentado.

Além do carbono e do nitrogênio, os microrganismos exigem macronutrientes para o seu metabolismo, como fósforo, cálcio, ferro, magnésio, potássio e enxofre; além dos microelementos como manganês, zinco, cobre e cobalto.

As condições em que se processam as fermentações também devem ser monitoradas e controladas. Os fatores mais importantes são a temperatura, o pH, a aeração e a agitação contínua do meio reacional. A temperatura de cultivo para fungos está situada geralmente entre 25 a 30 °C, estando o pH compreendido entre 4,5 e 7,0 (Pelczar *et al.*, 1981).

2. 4. 1. 1. *Rhizopus sp*

Rhizopus são fungos pertencentes à classe *Phycomycetes*. Estes fungos filamentosos são comestíveis e há milhares de anos são utilizados na preparação de alimentos fermentados, sobretudo nos países orientais. Alguns autores têm demonstrado que estes fungos podem melhorar a digestibilidade de alguns alimentos através da desagregação de fibras e aumentar o valor protéico de alimentos através do crescimento micelial (Stern, 1997). Os fungos filamentosos do gênero *Rhizopus* apresentaram boa habilidade para crescer em substrato sólido (Soccol, 1995).

Este gênero é caracterizado por não ser septado, por possuir estolões e rizóides que se escurecem freqüentemente ao envelhecer. Possuem esporângios grandes e geralmente negros (Figura 2.7), seu micélio é abundante e pode tomar todo o recipiente que o contém, seus esporos são de natureza assexuada formados dentro dos esporângios.

Segundo Prescott & Dunn, (1962) o *Rhizopus* tem a seguinte classificação:

Phylum: *Eumycetes* (fungos verdadeiros)

Classe: *Phycomycetes*

Subclasse: *Zygomycetes*

Ordem: *Mucorales*

Família: *Mucoraceae*

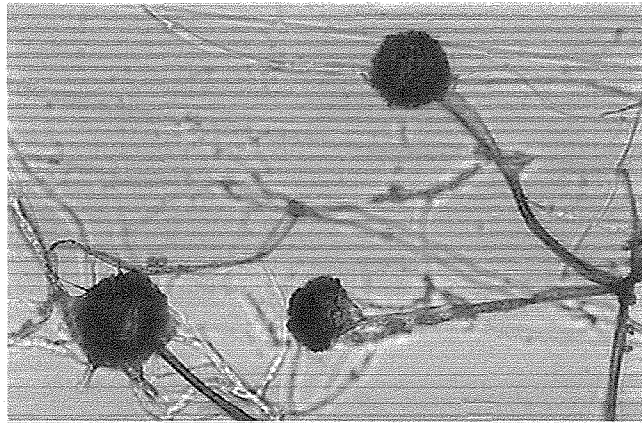


Figura 2.7: *Rhizopus delemar* (aumento de 400 vezes)

2. 5. Enzimas

As enzimas foram descobertas em 1897, mas somente em 1926 se conseguiu isolar em estado puro, a primeira enzima. Desde então, milhares de enzimas foram identificadas.

Praticamente todas as complexas reações bioquímicas que acontecem em animais, plantas e microorganismos são reguladas através de enzimas. Estas proteínas catalíticas são eficientes e específicas, ou seja, elas aceleram um tipo único de reação química e de substrato, de uma maneira mais eficiente que os catalisadores artificiais.

A classificação de enzimas consiste na sua organização dentro de grupos com atividades e características catalíticas similares. De acordo com a comissão de enzimas (E.C.), foi estabelecido que a classificação das enzimas seja baseada na sua ação catalítica, possuindo um código numérico, formado por um conjunto de 4 números separados por pontos. O critério mais importante de classificação foi estabelecido pela União Internacional de Bioquímica (IUB), e estabelece 6 classes (Bayley & Ollis, 1986):

1. Oxidorredutases São enzimas que catalisam reações de transferência de elétrons, ou seja: reações de oxi-redução. São as desidrogenases e as oxidases.

2. Transferases

Enzimas que catalisam reações de transferência de grupamentos funcionais como grupos amina, fosfato, acil, carboxil, etc.

3. Hidrolases

Catalisam reações de hidrólise de ligação covalente.

4. Liases

Catalisam a quebra de ligações covalentes e a remoção de moléculas de água, amônia e gás carbônico.

5. Isomerases

Catalisam reações de interconversão entre isômeros ópticos ou geométricos.

6. Ligases

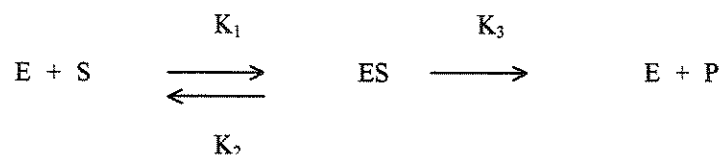
Catalisam reações de formação e novas moléculas a partir da ligação entre duas já existentes, quase sempre às custas da hidrólise de ATP.

Enzimas são catalisadores biológicos de alta especificidade. Elas são de natureza protéica e aumentam a velocidade de reações químicas específicas, por diminuição da energia de ativação requerida.

A atividade enzimática pode ser quantificada pelo substrato consumido ou pelo produto formado na reação, forma mais amplamente usada. A medida da atividade deve preferencialmente ser realizada usando métodos contínuos (monitorados instantaneamente), porém o método de interrupção da reação também pode ser usado. Este método consiste em incubar a enzima com o substrato por um período de tempo determinado e parar a reação pela ação do calor (ebulição) ou pela adição de um agente inativante (ácido perclórico ou tricloroacético). A desnaturação da enzima pode ocorrer ou não. É importante checar a

linearidade da taxa de reação do tempo zero até a faixa onde estão feitas as tomadas de medida (Scopes, 1987).

Em 1902, Henri e Brown admitiram a formação do complexo enzima-substrato (ES) que foi, posteriormente generalizada por Briggs e Haldane com a equação:



Em 1913, Michaelis e Mentem desenvolveram um modelo matemático simples de cinética envolvendo a catálise de um único substrato. Este modelo ficou conhecido como cinética de saturação ou cinética do estado estacionário, visto que uma das premissas adotadas para se chegar ao modelo é que em concentrações de substrato consideravelmente maiores que a concentração da enzima, toda enzima presente no meio estaria ligada ao substrato.

$$v = v_{\max} \frac{S}{k_m + S}$$

Esta é a equação de uma hipérbole, que pode ser vista na Fig. 2.8, onde V_m é o valor para o qual tende a velocidade da reação à proporção que $[S]$ aumenta.

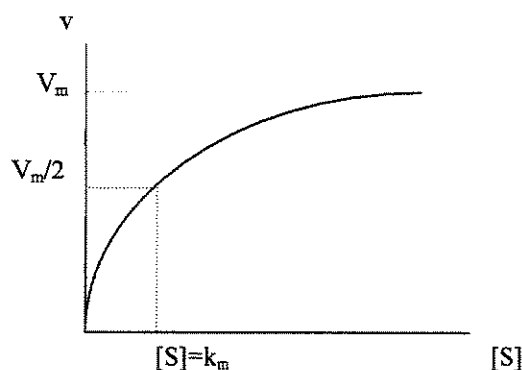


Figura 2.8: Perfil de velocidade para cinética enzimática de Michaelis-Menten

De acordo com a curva de Michaelis-Menten a cinética enzimática pode ocorrer de três formas diferentes. A primeira região (cinética de 1ª ordem) é aquela onde a concentração do substrato é muito baixa e a velocidade de reação aumenta à medida que mais substrato é adicionado. A segunda região é o período de transição, nesta fase as cinéticas de 1ª ordem e de ordem zero estão misturadas. Finalmente, a situação que é conhecida como cinética de ordem zero. Nesta região a concentração do substrato é de aproximadamente 10 vezes o valor de K_m e a velocidade da reação é constante e máxima.

O K_m é um parâmetro que indica a especificidade da enzima em relação ao substrato, e quanto menor for seu valor, maior a especificidade. Os parâmetros de reação podem ser determinados pela linearização da equação de Michaelis-Menten. Para as enzimas que seguem este modelo, o K_m corresponde à concentração de substrato na qual a velocidade da reação enzimática atinge a metade da velocidade máxima (V_{max}):

$$K_m = [S] \text{ quando } V = V_{max} / 2$$

As enzimas podem ser controladas por ativadores e inibidores que iniciam ou bloqueiam as reações enzimáticas.

Inibidores são substâncias que diminuem a velocidade de uma reação catalisada por enzima. A inibição pelo substrato pode ser caracterizada quando o excesso de substrato diminui a velocidade da reação enzimática. Pode-se detectar graficamente este tipo de inibição (Figura 2.9) quando ocorre uma ascendência na curva com sua aproximação ao eixo $1/v$ (Scopes, 1987). Valores de k_m e V_m podem ser obtidos pelo encontro do prolongamento da parte linear da curva com os eixos $1/v$ e $1/[S]$. Essa velocidade máxima representa uma V_m teórica, caso inibição pelo substrato não estivesse ocorrendo.

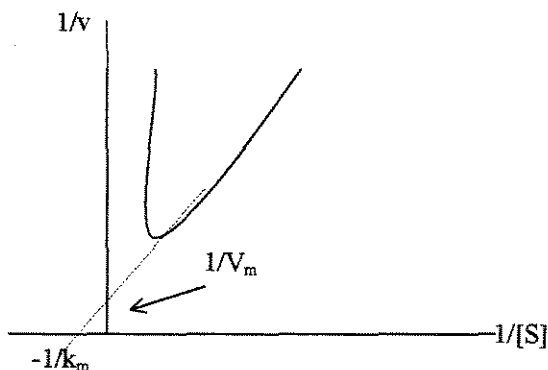


Figura 2.9: Inibição pelo substrato. A linha tracejada representa a reação não inibida.

Os principais fatores que afetam a atividade enzimática são: pH, força iônica, temperatura, concentração de substrato bem como de ativadores, inibidores e de sais (Chaplin & Bucke, 1990). Pesquisadores vêm buscando estabelecer as condições ótimas de aplicação das enzimas, objetivando que estas atuem com máxima atividade.

Atualmente poucas enzimas estão disponíveis no mercado e são usadas em processos industriais. As enzimas são aplicadas industrialmente para melhorar processos já existentes e possibilitar o uso de novas matérias-primas, através da modificação das características físico-químicas das mesmas. Para aplicação industrial as enzimas devem ser obtidas com alta produtividade e baixo custo, devem ser estáveis e ativas nas condições do processo e o produto obtido deve ser de melhor qualidade que o produto tradicional. Sendo assim estudos cinéticos, de caracterização e de estabilidade são de extrema importância para viabilizar a aplicação de enzimas.

2. 6. Referências Bibliográficas

1. ABIC. Café: Classificação e degustação. Disponível em: <http://www.café.com.br>. Acesso em 2002.
2. AIDOO, K.E., HENDRY, R., WOOD, B.J.B. Adv. Appl. Microbiol. v. 28, p.37-201, 1982.
3. ARAÚJO, N.Q. Produção de Biomassa Fúngica de Vinhoto. Brasil Açucareiro. Rio de Janeiro, 1976.
4. ASANO, Y., KOMEDA, T., AMADA, H. Microbial production of theobromine from caffeine. Biosci. Biotech. Biochem. v. 57, n.8, p.1286-1289, 1993.
5. BARROS NETO, B., BRUNS, R.E., SCARMINIO, I.S. Planejamento e Otimização de Experimentos. Editora da Unicamp, Campinas-SP, 1996.
6. BORZANI, W., AQUARONE, E., LIMA, E. A. Tópicos de Microbiologia Industrial. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda – USP, 1975.

7. BOX, G.E.P., HUNTER, W.G., HUNTER, J.S. Statistics for Experiments. An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building. Nova York, Wiley, 1978.
8. BRAHAM, J.E., JARQUIN, R., GONZALEZ, J.M., BRESSANI, R. Pulpa y pergamino de café, utilization de la pulpa de café en la alimentacion de ruminantes. Turrialba v.23, p.41-47, 1973.
9. BRAND, D. Detoxificação biológica da casca de café por fungos filamentosos em fermentação no estado sólido. UFPR, Curitiba, 102p.1999. Tese (Mestrado).
10. BRAND D., PANDEY A., ROUSSOS S., SOCCOL C. R. Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system. Enzyme and Microbial Technology v.27, p.127-133, 2000.
11. BRESSANI, R. Factores antifisiologicos en la pulpa de café. In: BRAHAM J. E., BRESSANI R. Pulpa de Café: composicion, tecnologia y utilizacion. *Guatemala*, INCAP, p.143-152, 1978.
12. CANNEL, E. & MOO-YOUNG, M. Solid State Fermentation Systems. Process Biochemistry v.15, p.24-28, 1980.
13. CHAPLIN M.F. & BUCKE C. Enzyme Technology. Cambridge University Press, 264p. 1990.
14. CLARKE, E.G.C. Clarke's isolation and identification of drugs: in pharmaceuticals, body fluids, and post-mortem material. Ed. London : Pharmaceutical, 1986.
15. CLIFFORD, M.N. & RAMIREZ-MENEZES, J.R. Tannins in wet-processed coffee beans and coffee pulp. Food Chemistry, v. 40, p. 35-42, 1991.
16. DOELLE, H. W. Biotechnology of solid substrate fermentation in the production of food. ASEAN Food Journal: v.1, n.1, p.10-14, 1985.
17. ELIAS, L.G. Composición química de la pulpa de café y otros subproductos. In: BRAHAM, J. E., BRESSANI, R. Pulpa de Café: composición, tecnologia y utilización. Guatemala: INCAP, p.19-27, 1978.

18. GOODMAN, L.S. & GILMAN, A. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. Ed. New York: McGraw-Hill, 1996.
19. GUTIERREZ-ROJAS, M., HUERTA-OCHOA, S., ULIBARRI, R.L., CASTANEDA, G.S., TORREZ, E.F., GONZALEZ, G. V. Solid State Fermentation in Bioconversion of Agro-Industrial Raw Materials. França: 1^{re} Imprimiere ARTI à Nimes, p.143, 1992.
20. HAALAND, P.D. Experimental Design in Biotechnology. New York: Ed. Marcel Dekker, 1989.
21. HAKIL, M. Dégradation de la Caféine par les Champignons Filamenteux, Purification et Caracterization d'une Théophylline Démethylase d'*Aspergillus tamarii*. Université de Franche-Comté, 1999. Tese (doutorado).
22. HESSELTINE, C.W. Process Biochem. v.12, p.2-30, 1977.
23. IAPAR. Café no mundo: produção e consumo. Disponível em <http://www.celepar.br/iapar/cafe.html> acesso em 2003.
24. JAY, J. M. Microbiologia moderna de los alimentos. Zaragoza: Acribia, 1994.
25. LEKHA, P.K. & LONSANE, B.K. Advances in Applied Microbiology. v.44, p.215-260, 1997.
26. LONSANE, P.K. & GHILDYAL, N. P. In: DOELLE, H. W., MICHELL, D. A. and ROLZ, C.E. Solid State Cultivation: p.191-209, London, 1992.
27. MACHADO, C.M.M. Produção de ácido giberélico por fermentação no estado sólido em casca de café. UFPR, Curitiba, 2002. Tese (Doutorado).
28. MACHADO, C.M.M., OLIVEIRA, B.H., PANDEY, A. SOCCOL, C.R. Coffe husk as substrate for the production of gibberellic acid by fermentation. In: SERA, T., SOCCOL, C.R., PANDEY, A, ROUSSOS, S. Book on Coffee Biotechnology and Quality, Kluwer Academic Publishers, 2001.
29. MASSON, M.L, SOCCOL, C.R., VASSÃO, E., VENTURA, I., PINHEIRO, L.I., SHULTZ, J.G., MATOS, M.E., FONTOURA, P.S.G. Tecnologia do café (Parte II). Bol. CEPPA, v.3, n.1, p.13-20, 1984.

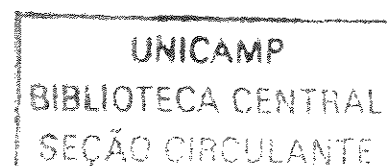
30. MASSON, M.L, SOCCOL, C.R., VASSÃO, E., VENTURA, I., PINHEIRO, L.I., SHULTZ, J.G., MATOS, M.E., FONTOURA, P.S.G. Tecnologia do café (Parte III). Bol. CEPPA, v.3, n.2, p.1-20, 1985.
31. MAZZAFERA P, Degradation of caffeine by microorganisms and potential use of decaffeinated coffee husk and pulp in animal feeding, Scientia Agricola, v.59, n.4, p.815-821, 2002.
32. MEDEIROS, A.B.P., PANDEY, A., FREITAS, R.J.S., CHRISTEN, P.; SOCCOL, C.R. Biochem. Eng. J. v.6, n.1, p.33-39, 2000.
33. MENEZES, H. C., SAMANN, F. S., CLIFFORD, M. N., ADAMS, M. R., (1994). The fermentation of fresh coffee pulp for use in animal feed. Proceedings of Colloque International sur la Chimie du Cafe e du Cacao, Montpellier, 1993, p. 52-61.
34. MENEZES, H.C., ROMEIRO, L.R. The incorporation of coffee pulp in animal feed. Campinas, UNICAMP, Faculdade de Engenharia de alimentos, 1996, 6p.
35. MERCK INDEX: An encyclopedia of chemicals, drugs, and biological. Ed. Whitehouse Station, 9^a ed., 1989.
36. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. Secretaria de produção e comercialização. <http://www.agricultura.gov.br/spc/cafe.htm>. Acesso em 2003.
37. PAGNONCELLI, M.G.B. Estudo da biodiversidade de bactérias lácticas isoladas de frutos do café no estado do Paraná: isolamento, identificação e avaliação de seu potencial nos processos de ensilagem da casca de café. UFPR, Curitiba, 2002. Tese (Mestrado).
38. PANDEY, A. Aspects os Fermenter Design for Solid State Fermentations. Process Biochemistry v.26, p.335-361, 1991.
39. PANDEY, A. & SOCCOL, C. R. Review: Bioconversion of Biomass: A Case Study of Ligno-cellulosics Bioconversions in Solid State Fermentations. Brazilian Archives of Biology and Technology v.41, n.4, p.379-390, 1998.

40. PANDEY A., SOCCOL C.R., NIGAM P., BRAND D., MOHAN R., ROUSSOS S.
Review: Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocess.
Biochemical Engineering Journal v.6, p.153-162, 2000.
41. PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUES-LEON, J.; NIGAM, P. Solid State
Fermentation in Biotechnology. Fundamentals and Applications. New Delhi, 221p.,
2001.
42. PELCZAR, M., REID, R., CHAN, E.C.S. Microbiologia. Traduzido do original
Microbiology, por M.A.M. Pereira. São Paulo: McGraw-Hill do brasil, v.1, 577p.,
1981.
43. PERRAUD, I. G. Cultures mixtes en milieu solide de bacteries lactiques et de
champignonsfilamenteux pour la comnservation et la decafeination de la pulpe de
café. Universidade de Montpellier II, Montpellier, 1996. Tese (Doutorado)
44. PRESCOTT, S.C. & DUNN, C.G. Microbiologia Industrial. Valencia: Anguilar, 965p.
1962.
45. RAIMBAULT, M. General and microbiologycal aspects of solid-substrate
fermentation. INTERNATIONAL TRAINING COURSE IN SOLID STATE
FERMENTATION. October 6-10, Curitiba, 1997.
46. RAIMBAULT, M. & ALLAZARD, D. Culture method to study fungal growth in
solid-state fermentation. European Journal of Applied Microbiology and
Biotechnology, v.9, p.199-209, 1980.
47. SCOPES, R.K. Protein Purification. Springer-Verlag New York, 283p. 1987.
48. SERA, T., SOCCOL, C.R., PANDEY, A, ROUSSOS, S., 2001, Book on Coffee
Biotechnology and Quality, Kluwer Academic Publishers.
49. SOCCOL, C.R. Contribuição ao estudo da fermentação no estado sólido em relação
com a produção de ácido fumárico. Biotransformação de resíduo sólido de
mandioca por *Rhizopus* e Basidiomacromicetos do gênero *Pleurotus*. UFPR,
Curitiba, 228p, 1994. Tese (Professor Titular).

50. SOCCOL, C. R. Aplicações da fermentação no estado sólido na valorização de resíduos agroindustriais. *Flash Agricultura*, França, v.4, n.2, p.3-4, 1995.
51. SOCCOL, C.R.; VANDERBERGHE, L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal*. v.13, p.205-218, 2003.
52. STANBURY, P.F. & WHITAKER, A. *Principles of Fermentation Technology*. Oxford, Pergamon, 255p.,1984.
53. STERTZ, S.C. Bioconversão da farinha de mandioca crua (*Manihot esculenta* Crantz) por fungo do gênero *Rhizopus* em fermentação no estado sólido. Setor de Tecnologia. Universidade Federal do Paraná. 108p. Curitiba, 1997. Tese (Mestrado).
54. TAGLIARI, C.V. Produção de Xilanases alcalinas por *Bacillus pumilus* e sua aplicação no branqueamento de polpas Kraft. UNICAMP, Campinas, 71p.1999. Tese (Mestrado).
55. VANDERBERGHE, L.P.S., PANDEY, A., LEBEAULT, J.M. and SOCCOL, C.R. Citric Acid Production by *Aspergillus niger* in Solid State Fermentation on coffee husk. III INTERNATIONAL SEMINAR ON BIOTECHNOLOGY IN THE COFFEE AGROINDUSTRY. p.53. Curitiba, 1999.

3. REVIEW: CAFFEINE DEMETHYLASES

Capítulo do livro: ENZYME TECHNOLOGY, Ashok Pandey, Colin Webb, Carlos
Ricardo Soccol, Christian Larroche, Asiatech Publishers, Inc., New Delhi.



CAFFEINE DEMETHYLASES

C. V. Tagliari-Corrêa^a, T. T. Franco^a, C. Augur^c, S. Roussos^c, A. Pandey^d, C. R. Soccol^b

^aLaboratório de Engenharia Bioquímica, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13081-970 Campinas, Brazil

^bLaboratório de Processos Biotecnológicos, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná (UFPR), 81531-970, Curitiba-PR, Brazil

^cLaboratoire de Microbiologie IRD, IFR-BAIM; Universités de Provence, Case 925, ESIL, 163 Avenue de Luminy, 13288 Marseille, France

^dBiotechnology Division, Regional Research Laboratory, Trivandrum 695019, India

Caffeine demethylases are enzymes that degrade caffeine and their metabolites. The clinical interest of these enzymes is due to the large number of drug interactions. Theobromine and theophylline, products of caffeine demethylation, are very useful products in the pharmaceutical industry.

The biological degradation of caffeine has been reported in fungi (Brand *et al.* 2001, Tagliari *et al.* 2002), yeast (Sauer *et al.* 1982) and bacteria (Woolfolk 1975, YamaokaYano & Mazzafera 1998).

Microbial or enzymatic caffeine degradation offers biotechnological alternative to organic solvent extraction used in decaffeination of beverage and vegetable materials. The microbial process of decaffeination has already been patented; Pat. No. CH626781-A with *Acinetobacter* and U.S. Pat. No. 4,228,191 with *Pseudomonas*.

In the present chapter a brief historical presentation of the enzymes production, identifying main researchers, describing biochemical characteristics, purification and perspectives of these demethylases, will be considered.

1. Sources and Production of the Enzymes

In humans and animals, the demethylation process is carried out by cytochrome P450 (James 1991, Mazzafera 2002). A short period after caffeine ingestion, the methylxanthines can be detected in urine (Berthou *et al.* 1992). Environmental factors including smoking, charbroiled meat, cruciferous vegetables and a number of drugs such as phenytoin, phenobarbital, and omeprazole increase cytochrome activity (Pharmacother 1995).

A human metabolism differs from observations made for bacterial and filamentous fungi (Asano *et al.* 1993, Hakil *et al.* 1998). Data obtained by Schwimmer *et al.* (1971) that studied the caffeine degradation in fungi, and Blecher & Lingens (1977), who studied caffeine degradation in bacteria, do not indicate participation of P450 in caffeine degradation mechanism. However, Sauer (1982) obtained indications of caffeine being degraded by cytochrome P450 in yeast, suggesting that the catabolic pathway might be similar to animals.

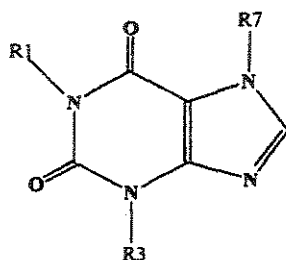
Differences in metabolic pathways of caffeine suggest that different enzymes might be involved in plant, fungal, bacterial and mammalian metabolism of this alkaloid. In the following sections caffeine degradation and enzymes production by different metabolism will be discussed.

1.1. Caffeine and related methylxanthines

The purine caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) is alkaloid found in more than 60 plant species (Fig.1). Caffeine is present in significant levels in coffee (*Coffea*), tea (*Camellia*), cocoa (*Theobroma*) and Cola genera (Suzuki *et al.* 1992, Hakil 1999) and as a component in several cola drinks. The popularity of coffee beverages is based on the stimulant effect of caffeine.

The pharmacological effects of caffeine as stimulation of central nervous system, toxicity when fed excessively and mutagenicity on microorganisms have been thoroughly studied (Denis *et al.* 1998). Due to its pharmacological effects, caffeine has long been

added to medical formulations to compensate the depressive effects of other drugs (James 1991, Mazzafera 1991). Since the first evidence of caffeine's action on the central nervous system, an increasing number of studies were carried out relating caffeine with several physiological effects (Timson 1975, James 1991, Mazzafera 2002).



Purine	R ₁	R ₃	R ₇
1,3,7-Trimethylxanthine (Caffeine)	CH ₃	CH ₃	CH ₃
1,3-Dimethylxanthine (Theophylline)	CH ₃	CH ₃	H
1,7-Dimethylxanthine (Paraxanthine)	CH ₃	H	CH ₃
3,7-Dimethylxanthine (Theobromine)	H	CH ₃	CH ₃
1-Methylxanthine	CH ₃	H	H
3-Methylxanthine	H	CH ₃	H
7-Methylxanthine	H	H	CH ₃
Xanthine	H	H	H

Figure 1. Chemical structure of the xanthine derivative group

Other two important alkaloids of the xanthine derivative group are theobromine and theophylline (Table 1).

Table 1. Methylxanthines characteristics (Merck Index 1989, Hakil 1999).

Description	Caffeine	Theophylline	Theobromine
Official nomenclature	3,7-dihydro-1,3,7-trimethyl-1H-purine-2,6-dione	3,7-dihydro-1,3-dimethyl-1H-purine-2,6-dione	3,7-dihydro-3,7-dimethyl-1H-purine-2,6-dione
Origin	Coffee, tea, cola	Tea	Cocoa, cola, tea
Molecular form	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂
Molar mass	194.19g/mol	180.17g/mol	180.17g/mol
Solubility in water			
to 25 °C	1g: 46mL	1g: 120mL	1g: 2000mL
to 100 °C	1g: 1.5mL		1g: 150mL
Fusion point	238 °C	270-274 °C	357 °C

Although structurally very similar to caffeine, theophylline and theobromine have different physiological effects and, therefore, pharmaceutical applications. Theophylline is used in apnea treatment and as a bronchial dilator whereas theobromine has diuretic properties (Asano *et al* 1993, Mingoia 1967). The toxicity of theophylline in cardiovascular and gastrointestinal system is similar to caffeine (Goodman & Gilman 1996).

1.2. Biosynthesis and catabolism of caffeine in plants

The plant biosynthesis of caffeine was studied in *Camellia sinensis* (tea) and *Coffea arabica* (coffee) by Fujimori *et al* 1991 and Shervington *et al* 1998. The steps of purine methylation by *Camellia* and *Coffea* are carried out by N-methyltransferase (NMT), which catalyzes reaction from xanthosine 5-monophosphate (XMP) to 7-methyl-XMP that is followed by a dephosphoribosylation leading to 7-methylxanthine and finally to theobromine and caffeine (Figure 2).

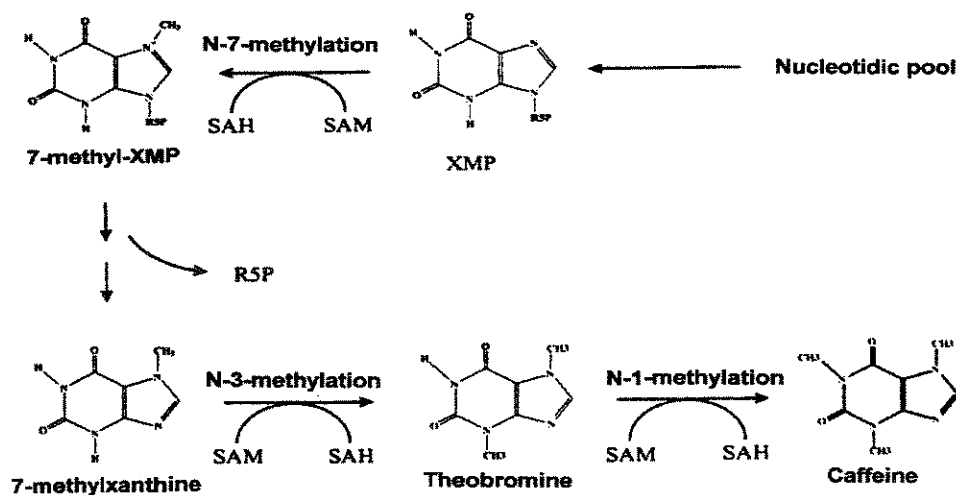


Figure 2. Biosynthesis of caffeine in leaves of coffee (Hakil 1999)

XMP: xanthosine 5-monophosphate; NMT: N-methyltransferase; SAM: S-adenosylmethionine; SAH: S-adenosylhomocysteine; R5P: ribose 5-phosphate

According to Ashihara & Crozier (1999), leaves of *Coffea salvatrix*, *C. eugenoides* and *C. bengalensis* contain approximately 3-7-fold lower levels of caffeine than those of *C. arabica*. A more extensive biosynthesis of caffeine from [8- 14 C] adenine was observed in young leaves of *C. arabica* than in others. Degradation of [8- 14 C] caffeine is negligible in leaves of *C. arabica* (Fig. 3), and very slow in *C. salvatrix* and *C. bengalensis*. In contrast, [8- 14 C] caffeine is catabolized rapidly by young leaves of *C. eugenoides*. These results indicate that the low caffeine accumulation in *C. salvatrix*, *C. eugenoides* and *C. bengalensis* is a consequence of a slow rate of caffeine biosynthesis while rapid degradation of caffeine contributes to a low endogenous caffeine pool in *C. eugenoides*. The genes that regulate caffeine accumulation appear to be those encoding N-methyltransferase and caffeine 7-N demethylase activities.

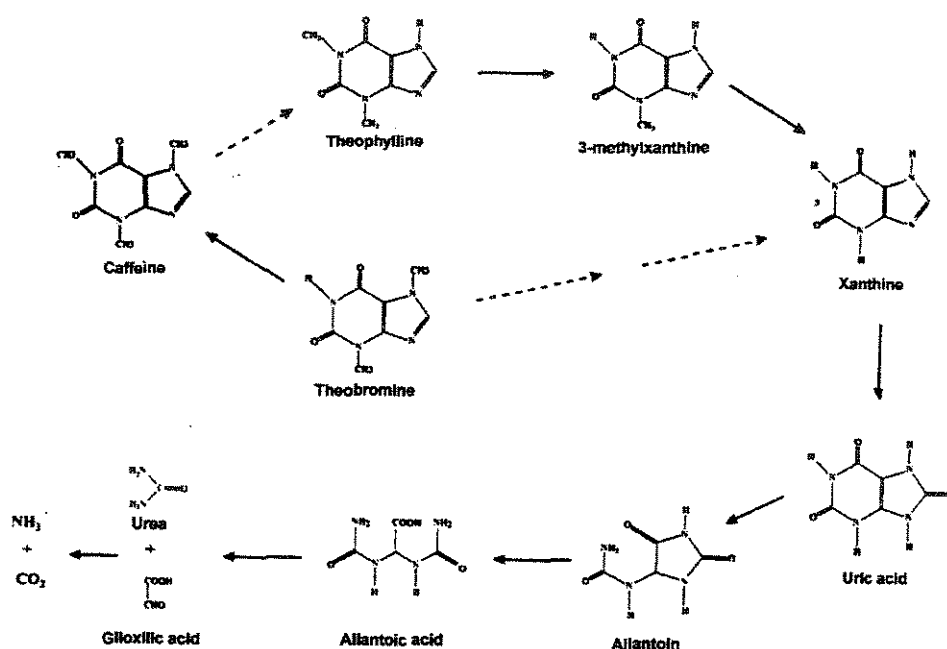


Figure 3. Caffeine degradation by *Coffea arabica* (Ashihara *et al* 1996, Hakil 1999)

1.3. Caffeine degradation by mammalian enzymes

The mammalian degradation of caffeine was studied by many researchers (Grant *et al.* 1987, Berthou *et al.* 1989, Chung *et al.* 1998).

In humans and animals, the demethylation process is carried out by cytochrome P450 (CYP 1A2) and the first steps of caffeine degradation consist of N-demethylation reactions, giving paraxanthine, theobromine, theophylline or trimethyluric acids (Fig 4). These dimethylxanthines can be detected in urine after caffeine ingestion, but alternatively, they can be further demethylated to xanthine, and catabolised by the uric acid route (Berthou *et al.* 1992).

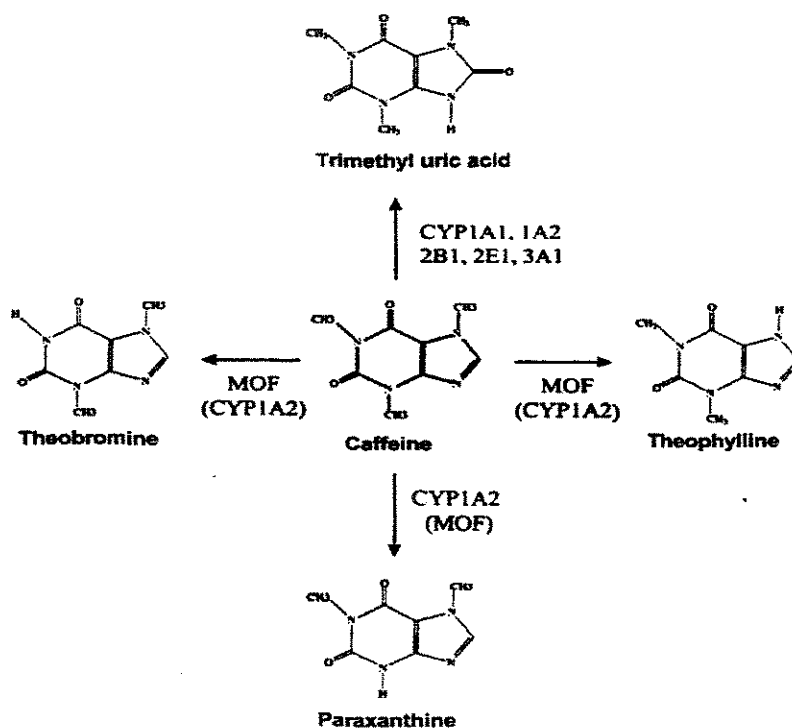


Figure 4. Degradation pathway of caffeine by rats (Chung *et al.* 1998, Hakil 1999)

CYP: cytochromes P450; MOF: monooxygenase

1.4. Caffeine degradation by bacterial enzymes

Caffeine is considered toxic for many microorganisms and it reversibly inhibits protein synthesis in bacteria and yeast at 0.1% concentration (Putrament et al 1972). However, some microorganisms have the ability to grow in the presence of caffeine and the capacity to degrade it.

Several studies were carried out to investigate the use of caffeine, as a source of energy for microorganism growth (Schwimmer et al 1971, Vogels & van der Drift 1976, Woolfolk & Downard 1977). According to Burr & Caesar (1985) *Pseudomonas* is the most frequent caffeine-degrading genera.

Dickstein et al (1957) studied the degradation of 3-methylxanthine in *Pseudomonas fluorescens* mediated by dehydrogenase activity. They did not find activity with 1-methylxanthine as substrate. However, Woolfolk (1975) used a *P. fluorescens* strain with ability to grow on caffeine to demonstrate dehydrogenase activity against both methylxanthines. Methanol and xanthine were the final reaction products, with indications that methanol was further oxidized to CO₂.

Blecher & Lingens (1977) studied degradation of caffeine by *P. putida* strains isolated from soil. They identified 14 catabolites: Theobromine, paraxanthine, 7-methylxanthine, xanthine, 3,7-dimethyluric acid, 1,7-dimethyluric acid, 7-methyluric acid, uric acid, allantoin, allantoic acid, ureidoglicolic acid, glioxilic acid, urea and formaldehyde (Figure 5).

Gluck & Lingens (1987) isolated *P. putida* mutants with the ability to degrade caffeine and attempted to block its degradation in order to produce caffeine derivatives for commercial application. The strain was isolated by culturing the bacteria with 2.0% of caffeine as the sole source of carbon and nitrogen in the culture media. They obtained a mixture of theobromine and paraxanthine as degradation products of caffeine by *P. putida* mutants. These results support inferences of Blecher & Lingens (1977), who suggested that caffeine can be degraded either via theobromine or via paraxanthine. Similar conclusion was reached by Mazzafera et al. (1994) with *S. marcescens*.

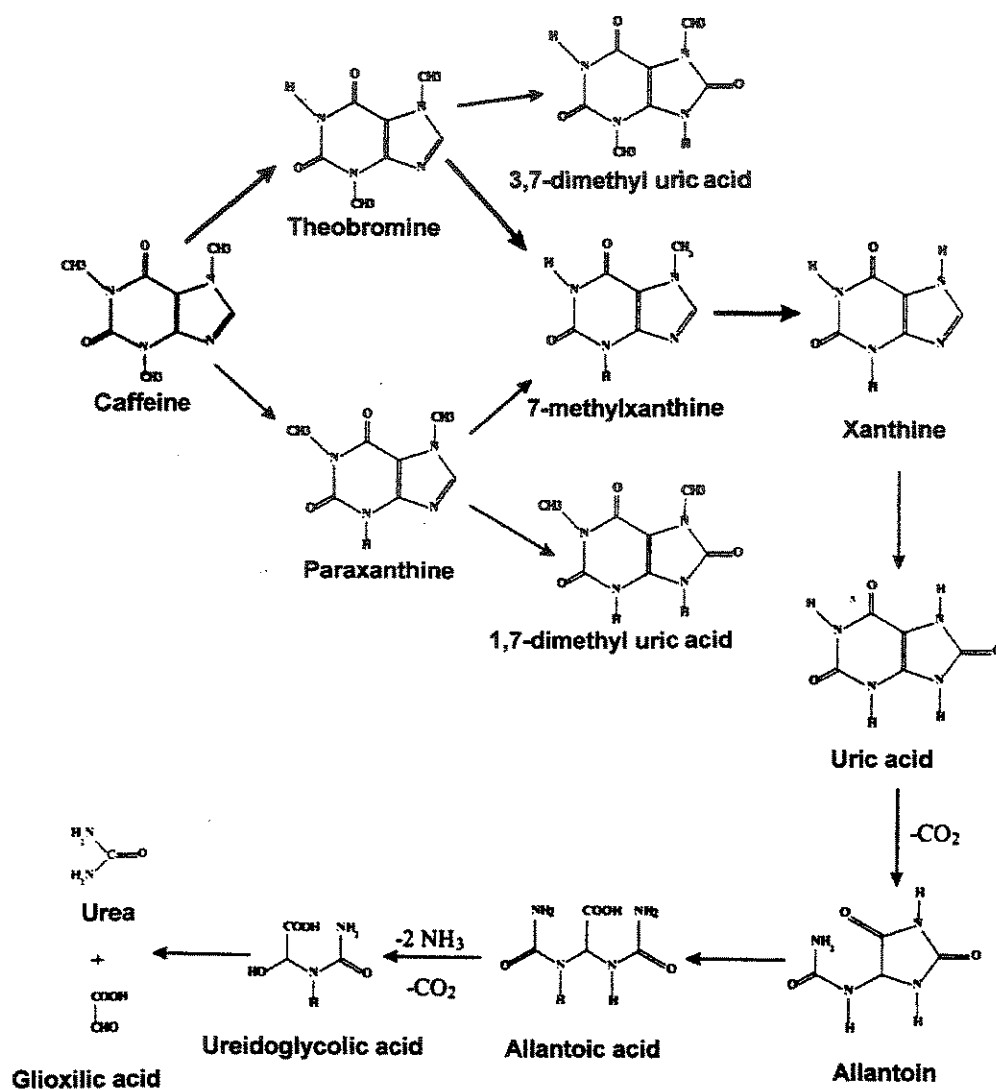


Figure 5. Degradation pathway of caffeine by *Pseudomonas putida* (Blecher & Lingens 1977, Hakil 1999)

Enzymological aspects of caffeine degradation by *Pseudomonas putida* were reported by Hohnloser *et al.* (1980). Using NADPH as a cofactor in enzyme assays, they observed only theobromine formation from caffeine and when paraxanthine, theobromine

or 7-monomethylxanthine was used, no activity was detected. Authors suggested that there was a single enzymatic system responsible for the sequential demethylation of caffeine. Regarding the lack of activity against theobromine and other substrates, they suggested that even though not detected *in vitro*, enzymatic degradation might occur *in vivo* at very low rates. It was discussed that the slow and poor growth of the bacteria on caffeine as the sole source of carbon was due to a limiting demethylation of caffeine as well as other methylxanthines (Mazzafera, 2002).

Middlhoven & Lommen (1984) studied oxygen influenced caffeine degradation. They concluded that the first enzymatic steps in caffeine degradation by a *P. putida* strain were the successive removal of the three methyl groups by mono-oxygenases. However, they failed to demonstrate the mono-oxygenase activities.

The first study on bacterial production of theobromine selectively from caffeine was reported by Asano *et al.* (1993). The pathway of caffeine degradation by *P. putida* strain isolated from soil could be blocked by addition of 1mM Zn^{2+} to the culture medium, accumulating nearly 20g/L of theobromine from caffeine with yield of 92%. This dimethylxanthine was excreted in the medium, and precipitated at the bottom due to its low solubility. A monooxygenase, specific for theobromine demethylation by *P. putida*, was purified from the cell-free extract and partially characterized (Asano *et al.*, 1994).

Mazzafera *et al.* (1994) and Yamaoka-Yano & Mazzafera (1998) collected mutants in soil samples taken from beneath the coffee plants. *S. marcescens* and several *P. putida* were isolated. A limiting demethylation rate of caffeine was observed in a *Serratia marcescens* strain. By cultivating bacteria on different substrates as the sole source of carbon and nitrogen, they established that caffeine was degraded to paraxanthine and/or theobromine, and subsequently to 7-methylxanthine and xanthine. A strain of *P. putida* isolated by Yamaoka-Yano & Mazzafera (1998) showed an impressive ability to grow in high concentrations of caffeine. Growth was observed at 25g L⁻¹ in liquid medium and at 50g L⁻¹ in solid medium. The direct isolation from the soil without any enrichment is a strong indication that because of competition for organic nutrients, bacteria growing in soil beneath coffee plants have developed mechanisms to degrade the caffeine released by the plants.

1.5. Caffeine degradation by fungal enzymes

Filamentous fungi have the ability to assimilate caffeine present in liquid synthetic media or in coffee waste (Tagliari *et al.* 2002). *Penicillium* and *Aspergillus* are the most frequent genera used for caffeine degradation.

Kurtzman and Shwimmer (1971) first studied the degradation of this alkaloid using strains of *Penicillium roqueforti* and *Stemphyllum* sp. The strains were able to degrade caffeine in a liquid medium containing caffeine concentrations below 19 g/L. Similar results were found when a *Penicillium crustosum* strain was cultivated in a liquid medium with coffee infusion (Shwimmer & Kurtzman 1972).

Penaloza *et al.* (1985) carried out solid-state fermentation studies in coffee pulp using an *Aspergillus niger* strain in order to improve the nutritional value. They reported proteic enrichment of substrate with no significant caffeine degradation.

Roussos *et al.* (1994) isolated mainly *Penicillium* and *Aspergillus* strains from coffee and byproducts. Eight of these strains showed great capacity to degrade caffeine in synthetic liquid medium without additional nitrogen source (Roussos *et al.* 1995).

Hakil *et al.* (1999) observed an inhibition of caffeine degradation by *Aspergillus tamarii* when inorganic nitrogen sources were present in the medium. The same result was achieved by Denis (1996) and by Roussos *et al.* (1994), showing that caffeine was only degraded after the primary nitrogen source disappeared.

Brand *et al.* (2000) isolated one strain of *Aspergillus niger* from coffee husk, which was able to degrade 90% of caffeine by solid state fermentation. These authors observed that the total degradation of caffeine by fungi was possible.

As observed in the bacterial metabolism, the first step of caffeine degradation by filamentous fungi consists of demethylation reaction. Although, the sequence of demethylation is different, in this case the theophylline is the major degradation product.

Theophylline was the first product of caffeine degradation by *P. roquefortii* (Schwimmer *et al.* 1971), *A. niger* (Ina 1971), *Aspergillus* sp. (Denis *et al.* 1998), *Aspergillus tamarii* (Hakil *et al.* 1999) and *Rhizopus* sp. (Tagliari *et al.* 2003).

Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) was first demethylated in position 7 leading to the formation of theophylline (1,3-dimethylxanthine) which was further demethylated in position 1 to give 3-methylxanthine and then to xanthine (Figure 6).

Hakil (1999) studied one of the enzymes involved in caffeine degradation by filamentous fungi. *A. tamaritii* was grown in a liquid synthetic medium containing 2g/L of caffeine and 29.4g/L of saccharose. Just the theophylline demethylase, which formed 3-methylxanthine from theophylline, was extracted, purified and characterized.

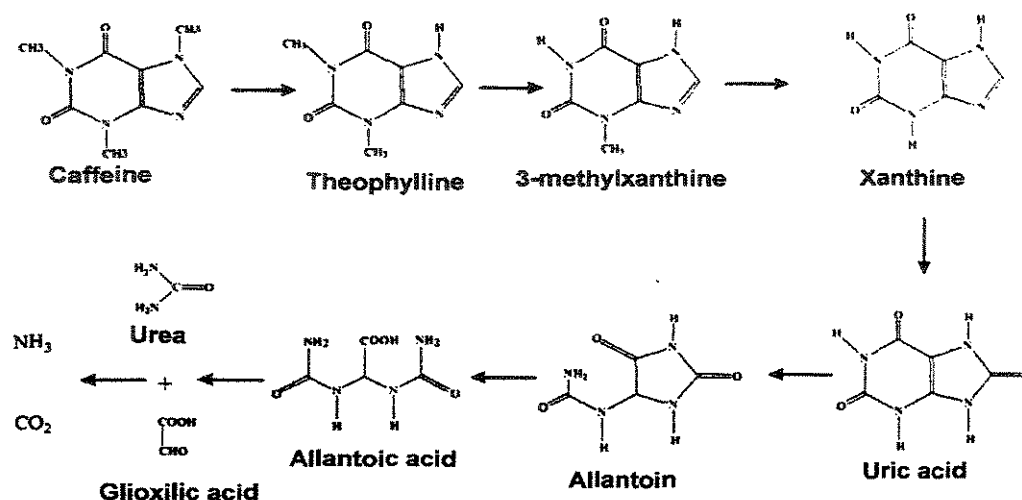


Figure 6. Degradation pathway of caffeine by filamentous fungi (Ina 1971, Hakil 1999)

Tagliari *et al.* (2003) studied enzymes production during degradation of caffeine present in coffee husk by *Rhizopus* sp. Solid-state fermentation was carried out in glass columns bioreactor with forced aeration, as described by Raimbault & Alazard (1980). The temperature was maintained at 28 °C with water bath. The columns were packed with pre-inoculated substrate at 10^6 spores.g⁻¹, pH 6.5 and 65% moisture. The airflow was set at 60mL.min⁻¹. It was observed that the pH increased from 6.0 to 8.5 after caffeine degradation, possibly due to urea formation. Three methylxanthines were quantified, to more than 0.01% of dry material (0.1mg/g dry fermented substrate), along 240 hours of

fermentation (Figure 7). The main caffeine degradation products identified in the samples were the 1,3-dimethylxanthine (theophylline) and the 3-methylxanthine which appeared due to successive demethylation steps. The profile of the activities of the enzymes during caffeine and theophylline degradation by *Rhizopus* sp in coffee husk is shown in Figure 8.

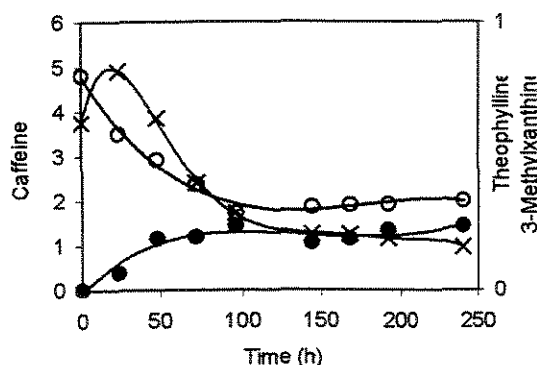


Figure 7. Kinetics of methylxanthines degradation by *Rhizopus* sp. in SSF: o caffeine, x theophylline, • 3-methylxanthine (mg/g dry substrate)

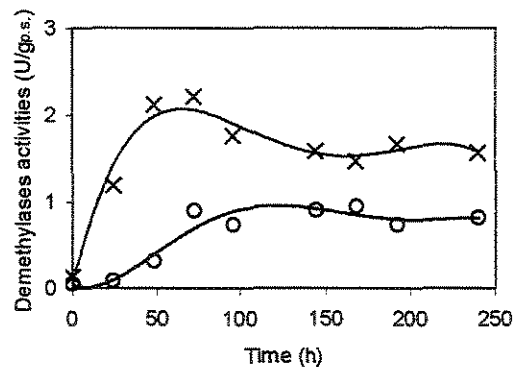


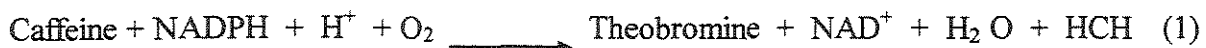
Figure 8. Enzymes activities during methylxanthines degradation by *Rhizopus* sp. (U/g dry substrate): o Caffeine demethylase, x theophylline demethylase

The enzymes profiles were observed to be inversely proportional to the respective substrate concentration, as can be observed. Thus, it's possible that the time necessary for maximum production of enzymes was influenced by initial caffeine concentration. No LAG phase was observed within enzymes production, nor during methylxanthines consumption, probably due to the microorganism previous adaptation to with the substrate. Maximum production of both enzymes, 2.1 U/g of dry substrate for theophylline demethylase and 0.9 U/g of dry substrate for caffeine demethylases were achieved at approximately 72 hours of fermentation.

2. Caffeine Demethylases Assay

These enzymes are quantified by the substrate concentration reduction or by product formation during caffeine demethylation reaction.

The reaction scheme for bacterial demethylation of the caffeine proposed by Asano et al (1994), indicates that caffeine demethylases is NADPH dependant and that the products are formaldehyde, besides of theobromine, water and the oxidized cofactor.



The activity of theophylline demethylase from *Aspergillus tamaritii* was determined according to Hakil (1999). The substrate consumption was quantified by HPLC analysis and one unit of enzyme activity (U) was defined as the quantity of enzyme required for degrade 1 μmol of substrate under the give conditions. The enzymatic reaction carried out at 30°C and pH 7.4 for 180 min in Eppendorf tubes containing 0,5mM theophylline, enzymatic extract, 50mM phosphate buffer and it was stopped with trichloroacetic acid (50%).

Demethylases from *Rhizopus sp.* were quantified by substrate reduction (caffeine 0.1mM or theophylline 0.2mM) in the linear region of time-course profile. One unit of enzyme activity (U) was defined as the quantity of enzyme required to degrade 1 μmol of substrate per minute at 30°C and pH 7.4. Caffeine and theophylline were determined by HPLC at 272 nm, using a microsorb C18 column (4,6 x 250 mm), 24% methanol as mobile phase and flow rate of 1mL/min (Tagliari *et al.* 2003).

3. Caffeine Demethylases Purification and Characterization

Asano *et al.* (1994) purified a demethylase, specific for theobromine, from the cell-free extract of *Pseudomonas putida*. The authors observed that caffeine was demethylated to 7-methylxanthine at least by the two enzymes, caffeine and theobromine demethylases. It was found that Zn^{2+} inhibited the latter and promoted the accumulation of theobromine from caffeine. The purification procedure developed for these enzymes were ammonium sulfate precipitation followed by dialysis. Chromatography on a DEAE-Sephacel column was then employed as a second purification step. The theobromine demethylases was further purified by hydrophobic

interaction chromatography and a single protein band (MW 41 KDa) was found by PAGE-SDS electrophoresis gel. It was suggested that the theobromine demethylase consisted of six identical subunits and the molecular weight was calculated to be about 250 KDa. The purified enzyme had a brown color and an adsorption at 415nm. The theobromine demethylase was activated by NADH, β -mercapto-ethanol and Co^{2+} and inhibited by Zn^{2+} . The K_m was calculated to be 1.1mM at 25°C and pH 7.5.

The stability of caffeine demethylases from *Pseudomonas putida* was greatly improved by the use of cryoprotectants and freeze-drying to low moisture contents. Freeze-dried cell-free extracts maintained 83% of activity after 200 days of storage at 4°C (Sideso et al 2001).

Yamaoka-Yano & Mazzafera (1999) purified the demethylase involved in the first step of caffeine degradation by *Pseudomonas putida*. The activity was labile in partially purified extracts. The enzyme was NADH or NADPH - dependent producing theobromine and paraxanthine from caffeine, but the activity was higher for paraxanthine. It was also observed that caffeine demethylase was excreted in the culture medium. Addition of Zn to the reaction mixture inhibited caffeine degradation through theobromine, but not paraxanthine. Proteins were concentrated by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation, desalted by dialysis and loaded on to an anionic exchange column (Mono Q). Demethylase activity was detected as a single peak, but both theobromine and paraxanthine were detected as products in the reaction.

Hakil (1999) purified the theophylline demethylase from *Aspergillus tamaritii*. This enzyme, which catalyzes the second step of caffeine degradation by filamentous fungi, is intracellular and instable to high temperature. Figure 9 shows the scheme of theophylline demethylase purification used in this study. All the steps were carried out at 4°C. The chromatographic procedures were carried out in a Bio-Rad FPLC system at pH 7.4 with 50mM phosphate buffer. The results of purification showed good correlation between molecular weight from gel filtration and of the SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. It was observed that this enzyme was monomeric, with molecular weight of 40kDa (Fig.10) and isoelectric point between 5.2 and 5.8. The activity obtained of purified theophylline demethylase was $1 \times 10^{-3} \text{U/mL}$.

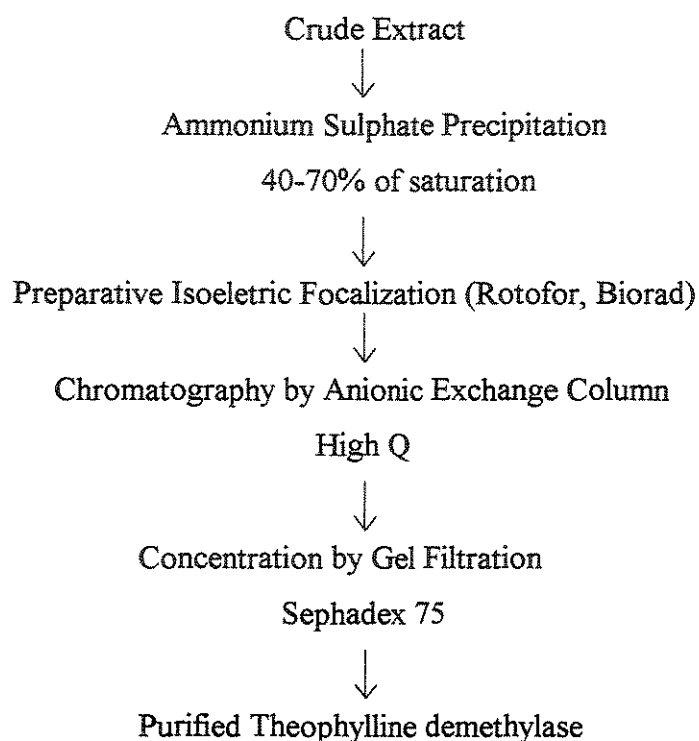


Figure 9. Purification scheme of the theophylline demethylase from *Aspergillus* (Hakil 1999).

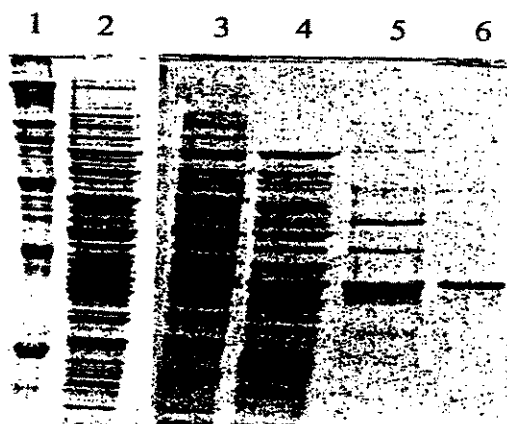


Figure 10. Coomassie blue protein of different purification steps. (1) Molecular markers, (2) Crude extract, (3) After ammonium sulphate precipitation, (4) Rotofor fractions, (5) Anion exchange fractions, (6) Gel filtration fractions (Hakil, 1999).

4. Conclusions and Future Perspectives

The caffeine is an alkaloid found in more than 60 plant species and can be degraded by various microorganisms including bacteria, yeast and fungi. *Penicillium* and *Aspergillus* are the more frequent caffeine-degradation genera for fungi and *Pseudomonas* for bacteria.

The first steps of microbial degradation of caffeine consist of demethylation reactions. Although, the sequence of demethylation is different for bacteria and fungi, resulting in different degradation products. The theobromine is the major degradation product for bacteria and the theophylline for fungi. Differences in metabolic pathways of caffeine indicate that different enzymes are involved in plant, fungal, bacterial and mammalian metabolism of this alkaloid.

The clinical interest of these enzymes is due to the large number of drug interactions and can be used in the theobromine or theophylline production. Theophylline and theobromine be able to pharmaceutical applications, the first is used as a bronchial dilator and to treat apnea whereas the last has diuretic properties.

Caffeine demethylases also can be used for obtaining decaffeinated products as soluble coffee and coffee pulp or husk. Decaffeinated coffee residues are able to used as feed supplement for animals or as substrate for bioconversion processes.

Researchers are continuing their strong efforts towards to optimize the production of these enzymes. Developments in genetic and protein engineering can be led to improvements in the stability, economy, specificity and potential industrial application of these enzymes.

The continued development of new enzymes through modern biotechnology may lead to new enzyme products with improved cleaning effects at low temperatures, for example. New enzyme applications are likely to bring benefits in other areas: less harm to the environment, greater efficiency, lower costs, lower energy consumption and enhancement of a product's properties.

5. References

- Asano Y, Komeda T, Yamada H, 1993, Microbial production of theobromine from caffeine, Biosci. Biotech. Biochem., 57, 1286-1289

- Asano Y, Komeda T, Yamada H, 1994, Enzymes involved in theobromine production from caffeine by *Pseudomonas putida* No. 352, Biosci. Biotech. Biochem., 58, 2303-2304
- Ashihara H et al, 1996, Plant Physiology 111, 747-753
- Ashihara H & Crozier A, 1999, J Agric Food Chemistry 47, 3425-3431
- Berthou F, Ratanasavanh D, Riche C, Picart D, Voirin T, Guillouzo A, 1989, Comparison of caffeine metabolism by slices, microsomes and hepatocyte cultures from adult human liver, Xenobiotica, 19, 401-417
- Berthou F, Guillois B, Riche C, Dreano Y, Jacqzaigrain E, Beaunes PH, 1992, Interspecies variation in caffeine metabolism related to cytochrome P4501A enzymes. Xenobiotica, 22, 671-680
- Blecher R, Lingens F, 1977, The metabolism of caffeine by a *Pseudomonas putida* strain, HoppeSeyler's Z. Physiol. Chem., 358, 807-817
- Brand D, Pandey A, Roussos S, Soccol CR, 2000, Enzyme and Microbial Technology, 27, 127-133
- Brand D, Pandey A, Rodrigues-Leon J, Roussos S, Brand I, Soccol CR, 2001, Packed bed column fermenter and kinetic modeling for upgrading the nutritional quality of coffee husk in solid state fermentation, Biotechnology Progress, 17, 1065-1070
- Burr Tj, Caesar A, 1985, Beneficial plant bacteria, CRC Critical Review in Plant Science, 2, pp 120
- Chung WG, Roh HK, Kim HM, Cha YN, 1998, Chemico-Biological Interactions, 113, 1-14
- Denis S, 1996, PhD thesis, Montpellier II University, France.
- Denis S, Augur C, Marin B, Roussos S, 1998, Biotechnology Techniques 12(5), 359-362
- Dikstein S, Bergmann F, Henis Y, 1957, Studies on uric acid and related compounds. IV, The specificity of bacterial xanthine oxidases, J. Biol. Chem., 224, 67-77
- Fujimori N, Suzuki T, Ashihara H, 1991, Seasonal variations in biosynthetic capacity for the synthesis of caffeine in tea leaves, Phitochemistry, 30, 2245-2248
- Glück M, Lingens F, 1987, Studies on the microbial production of theobromine and heteroxanthine from caffeine, Appl. Microbiol. Biotechnology, 25, 334-340
- Goodman LS & Gilman A, 1996, Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, Ed. New York, McGraw-Hill

- Grant DM, Campbell ME, Tang BK, Kalow W, 1987, Biotransformation of caffeine by microsomes from human liver, *Biochem. Pharmacol.*, 36(8), 1251-1260
- Hakil M, 1999, Dégradation de la Caféine par les Champignons Filamenteux, Purification et Caracterization d  une Théophylline D  methylase d  *Aspergillus tamarii*, Thèse de doctorat, Universit   de Franche-Comté
- Hakil M, Denis S, Viniegra-gonzales G, Augur C, 1998, *Enzyme and Microbial Technology*, 22, 355-359
- Hakil M, Voisinet F, Viniegra-gonzales G, Augur C, 1999, *Process Biochemistry*, 35 (1), 103-109
- Hohnloser W, Osswald B, Lingens F, 1980, Enzymological aspects of caffeine demethylation and formaldehyde oxidation by *Pseudomonas putida* C1, *HoppeSeyler's Z. Physiol. Chem.*, 361, 1763-1766
- Ina K, 1971, Biochemical studies of caffeine, *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 45(8), 378-380
- James JE, 1991, Caffeine and health, San Diego, Academic Press, pp 428
- Kurtzman RH & Shwimmer S, 1971, Caffeine removal from growth media by microorganisms. *Experientia*, 127, 481-482
- Mazzafera PA, 1991, Caf  ina do café, Documentos do Instituto Agron  mico de Campinas, 25, pp 122
- Mazzafera P, 2002, Degradation of caffeine by microorganisms and potential use of decaffeinated coffee husk and pulp in animal feeding, *Scientia Agricola*, 59(4), 815-821
- Mazzafera P, Olsson O, Sandberg G, 1994, Degradation of caffeine and related methylxanthines by *Serratia marcescens* isolated from soil under coffee cultivation, *Microbial Ecology*, 31, 199-207
- Merk Index, 1989, 9^a ed.
- Middelhoven WJ & Lommen A, 1984, Degradation of caffeine by *Pseudomonas putida* C3024; the effect of oxygen concentration, *Antonie van Leeuwenhoek* 50, 298-300
- Mingoia Q, 1967, Excitantes do sistema nervoso central, in: Mingoia Q, Química farmac  utica, São Paulo, Melhoramentos, pp 222-227

- Penaloza W, Molina MR, Brenes RG, Bressani R, 1985, Solid-State Fermentation: an Alternative to Improve the nutritive Value of Coffee Pulp, *Applied and Environmental Microbiology*, 49 (2), 388-393
- Pharmacother 1995, 29, 619-24
- Putrament A, Baranowska H, Bilinski T, Prazmo W, 1972, *Molecular General Genetics*, 118, 373-379
- Raimbault M & Allazard D 1980, Culture method to study fungal growth in solid state fermentation, *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 9, 199-209
- Roussos S, Hannibal L, Aquiahuatl MA, Trejo Hernandez MR, Marakis S, 1994, *J. Food Sci. Technol.*, 31, 316-319
- Roussos, S, Aquiahuatl, MA, Trejo-Hernandes, MR, Gaime-Perraud, I, Favela, E, Ramakrishna, M, Viniegra-Gonzales, G, 1995, Biotechnological Management Of Coffee Pulp: Isolation, Screening, Characterization, Selection Of Caffeine-Degrading Fungi And Natural Microflora Present In Coffee Pulp And Husk, *Applied Microbiology And Biotechnology*, 42(5), 756-762
- Sauer M, 1982, Comparison of the cytochrome P450 containing monooxygenases originating from two different yeasts, *Developments in Biochemistry*, 23, 452-457
- Shervington A, Shervington LA, Afifi F, El-Omari MA, 1998, Caffeine and theobromine formation by tissue cultures of *Camellia sinensis*. *Phytochemistry*, 47(8), 1535-1536
- Shwimmer S, Kurtzman RH, Heftmann E, 1971, Caffeine metabolism by *Penicillium roqueforti*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 147, 109-113
- Shwimmer S & Kurtzman RH, 1972, *J. Food Sci.*, 37, 921-924
- Sideso OFP, Marvier AC, Katerelos, NA, Goodenough PW, 2001, The characteristics and stabilization of a caffeine demethylase enzyme complex, *International Journal of Food Science & Technology*, 36 (6), 693
- Suzuki T, Ashihara H, Waller GR, 1992, Purine and purine alkaloid metabolism in *Camellia* and *Coffea* plants, *Phytochemistry*, 31, 2575-2584
- Tagliari CV, Sanson RK, Paca J, Franco TT, Soccol CR, 2002, Biological detoxification of coffee husk by *Rhizopus* sp. by solid state fermentation using a column bioreactor, 15th International Congress of Chemical and Process Engineering, Praga, República Tcheca

- Tagliari CV, Sanson RK, Zanette A, Pandey A, Franco TT, Soccol CR, 2003, Comparison between enzymes production and toxic compounds degradation during solid state fermentation in coffee husk, International Conference on Emerging Frontiers at the Interface of Chemistry & Biology, Trivandrum, India
- Timson J, 1975, Theobromine and theophylline, Mutation Research, 32, 169-178
- Vogels GD & van der Drif C, 1976, Degradation of purines and pyrimidines by microorganisms, Bacteriol. Rev., 40, 403-468
- Woolfolk CA, 1975, Metabolism of Nmethylpurines by a *Pseudomonas putida* strain isolated by enrichment on the caffeine as sole source of carbon and nitrogen, J. Bacteriol. 123, 1088-1106
- Woolfolk CA & Downard JS, 1977, Distribution of xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase specificity types among bacteria, J. Bacteriol., 130, 1175-1191
- YamaokaYano DM & Mazzafera P, 1998, Degradation of caffeine by *Pseudomonas putida* isolated from soil, J. Allelopathy, 5, 23-34
- Yamaoka-Yano DM & Mazzafera P, 1999, Catabolic pathway of caffeine and purification of a xanthine oxidase responsible for methyluric acid production in *Pseudomonas* L, Revista de Microbiologia, 30, 70-78

4. RESULTADOS: ARTIGO 1

DESENVOLVIMENTO DE UM BIOPROCESSO PARA AUMENTAR O VALOR NUTRITIVO DA CASCA DE CAFÉ: OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS

Fungos filamentosos do gênero *Rhizopus* são utilizados na preparação de alimentos fermentados há milhares de anos e alguns autores têm demonstrado que estes fungos podem melhorar o valor protéico e a digestibilidade dos alimentos (Stertz, 1997). Sendo assim, a casca de café detoxificada por este microrganismo teria o seu valor nutricional aumentado devido à degradação de compostos como cafeína e taninos e pela incorporação de proteínas resultantes do crescimento do fungo. Este artigo apresenta os resultados da otimização das condições de fermentação da casca de café por *Rhizopus delemar* em frascos de Erlenmeyer e biorreator de colunas. Os parâmetros investigados foram temperatura, pH, umidade inicial, granulometria do substrato, concentração do inóculo, hidratação do substrato antes da inoculação e vazão de ar (somente no biorreator de colunas).

OPTIMIZATION OF SOLID-STATE FERMENTATION PARAMETERS TO IMPROVE THE NUTRITIVE VALUE OF COFFEE HUSK

Keywords: coffee husk, decaffeination, caffeine, tannin, column bioreactor, experimental design, solid state-fermentation, *Rhizopus*.

ABSTRACT

Filamentous fungi are able to assimilate caffeine and tannins from liquid synthetic media or from coffee residue. *Penicillium* and *Aspergillus* are the most frequently described genera used for caffeine degradation. Biotechnological detoxification of coffee husk with a microorganism recognized as "GRAS" (Generally Recognized as Safe), would enable the use of this residue as feed supplement or as substrate for bioconversion processes. In this work, solid-state fermentation was carried out in Erlenmeyer flasks and also in packed bed column bioreactor and the optimization of the process parameters was studied by experimental design, analyzing the effect of the investigated variables on the response. The best degradation of the two toxic compounds, 86% of caffeine and 60% of tannin reduction, in Erlenmeyer flasks was achieved with 75% moisture, at pH 6,5 and 28°C after 7 days. It was observed that inoculum concentration did not affect the degradation and that the initial moisture content was the most important factor on the detoxification for both compounds. In order to study the effect of aeration on caffeine and tannins degradation, solid-state fermentation was also proceeded in a packed bed column bioreactor, using the conditions previously optimized for Erlenmeyer flasks (pH and temperature which were kept constant). The statistical analysis showed a significative interaction between substrate moisture and aeration rate; and in this fermentation system, the highest degradation was 60% for both compounds. This was achieved with 60% initial moisture and 0.84 to 1.3

mL(g of substrate.min)⁻¹ of aeration rate. The results showed good potential of *Rhizopus sp.* for the degradation of caffeine and tannins and open new opportunities for the utilization of this byproduct.

1. INTRODUCTION

Coffee is one of the most important agricultural commodities in the world. Brazil is the largest producer of coffee, contributing to approximately 28% of the world's production. The principal varieties grown all over the world are *Coffea arabica* and *Coffea robusta*. Depending up on the method of coffee cherries processing, i.e. wet or dry process, the solid residues obtained are termed as pulp or husk, respectively (Pandey *et al.*, 2001).

Coffee husk is the most abundant residue of the coffee cherries in Brazil and constitutes approximately 40% of the fresh fruit (Tagliari *et al.*, 2002). Some of the husk is used as organic fertilizer, but other applications are very limited, mainly because it is a bulky product (Mazzafera, 2002).

The utilization of coffee husk as animal feed has been mentioned as an attractive possibility due to high contents of carbohydrate, protein, fat and fibers. However, this utilization is limited by anti-nutritional and anti-physiological factors present in the material (Brand *et al.*, 2001), however ruminants consume it.

Tannins have a major impact on animal nutrition because their ability to form complexes with numerous types of molecules, including carbohydrates, proteins and polysaccharides. Studies employing coffee pulp as ruminant feed have shown that tannins may reduce intake by decreasing palatability and affecting digestibility due astringency characteristic (Lekha & Lonsane, 1997). In poultry, small quantities of tannin (0,5 a 2,0 %) in the diet decrease egg production (Cannas, 1999).

The caffeine is harmful to the animals due to physiological effects on the central nervous system (Mazzafera, 2002). The caffeine effects in ruminants might be related to the increase of diuresis, which decrease nitrogen retention. Caffeine could also cause

nervousness in animals, accelerating their basal metabolism (Cabezas *et al.*, 1987).

Alternative technologies to detoxify coffee husk have been investigated. Chemical and physical methods are considered relatively high-cost technologies to be implemented at the processing sites. Solid-state fermentation has been reported to be a relatively low-cost appropriate technology for biological detoxification of coffee husk using fungal strains (Pandey *et al.*, 2000 and Soccol & Vandenberghe, 2003).

Detoxified coffee husk could be used for animal feeding or as substrate for producing several value-added products such as enzymes (Pandey *et al.*, 1999), edible mushrooms (Fan *et al.*, 2000), aroma compounds (Medeiros *et al.*, 2000) and gibberellic acid (Soccol *et al.*, 2000).

Kurtzman and Shwimmer (1971) first studied the degradation of this alkaloid using strains of *Penicillium roqueforti* and *Stemphyllum* sp. The strains were able to degrade caffeine in a liquid medium containing caffeine concentrations below 19 g/L. Similar results were found when a *Penicillium crustosum* strain was cultivated in a liquid medium with coffee infusion (Shwimmer & Kurtzman, 1972).

Penaloza *et al.* (1985) carried out solid-state fermentation studies with coffee pulp with an *Aspergillus niger* strain in order to evaluate the improvement of the nutritional value. They reported proteic enrichment of the substrate but with no significant caffeine elimination.

Roussos *et al.* (1994) isolated strains from coffee and byproducts, which were mainly identified as *Penicillium* and *Aspergillus*. Eight of these strains showed great capacity to degrade caffeine in synthetic liquid medium without additional nitrogen source (Roussos *et al.*, 1995).

Menezes *et al.* (1994) showed that a strain of *Lactobacillus plantarum* was able to degrade up to 90% of the tannin present in the coffee pulp after 8 days of incubation at 32°C.

Hakil *et al.* (1999) observed an inhibition of caffeine degradation by *Aspergillus*

tamaritii when inorganic nitrogen sources were present in the medium. The same result was achieved by Denis (1996) and by Roussos *et al.* (1994), showing that caffeine was only degraded after the primary nitrogen source had disappeared.

Fan *et al.* (1999) studied the degradation of caffeine present in coffee husk using a strain of *Pleurotus ostreatus*. Reduction of caffeine concentration was observed in the substrate, but micelial analysis showed that the strain did not degrade caffeine but accumulated it into the cell.

Brand *et al.* (2000) selected fungi strains by their ability to grown on coffee husk extract-agar media. An *Aspergillus* strain isolated from coffee husk, which was previously selected for being able to grow on selective medium with caffeine, reduced 90% and 75% of initial caffeine and tannin concentrations, respectively.

The aim of this work was to optimize the solid-state fermentation conditions for coffee husk detoxification by *Rhizopus delemar*.

2. MATERIAL AND METHODS

Microorganism and Substrate

The strains were maintained on coffee husk extract agar medium (CHEA). This medium was prepared by cooking 100g of coffee husk in one liter of distilled water for 50 min. This extract (CHE) was supplemented with 20g of agar and sterilized at 121°C for 20 minutes. Spores suspension was prepared after 10 days of culture on CHEA medium at 32°C. The spores were collected, and transferred to 150 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of water and drops of Tween 80 and counted in a Neubauer cell.

Coffee husk used as substrate was obtained from Cooperativa de Cafeicultores e Agropecuaristas de Maringá – LTDA (COCAMAR), Parana, Brazil. Coffee husk was dried in air oven up to 10% moisture, milled and sieved to obtain fractions between 0.4 and 2.0 mm particle size. The substrate contained 7% proteins, 64% fibers, 2% fats, 10% minerals,

9% total sugars, 0.6% caffeine and 2% tannins.

Strain Selection

The four strains used in this work belong to Laboratory of Biotechnological Process (LPB) of the Federal University of Parana (UFPR). They have been described for their ability to grow in CHEA medium (Brand et al., 2000). In order to prepare the inoculum, Erlenmeyer flasks containing 50mL of CHE extract culture media were inoculated with 1×10^6 spores/mL and incubated at 30°C and 250 rpm for 3 days. The strains were screened for their ability to degrade the caffeine present in the medium.

Optimization of Solid-State Fermentation

The conditions of coffee husk detoxification were studied by experimental design according to Haaland (1989) and Barros Neto *et al.* (1995). The experiments were followed for 7 days and the results presented are the average of duplicates. The experiments were designed according to randomized structure and the responses for all experimental designs were the percentage of caffeine and tannin degraded. Statistica software version 5.0 was used in this study.

A factorial design 2^{6-2} was initially employed to define which variables were more significative for coffee husk detoxification (Table 1). These experiments were carried out in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 20g of the substrate.

Table 1. Decoding values to investigate the effect of fermentation parameters on caffeine and tannins reduction in Erlenmeyers flasks

Factor	Level		
	-1	0	+1
Moisture (%)	60	65	70
Previous hydration of substrate	-	12 h before sterilization	12 h after sterilization
pH	5.0	6.0	7.0
Particle size (mm)	0.4-0.8	0.8-1.7	1.7-2
Inoculum concentration (spores/g of substrate)	10^5	10^6	10^7
Temperature (°C)	28	32	35

Table 2 describes the decoding values for initial moisture, initial pH and incubation temperature used in the second experimental design in Erlenmeyer flasks.

Table 2. Complete factorial design (2^3) to investigate the effect of moisture, pH and temperature on caffeine and tannins reduction in Erlenmeyers flasks

Factor	Level		
	-1	0	+1
Moisture (%)	65	70	75
pH	6.5	7.0	7.5
Temperature (°C)	28	30	32

When a packed bed reactor was further employed in order to study the degradation of both compounds, the effect of forced aeration was also investigated. The experiments were carried out in glass columns with forced aeration (Fig. 1), as described by Raimbault and Alazard (1980), immersed in a water bath with adjusted temperature at 28 °C. Each column had the capacity for 40g of the substrate (dry weight basis). Pre-inoculated substrate with 10^6 espores.g⁻¹ and pH adjusted to 6.5 was packed into the columns.

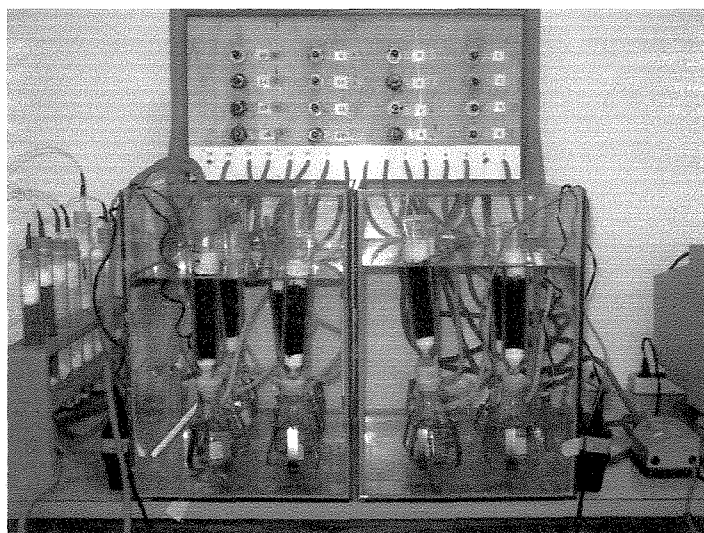


Figure 1. Packed bed column bioreactor

A central composite design with five levels was performed (Table 3), including the central point and star points (axial points with an axial distance to center of $\pm \alpha$).

Table 3. Central composite design (2^3) to investigate the effect of moisture and aeration on caffeine and tannins reduction in the packed bed column bioreactor

Factor	Level				
	-1.4142	-1	0	+1	+1.4142
Initial moisture (%)	53	55	60	65	67
Airflow (mL/min)	42	50	70	90	98

Analytical Methods

Caffeine was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) according to DIN (1994). One gram of sample and 5g of magnesium oxide were transferred to a volumetric 250 mL glass flask, and 200mL of water were added. The flasks were continuously stirred and heated at 90°C for further 20 minutes. The flasks were cooled at 25°C and diluted to 250 mL with distilled water. The suspensions were centrifuged for 10 minutes at 3500g, filtered in a vacuum system and then in 0.22 μ m Millipore membrane. Caffeine was determined on a Waters system with UV detector (272 nm), automatic injector and C18 Nova Pack column (3.9 x 150 mm). The mobile phase was made of methanol and water (24:76, v/v) with a flow rate of 1 mL/min.

Tannins were determined by a spectrophotometry method (AOAC, 1965). One gram of sample was transferred to volumetric 100 mL glass flasks, and 100 mL of boiling distilled water was added and the mixture was kept at 97°C for 20 minutes. The suspensions were cooled at 25°C, filtered and diluted to 100mL. Five milliliters of this extract were mixed with 5mL of Folin-Denis reactive and 10mL of saturated Na_2CO_3 . The solutions were diluted to 100mL and after 30 min, the optical density were measured at 700nm.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Strain Selection

In order to investigate the most able strain to grow in CHE media, four different fungi strains were tested: *R. oryzae* LPB 68, *R. delemar* LPB 12, *R. arrhizus* LPB 79 and *Aspergillus* sp. Figure 2 represents the biomass production, reducing sugars consumption and residual caffeine for the investigated strains. All the four strains were able to grow in CHE culture media and to degrade the caffeine present. It was found that the *Rhizopus delemar* LPB 12 strain produced the highest amount of biomass (0.93 g/L) and presented the best degradation level of caffeine, 42%. Based on these results and in the fact that this genera of filamentous fungi is recognized as "GRAS" and has been used to improve the protein value and the digestibility of foods (Stertz *et al.*, 1999), the strain *Rhizopus delemar* LPB 12 was chosen for further fermentation studies.

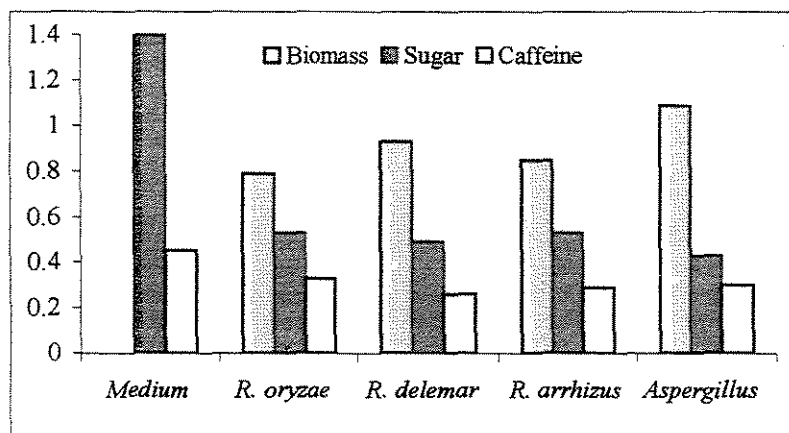


Figure 2. Biomass production (g/L), reducing sugars (g/L) and residual caffeine (g/L) after 3 days of fermentation in coffee husk extract medium

Solid-State Fermentation in Erlenmeyer Flasks

The experimental factorial design 2^{6-2} was used as a tool to select the influence of the most important fermentation factors on the process of coffee husk detoxification. The

investigated factors of the first factorial design were moisture, substrate hydration before inoculation, pH, inoculum concentration, particle size and temperature. The main effects are depicted in Table 4.

It was found that the inoculum concentration and substrate hydration before inoculation were not significant factors on degradation of toxic compounds present in coffee husk. These two factors were then fixed in 10^6 spores/g substrate and no previous substrate hydration was done on the further experiments.

The effect of particle size was negative, i. e. the best results of degradation were achieved with the smallest sizes (0.4-0.8 mm), probably because of the nutrients higher bioavailability. Initial moisture, temperature and the pH were the most important factors on the detoxification for both compounds.

Table 4. Results of main effects on caffeine and tannin degradation

Variable	Caffeine reduced (%)	Standard error	Tannin reduced (%)	Standard error
Mean	60.37*	0.938	35.05*	2.119
Initial moisture	11.50*	1.022	10.12*	2.309
Previous hydration of substrate	-0.50	1.022	5.12	2.309
Initial pH	3.50*	1.022	12.37*	2.309
Inoculum concentration	1.00	1.022	-6.62	2.309
Particle size	-7.50*	1.022	-13.62*	2.309
Temperature	-5.00*	1.022	13.12*	2.309

* Significant at the 95% of confidence interval

A complete design 2^3 was performed in order to approach the optimum response region. Only the more significant effects in the previous detoxification in Erlenmeyer flasks were investigated in this design and the results are shown in the Table 5. The best level of toxic compounds degradation, 86% of caffeine and 58% of tannin were achieved at 28°C, pH 6.5 and 65% of initial moisture.

Table 5. Caffeine and tannin degradation obtained in the complete design 2³

	%Moisture	T (°C)	pH	%Caffeine Reduced	%Tannin Reduced
1	65	28	6.5	71	44
2	65	28	7.5	71	37
3	65	32	6.5	66	47
4	65	32	7.5	70	50
5	75	28	6.5	86	58
6	75	28	7.5	83	55
7	75	32	6.5	77	57
8	75	32	7.5	84	49
9	70	30	7.0	76	50
10	70	30	7.0	76	47

The experimental results were fitted in a first-order model:

$$\text{C.R.} = 296.95 + 2.35 \text{ M} - 10.44 \text{ T} - 52.76 \text{ pH} - 0.408 \text{ M T} + 0.26 \text{ M pH} + 1.762 \text{ T pH} \quad (1)$$

$$\text{T. R.} = -656.97 + 12.1 \text{ M} + 16.31 \text{ T} + 2.0 \text{ pH} - 2.288 \text{ M T} - 0.35 \text{ M pH} + 0.625 \text{ T pH} \quad (2)$$

Where: C. R. = % Caffeine Reduced; T. R. = % Tannin Reduced; T = Temperature; M = Initial Moisture; pH = Initial pH.

The results obtained for caffeine and tannin degradation were examined by analysis of variance. Tables 6 and 7 show the ANOVA for the full linear model including the regression values, deviations and correlation coefficients.

The F value represents the relation between regression sum square and deviation sum square. The regression equations presented good correlation coefficients, 0.98 for caffeine and 0.90 for tannin reduction, and the linear model is adequate for representation of the experimental results in the studied region. The linear model may predict only the caffeine degradation because the F_{calc} (see Table 6 and 7) should be four times higher than F_{listed} .

Table 6: ANOVA for the full linear model plus two central points for caffeine degradation

F_{listed} values are significant at a 90% confidence level; Regression coefficient (R) = 0.98;
 $F_{\text{calc}} (MQ_{\text{LF}}/MQ_{\text{PE}}) < F_{\text{listed}}$; $F_{\text{calc}} (MQ_{\text{R}}/MQ_{\text{T}}) > 7.2\text{-fold } F_{\text{listed}}$;

Source of Variation	Sum of Squares	Degrees of freedom	Mean quadratic	F test	
				F_{calc}	F_{listed}
Regression (R)	404.43	6	67.405	38.25	5.2 ($F_{0.90; 6,3}$)
Residual (r)	5.286	3	1.762		
Lack of fit (LF)	4.83	2	2.41	5.36	49.5 ($F_{0.90; 2,1}$)
Pure error (PE)	0.45	1	0.45		
Total variation	409.7	9	-		

Table 7: ANOVA for the full linear model plus two central points for tannin degradation

F_{listed} values are significant at a 90% confidence level; Regression coefficient (R) = 0.90;
 $F_{\text{calc}} (MQ_{\text{LF}}/MQ_{\text{PE}}) < F_{\text{listed}}$; $F_{\text{calc}} (MQ_{\text{R}}/MQ_{\text{T}}) = F_{\text{listed}}$;

Source of Variation	Sum of Squares	Degrees of freedom	Mean quadratic	F test	
				F_{calc}	F_{listed}
Regression (R)	325.80	6	54.3	5	5.2 ($F_{0.90; 6,3}$)
Residual (r)	32.60	3	10.88		
Lack of fit (LF)	28.10	2	14.05	3.12	49.5 ($F_{0.90; 2,1}$)
Pure error (PE)	4.5	1	4.5		
Total variation	358.4	9	-		

Figures 3 and 4 show the influence of variables on the responses. It was evident that the initial moisture content was the more significant parameter for degradation of both compounds at a 95% of confidence interval. The effect of initial moisture was positive, i. e. the best results were achieved with the highest level (75%). Despite of the model indication that detoxification would be maximized in regions above 75% of moisture, it was observed that there was free water on these conditions, showing that the best moisture level for

Erlenmeyer flasks solid-state was already achieved.

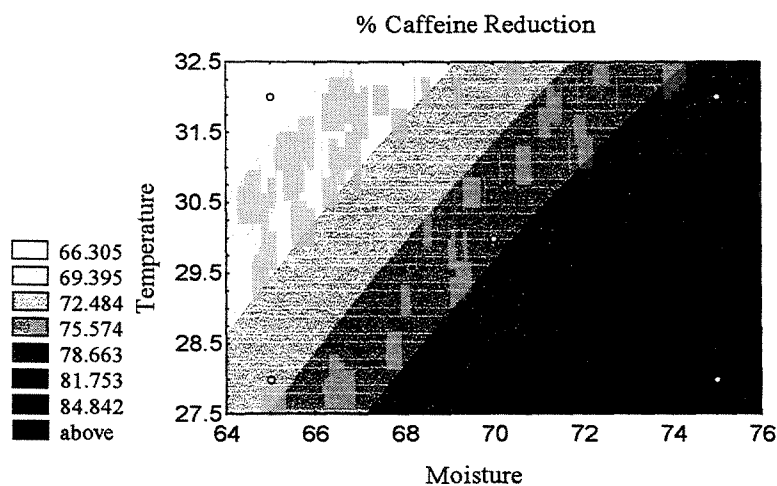


Figure 3. Effects of initial moisture and temperature on caffeine degradation

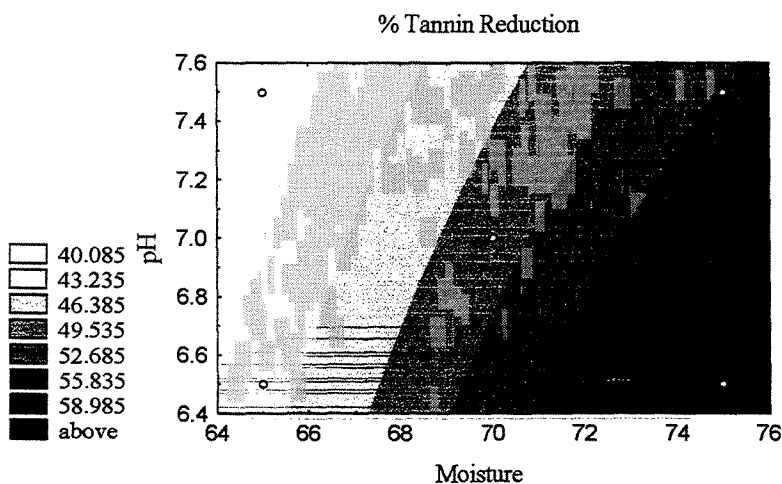


Figure 4. Effects of initial moisture and pH on tannin degradation

Solid-State Fermentation in Packed Bed Column Bioreactor

In order to study the effect of aeration on both compounds degradation and its

interaction with the substrate moisture, the solid-state fermentation process was also operated in a packed bed column bioreactor. The conditions optimized in Erlenmeyer flasks were used in this experiment: 28°C, pH 6.5, 0.8-1.7 mm of particle size and 10^6 spores/g of substrate. Due to porosity problems in a packed bed column, it was not possible to use the smallest particle size as identified earlier.

In a packed bed column reactor, the initial substrate moisture should be preferably lower than the one optimized for Erlenmeyer flasks, since water saturated air is continuously flowing through the substrate bed. The thickness of the substrate bed in Erlenmeyer flasks is much less than the one in the column; therefore, there are no porosity problems in the flasks as could be observed in the column reactor. An increase in the moisture content provoked a decreased porosity and lowered oxygen diffusion, leading to surface mycelium formation, as it was already reported by other authors (Pandey, 1991 and Brand et al., 2001).

A low airflow (10 to 30mL/min) seemed to be inefficient for the fungi culture to degrade caffeine and tannins (Brand *et al.*, 2001). One possible reason for not achieving the expected higher efficiency of caffeine degradation is the inner column temperature, which cannot be finely adjusted. The temperature of the fermentation usually easily rises as function of the metabolic activity of the microorganisms. The Table 8 describes the results of caffeine and tannin degradation with 0.5 and 0.67 mL.g of substrate⁻¹ min⁻¹, tested in packed bed bioreactor.

Table 8: Caffeine and tannin degradation with 0.5 and 0.67 mL. (g of substrate.min)⁻¹.

Aeration rate	% Caffeine reduction	% Tannin Reduction
0.5 mL (g of substrate. min) ⁻¹	44	15
0.67 mL (g of substrate. min) ⁻¹	48	26

In order to describe the optimum conditions for detoxification in packed bed column bioreactor, a central composite design with five levels was performed and the analysis was based on the surface response. Aeration rate between 0.7 and 1.63 mL(g of substrate.min)⁻¹

and initial moisture between 53 and 67% were investigated in this design. The experimental results were fitted in a second-order model:

$$\% \text{ Caffeine Reduction} = 57.06 - 0.55 A - 2.72 A^2 + 3.72 M - 2.92 M^2 - 2.16 A M \quad (1)$$

$$\% \text{ Tannin Reduction} = 64.5 - 3.31 A - 6.69 A^2 + 6.04 M - 5.18 M^2 - 4.25 A M \quad (1)$$

Where: A = Aeration rate

M = Moisture

The results obtained for caffeine and tannins degradation were examined by analysis of variance. Tables 9 and 10 show the ANOVA for the full quadratic model. The regression is more significant than the deviation in the studied region, therefore, the quadratic model is adequate and presented good correlation coefficients for bioprocess analysis, 0.8 for both cases. The F test obtained in this analysis was compared with the listed F. The quadratic model may not predict the toxic compounds degradation because the F_{calc} (see Table 9 and 10) should be four times higher than F_{listed} . Nevertheless, the response surface and contour curve is an interesting tool to understand how such parameters may affect this solid-state fermentation process.

Table 9: ANOVA for the full quadratic model plus 3 central points for caffeine degradation

F_{listed} values are significant at a 90% confidence level; Regression coefficient (R) = 0.82; $F_{\text{calc}} (MQ_{\text{LF}}/MQ_{\text{PE}}) \cong F_{\text{listed}}$; $F_{\text{calc}} (MQ_{\text{R}}/MQ_{\text{r}}) > 1.34\text{-fold } F_{\text{listed}}$;					
Source of Variation	Sum of Squares	Degrees of freedom	Mean quadratic	F test	
				F_{calc}	F_{listed}
Regression (R)	185.77	5	37.16	4.61	3.45 ($F_{0.90; 5, 5}$)
Residual (r)	40.27	5	8.054		
Lack of fit (LF)	37.75	3	12.58	9.98	9.16 ($F_{0.90; 3, 2}$)
Pure error (PE)	2.52	2	1.26		
Total variation	226.04	10	-		

Table 10: ANOVA for the full quadratic model plus 3 central points for tannin degradation

F_{listed} values are significant at a 90% confidence level; Regression coefficient (R) = 0.81;
 $F_{\text{calc}} (MQ_{\text{LF}}/MQ_{\text{PE}}) < F_{\text{listed}}$; $F_{\text{calc}} (MQ_{\text{R}}/MQ_{\text{T}}) > 1.2\text{-fold } F_{\text{listed}}$;

Source of Variation	Sum of Squares	Degrees of freedom	Mean quadratic	F test	
				F_{calc}	F_{listed}
Regression (R)	686.39	5	137.29	4.15	3.45 ($F_{0.90; 5, 5}$)
Residual (r)	165.31	5	33.06		
Lack of fit (LF)	152.81	3	50.93	8.15	9.16 ($F_{0.90; 3, 2}$)
Pure error (PE)	12.5	2	6.25		
Total variation	851.7	10	-		

It's possible to generate surfaces that represent the influence of variables, airflow and initial moisture, on the responses, by using these models. Figures 5 and 6 show the results of caffeine and tannin degradation respectively.

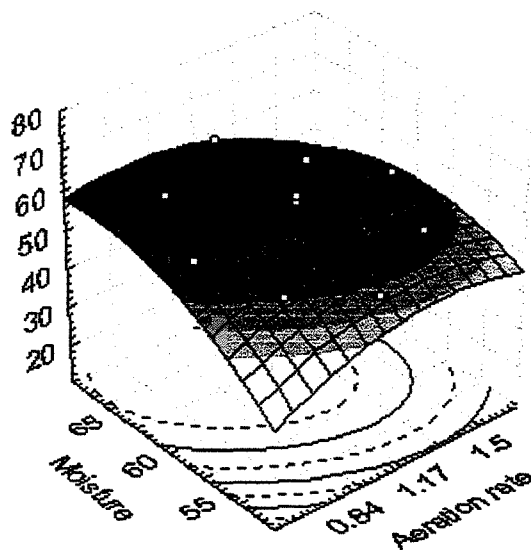


Figure 5. Response surface for caffeine degradation:
Effect of initial moisture and aeration rate

It was observed that the optimal region was reached for both surfaces. The best

range for caffeine and tannin degradation was 60 to 67% initial moisture and 0.83 to 1.3 mL(g of substrate.min)⁻¹ of aeration rate. When the fermentation process ended (7 days), the coffee husk contained 2.4 mg of caffeine/g d.m. and 7 mg of tannin/g d.m.

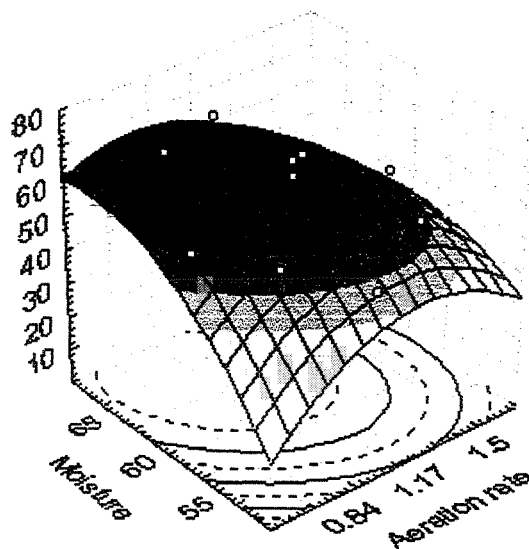


Figure 6. Response surface for tannin degradation:
Effect of initial moisture and aeration rate

4. CONCLUSION

Statistical methods showed to be a useful tool for optimization of solid fermentation process. The initial moisture was the most important parameter for caffeine and tannin degradation by solid-state fermentation in Erlenmeyer flasks and the best detoxification levels by *Rhizopus delemar*, 86% of caffeine and 58% of tannin reduction, were achieved with 75% moisture, 10⁶ spores/g substrate, 28°C and pH 6,5.

Sixty percent of caffeine and tannin degradation was achieved in packed bed column bioreactor with 60 to 67% initial moisture and 0.83 to 1.3 mL(g of substrate.min)⁻¹

of aeration rate.

These degradation levels are similar to that observed by other researchers with *Aspergillus*, the more frequent caffeine-degrading genera for fungi, with the advantage that the *Rhizopus* is a GRAS microorganism.

The results showed that *Rhizopus delemar* LPB 12 is able to degrade caffeine and tannin from coffee husk by solid-state fermentation and the application of these detoxified agro-industrial residues in one hand may provide an alternative substrate in bioprocesses or a new supplement for animal feed, and on the other hand help in solving pollution problems.

5. ACKNOWLEDGMENTS

FAPESP, Brazil (project N° 99/09031-7).

6. REFERENCES

1. Association of Official Analytical Chemistry (1965), Official methods of analysis of the A.O.A.C., Washington, USA 10th ed.
2. Barros Neto, B., Bruns, R.E., Scarminio, I.S. (1995), Planejamento e Otimização de Experimentos. Editora da Unicamp, Campinas-SP.
3. Brand, D.; Pandey, A.; Roussos, S., Soccol, C.R. (2000), Enzyme and Microbial Technology, 27, 127-133.
4. Brand, D.; Pandey, A.;Rodrigues-Leon, J; Roussos, S., Drand, I.; Soccol, C.R. (2001), Packed Bed Column Fermenter and Kinetic Modeling for Upgrading the nutritional Quality of Coffee Husk in Solid State Fermentation. Biotechnology Progress, 17, 1065-1070.
5. Cabezas, M.T., Flores, A., Egana, J. E., 1979, Uso de la Pulpa de Café en Alimentación De Ruminantes, In: Braham J. E., Bressani, R., Coffee Pulp:

- Composition, Technology and Utilization, Ottawa, Development Research Centre, 83-88.
6. Cannas, A. Tannins. In: Cannas, A. Animal Science. Cornell: Cornell University, 1999. Home Page: [Http:// Wwww.Cornelluniversity/Animalscience.Us](http://www.Cornelluniversity/Animalscience.Us).
7. Denis, S. (1996), PhD thesis, Montpellier II University, France.
8. DIN (1994), analysis of coffee and coffee products: Determination of caffeine content: HPLC rapid method, DIN 10777-2, Berlin.
9. Fan, L.; Pandey, A.; Soccol, C. R., (1999), Proceedings of the 3rd International Seminar on Biotechnology in the Coffee agro-industry, Londrina, Brazil, p.51.
10. Fan, L.; Pandey, A.; Soccol, C. R., (2000), J. Basic Microbiol. 40 (3), 177-187.
11. Haaland, P. D. (1989), Experimental Design in Biotechnology. New York: Ed. Marcel Dekker.
12. Hakil, M., Voisinet, F., Viniegra-gonzales, G. and Augur, C. (1999), *Process Biochemistry* 35 (1), 103-109.
13. Kurtzman, R. H., Shwimmer, S. (1971), Caffeine removal from growth media by microorganisms. *Experientia*, 127, 481-482.
14. Lekha, P. K.; Lonsane, B. K. (1997), Production and Application of Tannin Acyl Hydrolase: State of the Art. *Advances in Applied Microbiology*, 44, 215-260.
15. Mazzafera P, 2002, Degradation of caffeine by microorganisms and potential use of decaffeinated coffee husk and pulp in animal feeding, *Scientia Agricola*, 59(4), 815-821.
16. Medeiros, A. B. P.; Pandey, A.; Freitas, R. J. S.; Christen, P.; Soccol, C. R. (2000), *Biochem. Eng. J.* 6(1), 33-39.
17. Menezes, H. C., Samann, F. S., Clifford, M. N., Adams, M. R., (1994) The fermentation of fresh coffee pulp for use in animal feed. *Proceedings of Colloque International sur la Chimie du Café e du Cacao*, Montpellier, 1993, p. 52-61.
18. Pandey, A.; Selvakumar, P.; Soccol, C.R.; Nigam, P. (1999), *Current Sci.* 77, 149-162.
19. Pandey A., Soccol C. R., Nigam P., Brand D., Mohan R. and Roussos S., (2000),

- Review: Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocess, *Biochemical Engineering Journal*, 6, 153-162.
20. Pandey, A.; Soccol, C.; Rodrigues-Leon, J.; Nigam, P. (2001), *Solid State Fermentation in Biotechnology. Fundamentals and Applications*, New Delhi, 221p.
 21. Penaloza, W.; Molina, M. R.; Brenes, R. G.; Bressani, R. (1985), *Solid-State Fermentation: an Alternative to Improve the nutritive Value of Coffee Pulp*, *Applied and Environmental Microbiology*, 49 (2), 388-393.
 22. Raimbault, M.; Alazard, D. (1980), *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 9, 199-209.
 23. Roussos, S.; Hannibal, L.; Aquiahuatl, M. A.; Trejo Hernandez, M. R.; Marakis, S.: J. (1994), *Food Sci. Technol.* 31, 316-319.
 24. Roussos, S., Aquiahuatl, M.A., Trejo-Hernandes, M.R., Gaime-Perraud, I., Favela, E., Ramakrishna, M., Viniegra-Gonzales, G., 1995, *Biotechnological Management Of Coffee Pulp: Isolation, Screening, Characterization, Selection Of Caffeine-Degrading Fungi And Natural Microflora Present In Coffee Pulp And Husk*, *Applied Microbiology And Biotechnology*, 42(5), 756-762.
 25. Shwimmer, S. & Kurtzman, R.H., (1972), *J. Food Sci.*, 37, 921-924.
 26. Soccol, C. R.; Machado, C. M. M.; Olivera, B. H. Brazilian Patent 000187, 24 February (2000), DEINPI/PR, Brazil.
 27. Soccol, C.R. & Vanderberghe, L.P.S. (2003), *Overview of applied solid-state fermentation in Brazil*, *Biochemical Engineering Journal*, 13, 205-218.
 28. Stertz, S.C., Soccol, C.R., Raimbault, M., Pandey, A. & Rodriguez-Léon, J. (1999), *Growth kinetics of Rhizopus formosa MUCL 28422 on raw cassava flour in solid state fermentation. J. Chem. Technol. Biotechnol.* 74, 1-7.
 29. Tagliari, C.V., Sanson, R.K., Paca, J. Franco, T.T., Soccol, C.R. (2002), *Biological detoxification of coffee husk by Rhizopus sp. by solid state fermentation using a column bioreactor. 15th International Congress of Chemical and Process Engineering. Praga, República Tcheca.*

5. RESULTADOS: ARTIGO 2

RELAÇÃO ENTRE CINÉTICA DE CRESCIMENTO, PRODUÇÃO DE ENZIMAS E DEGRADAÇÃO DE METHYLYXANTINAS POR *RHIZOPUS DELEMAR* EM FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO

A análise cinética é um procedimento que descreve o desenvolvimento do processo, sua importância é devido à possibilidade de calcular parâmetros que podem ser usados tanto na interpretação como para o escalonamento do mesmo. O segundo artigo envolve o estudo cinético do processo, abrangendo o monitoramento do crescimento microbiano através da respiração, o acompanhamento da degradação da cafeína e das metilxantinas, a produção das enzimas envolvidas nas primeiras etapas da via metabólica e a estimativa dos parâmetros cinéticos.

RELATION BETWEEN GROWTH KINETICS, ENZYMES PRODUCTION AND METHYLYXANTHINES DEGRADATION BY *RHIZOPUS DELEMAR* IN SOLID-STATE FERMENTATION

Keywords: Coffee husk, caffeine, theophylline, demethylases, respiratory metabolism, packed bed column bioreactor, filamentous fungi.

ABSTRACT

Kinetics studies were carried out in solid-state fermentation (SSF) using coffee husk as substrate for evaluation of the metabolism of caffeine degradation by *Rhizopus delemar*. The main purpose of this study was to verify the relationship between microbial growth and enzyme production during the detoxification process. The experiments were conducted in glass flasks and in packed bed column bioreactor with the optimized conditions in previous experiments, pH 6.5 and 28°C. The exhausted air from the column bioreactor was coupled with a gas chromatography to estimate the respiratory metabolism and the fungal biomass. The kinetic study showed that the development of filamentous fungi and its respiration was related to caffeine degradation and total sugars presents in coffee husk. The exponential phase of microbial growth was achieved between 3 and 5 days, when was detected maximal O₂ consumption and CO₂ production; after the maximum production of enzymes and consequently caffeine degradation. The specific growth velocity in this phase ($\mu_{\max}$) was 0.012h⁻¹ and the biomass yield based on oxygen consumption ($Y_{x/o}$) was 0.35g of biomass/g of consumed O₂. Maximum production of both enzymes in packed bed column bioreactor, 2.1 U/g of dry substrate for theophylline demethylase and 0.9 U/g of dry substrate for caffeine demethylase were achieved at 3 days of fermentation.

1. INTRODUCTION

The caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) is an alkaloid found in more than 60 plant species. Caffeine is present with significant levels in coffee, tea, cocoa and Cola genera (Suzuki *et al.*, 1992). The pharmacological effects of caffeine are well known: stimulation of central nervous system, toxicity when fed excessively, and mutagenicity on microorganisms (Denis, 1996).

Caffeine is considered as toxic for many microorganisms; however, some microorganisms have the ability to grow in the presence of caffeine and the capacity to degrade the alkaloid. Several studies were carried out to investigate the use of caffeine, as a source of energy for microorganism growth (Mazzafera, 1994). *Penicillium* and *Aspergillus* is the more frequent caffeine-degrading genera for fungi and *Pseudomonas* for bacteria (Hakil, 1999 and Asano *et al.* 1993).

Kurtzman & Shwimmer (1971), Penaloza *et al.* (1985), Roussos *et al.* (1994), Brand *et al.* (2000) reported that the total caffeine contained in a liquid medium or in coffee byproducts can be degraded by filamentous fungi. However, in all studies involving caffeine degradation by solid-state fermentation in coffee pulp or husk, no particular attention was given to its degradation products neither for the enzymes involved in this process.

The first steps of caffeine degradation pathway by filamentous fungi consist of demethylation reactions (Ina, 1971; Denis *et al.*, 1998 and Hakil *et al.*, 1998). Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) is first demethylated in position 7, this led to the formation of theophylline (1,3-dimethylxanthine). This compound was next demethylated in position 1 to give 3-methylxanthine and than xanthine (Fig. 1).

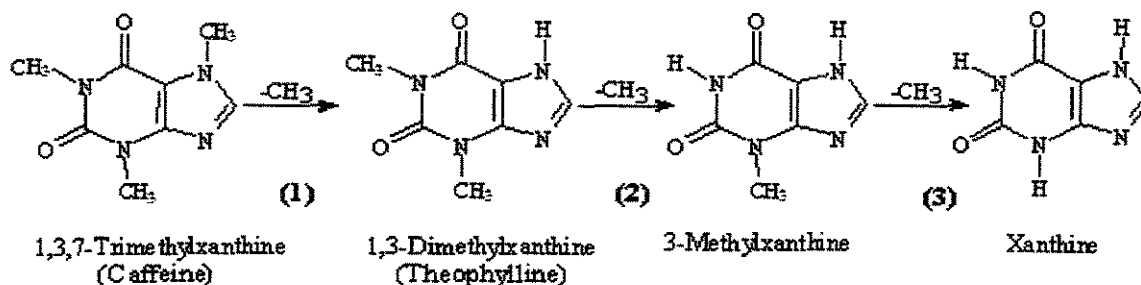


Figure 1. First steps in the degradation pathway of caffeine by filamentous fungi.

Although structurally very similar to caffeine, theophylline have different physiological effects and, therefore, pharmaceutical applications. Theophylline, the major degradation product of caffeine by filamentous fungi, is used as a bronchial dilator and to treat apnea (Mingoia, 1967).

The toxicity of theophylline, in cardio-vascular and gastrointestinal system is similar to caffeine and for utilization of the fermented coffee residue as animal feed, the presence of theophylline would be as undesirable as the presence of caffeine (Hakil *et al.*, 1999).

Thus, the purpose of this work was to investigate the caffeine degradation pathway by *Rhizopus delemar* and to compare with kinetics growth and enzymes production during the solid-state fermentation in coffee husk.

The impossibility of biomass separation from substrate and the heterogeneous characteristics of SSF process are the main difficulties found when kinetics accomplishment is attained. Automatic on-line analysis of CO₂ and O₂ in the exit gases from SSF reactors allows real time information on the physiological state of the cultures to be obtained and a correlation with biomass to be established (Pandey *et al.*, 2001). For this study of growth kinetic, the SSF was employed in a packed bed column bioreactor connected to a gas chromatography, to make the exit gas analysis.

2. MATERIAL AND METHODS

Microorganism and Substrate

Rhizopus delemar LPB 12 was maintained on coffee husk extract agar medium (CHEA) at 4°C for up to four months. This medium was prepared by cooking 100g of coffee husk in one liter of distilled water for 50 min. This extract (CHE) was supplemented with 20g of agar and sterilized at 121°C for 20 minutes. Spores suspension was prepared after 10 days of culture on CHEA medium at 32°C. The spores were collected, and transferred to 150 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of water and drops of Tween 80 and counted in a Neubauer cell. It was obtained 10⁷ spores.mL⁻¹ of suspension.

Coffee husk used as substrate was obtained from Cooperativa de Cafeicultores e Agropecuaristas de Maringá – LTDA (COCAMAR), Parana, Brazil. Coffee husk was dried in air oven up to 10% moisture, milled and sieved to obtain fractions between 0.4 and 2.0 mm particle size. The substrate contained 7% proteins, 64% fibers, 2% fats, 10% minerals, 9% total sugars, 0.6% caffeine and 2% tannins.

Solid-State Fermentation (SSF)

The first kinetic study was carried out in glass flasks containing 20g of the substrate (dry weight basis) using previous optimized conditions (Tagliari *et al.*, 2002): pH 6.5, initial moisture 75%, inoculum concentration 1×10^6 spores/g of substrate and temperature 28°C. Every 24 h samples were collected for evaluation of degradation of methylxanthines, as well as pH, water activity, moisture and enzymatic activities.

The other experiment was carried out in packed bed bioreactor (Fig.2) with forced aeration and 14 glass columns, immersed in a water bath with controlled temperature at 28°C, as described by Raimbault & Alazard (1980).

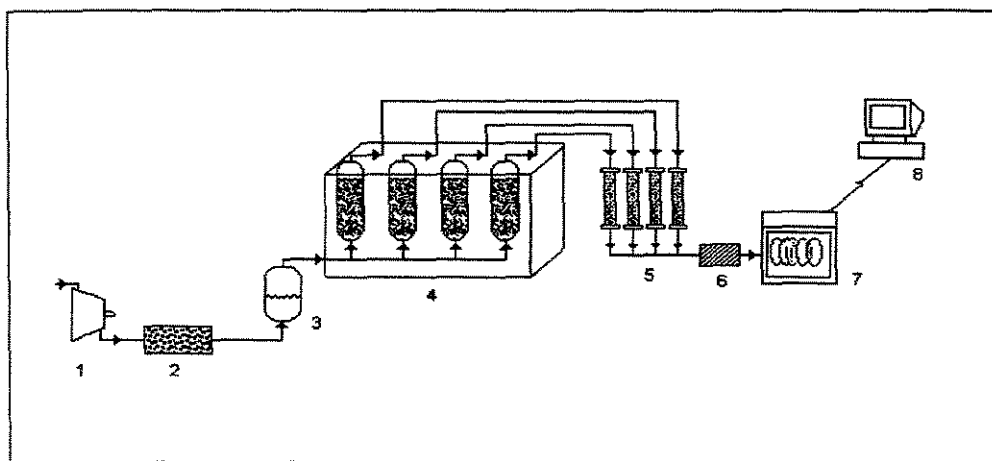


Figure 2. Packed bed column bioreactor. 1) Compressor, 2) air filter, 3) air saturation, 4) temperature control bath, 5) silica column, 6) distributor valve, 7) GC, 8) computer.

Pre-inoculated substrate with 10^6 spores/g, pH and moisture adjusted to 6.5 and 65% respectively, was packed into the columns. The airflow was set at $60 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. On-

line gas monitoring system measured the gas composition of the outlet air stream from three columns. Every 24 h a column was taken out of the system for pH, water activity, moisture, methylxanthines degradation, total sugars, protein and enzymatic activities analysis.

The results presented are the average of duplicates.

Growth Estimation

The respiratory metabolism of the microorganism was evaluated by determining the O₂ consumption and CO₂ production. This indirect method was used to estimate the biomass biosynthesis by the fungal culture (Brand *et al.*, 2001). The saturated air from the bioreactors was passed through silica gel column and then analyzed by gas chromatography in order to determine the oxygen uptake rate (OUR) and the CO₂ formed during the process.

The Equation (1) allows to estimate the biomass at a determined time if the preceding values of biomass are known and the yield based on oxygen consumption and biomass maintenance coefficient are considered constant during the period evaluated (Pandey *et al.*, 2001). Six points of biomass were analytically determined at 0, 48, 72, 120, 168 and 240 h of fermentation and considered. The estimated biomass can be determined by successive interactions and the FERSOL software (Rodriguez-León *et al.*, 1988) was used in the calculations.

$$X_n = \left\langle Y_{X/O} \Delta t \left\{ \frac{1}{2} \left[\left(\frac{dO_2}{dt} \right)_{t=0} + \left(\frac{dO_2}{dt} \right)_{t=n} \right] + \sum_{i=1}^{i=n-1} \left(\frac{dO_2}{dt} \right)_{t=i} \right\} + \left(1 - \frac{a}{2} \right) X_0 - a \sum_{i=1}^{i=n-1} X_i \right\rangle / \left(1 + \frac{a}{2} \right) \quad (1)$$

Where:

$$a = m_X Y_{X/O} \Delta t$$

Analytical Methods

Methylxanthines were extracted from fermented husk by mechanical agitation with hot water (1:250, w/v) and filtered in a vacuum system. The supernatant recovered after centrifugation by 10min at 12000g was filtered in 0.22µm Millipore membrane and

analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). The analyses were performed on a Varian system with photodiode array detector (PDA) and Microsorb C18 column (4,6 x 250 mm). The mobile phase was methanol and water (24:76, v/v) with a flow rate of 1mL/min, by an isocratic system. In these conditions, the retention times were 3.9, 5.7 and 7.8 for 3-methylxanthine, theophylline and caffeine respectively.

Moisture content was determined by gravimetric method.

Water activity was measured by Aqualab equipment.

The pH was measured by potentiometric method after dilution of 2g of material in 20mL of water.

Proteic nitrogen was precipitated by Stutzer method (Vervack, 1973) followed by Kejedahl determination; assuming that protein content was equal to 6.25 times the N content (IAL, 1985).

Total sugars (after hydrolysis with H_2SO_4) were determined by a spectrophotometric method (Nelson, 1944; Somogyi, 1945).

Biomass analytical determination was made by subtracting the quantity of protein in a certain time of the initial quantity of protein present in the substrate. Biomass was calculated as twice the protein, assuming that 50% of fungal biomass is protein (Stertz *et al.*, 1999).

Enzyme Assay

The enzymatic extract was obtained by adding 20mL of NaCl (1%) to each 1g of fermented and grinded substrate (Tagliari *et al.*, 2003). This mixture was submitted to mechanical agitation with blade homogenizer for 15 minutes and then filtered in a vacuum system.

The demethylases were quantified by substrate reduction (caffeine 0.1mM or theophylline 0.2mM) in the linear region of time-course profile, based on the procedure described by Hakil (1999). The enzymatic reaction carried out in Eppendorf tubes containing 100 μ L of respective substrate, 400 μ L of phosphate buffer (50mM) and 500 μ L of enzymatic extract. The reaction was interrupted by trichloroacetic acid (50%) after 15 min of incubation and the supernatant recovered after centrifugation by 10min at 12000g

was filtered in 0.22µm Millipore membrane and analyzed by high performance liquid chromatography. One unit of enzyme activity (U) was defined as the quantity of enzyme required to degrade 1 µmol of substrate per minute at 30°C and pH 7.4. The standard error of enzyme assay was achieved by difference between 8 experiments.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Methylxanthines Degradation and Enzymes Production in Erlenmeyer Flasks

The evolution of the methylxanthines quantified to more than 0.01% of dry material (0.1mg/g dry fermented substrate), is shown in Figure 3. The main caffeine degradation products identified in the samples were the 1,3-dimethylxanthine (theophylline) and the 3-methylxanthine, which appeared due to successive demethylation steps. Caffeine was first demethylated in position 7 giving theophylline followed by a 1-demethylation leading to 3-methylxanthine from theophylline. However, others methylxanthines were also detected by HPLC method, 1-methylxanthine and 7-methylxanthine were found smaller than 0.006% of dry sample.

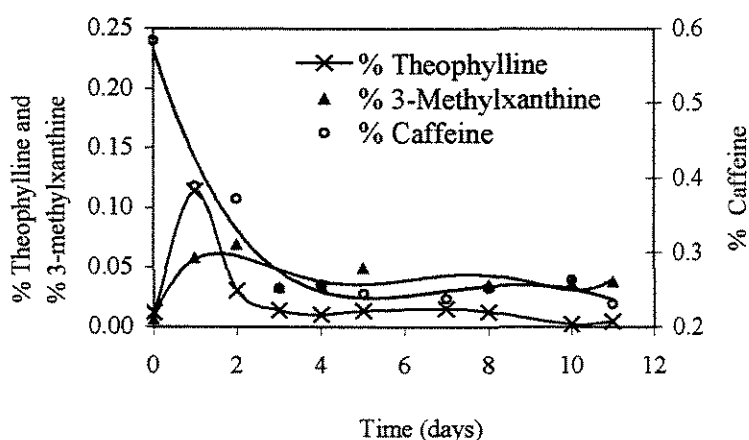


Figure 3. Methylxanthines degradation by *Rhizopus delemar* in coffee husk during SSF in Erlenmeyer flasks

The evolution of enzymes activities during caffeine and theophylline degradation by *Rhizopus* in coffee husk is shown in Figure 4. In the second day of fermentation in

Erlenmeyer flasks was achieved the maximum production of theophylline demethylase, 3.3 ± 0.017 U/g of dry substrate, when all theophylline was consumed and the maximum of 3-methylxanthine was produced. For caffeine demethylase, the higher enzymatic activity was found when all caffeine was consumed too (3 days), 1.8 ± 0.022 U/g of dry substrate. Thus, it's possible that the time necessary for maximum production of enzymes was influenced by initial caffeine concentration.

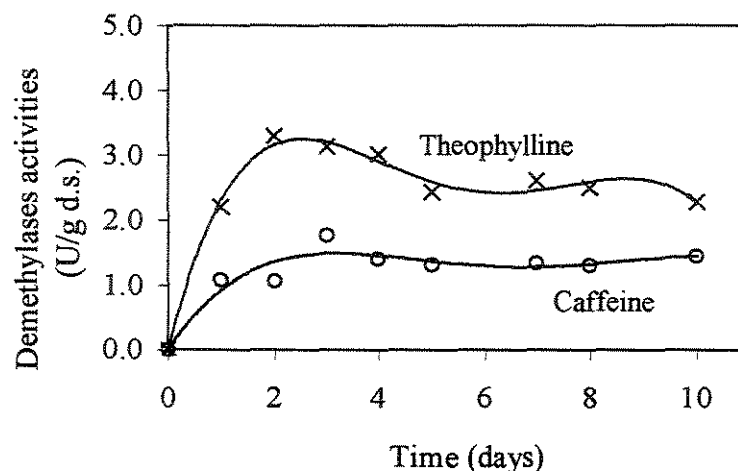


Figure 4. Activities profiles during caffeine and theophylline degradation by *Rhizopus delemar* in Erlenmeyer flasks (U/g dry substrate)

Kinetics of Solid-State Fermentation Process

The importance of kinetic resides in the fact that these studies imply the determination of significant parameters such as: specific growth rate, process yield, process productivity, process control criteria, and scale-up considerations (Pandey *et al.*, 2001).

The main kinetic pattern that is observed in a biochemical process is the biomass synthesis along the time. Unfortunately, the direct methods used in submerged fermentation cannot be applied in a solid-state fermentation process due to the fact that biomass is partially or completely attached at the solid surface. Considering this fact several methods have been developed for indirect biomass determination. O_2 consumption and/or CO_2 evolved during the process are linearly related with biomass synthesis in an anaerobic system (Pandey *et al.*, 2001).

a) Respiratory Metabolism Analysis

A mass balance was carried out for the estimation of oxygen uptake rate (OUR) and CO₂ evolved in terms of volumetric flow. If outlet airflow (F_{out}) is known (3.6 L/h) and the inlet airflow is F_{in}, the following equations were considered:

$$V_{O_2out} = \left(\frac{\%O_{2out}}{100} \right) \times F_{out} \quad (2)$$

$$V_{CO_2out} = \left(\frac{\%CO_{2out}}{100} \right) \times F_{out} \quad (3)$$

$$F_{out} = V_{O_2out} + V_{CO_2out} + V_{N_2out} \quad (4)$$

$$V_{N_2out} = \left(\frac{100 - \%O_{2out} - \%CO_{2out}}{100} \right) \times F_{out} \quad (5)$$

Considering the air composition (79% N₂ and 21% O₂), it can be written:

$$V_{N_2in} = \frac{79}{100} \times F_{in} \quad (6)$$

$$V_{N_2in} = V_{N_2out} \quad (7)$$

Then, the equation (7) relates the inlet and the outlet airflow:

$$F_{in} = \frac{(100 - \%O_{2out} - \%CO_{2out}) \times F_{out}}{79} \quad (8)$$

The mass balance for oxygen is given in order to evaluate the volumetric flow of O₂ uptake rate:

$$V_{O_2uptake} = \left(\frac{21}{100} \right) \times F_{in} - \left(\frac{\%O_{2out}}{100} \right) \times F_{out} \quad (9)$$

For the estimation of OUR and CO₂ evolved in mass flow units (mmol/h), it was considered that the air was an ideal gas and the proper corrections for temperature conditions considering a temperature value of 28°C were taken into account.

Figure 5 shows the evolution of the OUR and CO₂ evolved during solid-state fermentation of coffee husk by *Rhizopus* sp. Maximal CO₂ production and the oxygen uptake rate was observed between 80 and 110 hours of fermentation. The respiration quotient (RQ) is defined as CO₂_{prod} / O₂_{cons}. The RQ was constant during all the fermentation, characteristic of an aerobic process with constants maintenance coefficient

(m) and yield based on oxygen consumption ($Y_{x/o}$). The higher value of O_2 consumption related to CO_2 production can be explained due the O_2 consumption during oxidases reactions in the metabolic pathway of caffeine degradation.

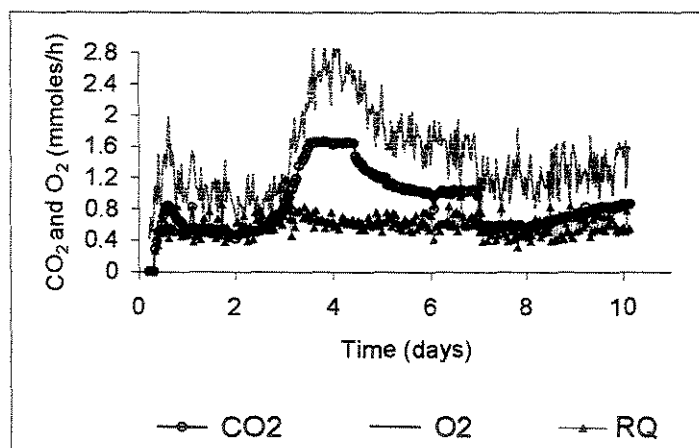


Figure 5. Kinetic pattern of the OUR, CO_2 and RQ during the solid solid-state fermentation of coffee husk by *Rhizopus delemar*

b) Kinetics Parameters Estimation

The variables used to establish the fermentative process kinetics were O_2 consumed, biomass synthesis, substrate consumed (total sugars) and enzymes production (Table 1).

The Figure 6 shows the microorganism growth obtained with experimental data and estimated biomass. The two growth patterns were similar, having the same *exponential growth phase* (72 to 120 h).

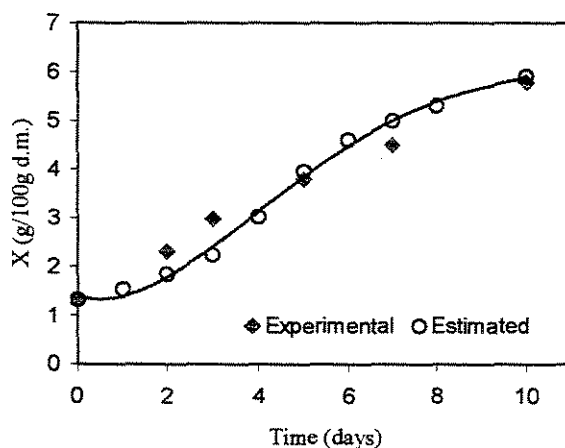


Figure 6. Experimental and estimated biomass evolution during SSF in coffee husk

Table 1: Experimental results and parameters estimation during SSF in coffee husk

Time (h)	X g/g d.m.	S g/g d.m.	P (CD) U/g d.m.	P (TD) U/g d.m.	μ (h ⁻¹)	OUR mmol/h	r_s mg / (g d.m. h)	$r_{p(CD)}$ U / (g d.m. h)	$r_{p(TD)}$ U / (g d.m. h)
0	0.0132	0.0730	0.0526	0.1316	-	0.4340	-	-	-
24	0.0153	0.0510	0.0838	1.1842	0.0061	0.8030	0.9322	0.0035	0.0493
48	0.0184	0.0370	0.3129	2.1148	0.0077	1.1400	0.5835	0.0065	0.0441
72	0.0223	0.0310	0.8954	2.2076	0.0081	1.4020	0.2244	0.0124	0.0307
96	0.0301	0.0280	0.7368	1.7579	0.0124	2.0700	0.1212	0.0077	0.0183
120	0.0395	0.0270	-	-	0.0114	2.4700	0.0673	-	-
144	0.0460	0.0250	0.8985	1.5815	0.0062	1.6700	0.0713	0.0062	0.0110
168	0.0500	0.0230	0.8475	1.4645	0.0035	1.3300	0.0812	0.0056	0.0087
192	0.0530	0.0210	0.7368	1.6594	0.0024	1.2900	0.0942	0.0038	0.0086
240	0.0591	0.0200	0.8136	1.5620	0.0023	1.0830	0.0179	0.0034	0.0065

Where: X – biomass; S – substrate; P – product; CD – Caffeine Demethylase; TD – Theophylline Demethylase; μ – specific growth rate; OUR – oxygen uptake rate; r_s – rate of substrate consumption; r_p – rate of enzymes production.

Specific growth rate (μ) is defined as:

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (10)$$

The specific growth rate at the logarithmic or exponential phase is a constant, so:

$$\int_{X_0}^X \frac{dX}{X} = \mu \int_0^t dt \quad (11)$$

Where X is the biomass (g/g d.m) at time t (h). The specific growth rate in the exponential phase was calculated by a regression of $\ln(X)$ vs t . The value obtained was $0.012h^{-1}$ with a regression coefficient of 0.994, considering the values between 3 and 5 days.

The time interval required to double the population (58 h) was deduced from the integrated form of Equation (11):

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (12)$$

The oxygen balance during microbial growth is given considering the oxygen consumed for growth and maintenance (Sato *et al.*, 1983):

$$Q_{O_2} = \frac{1}{Y_{X/O}} \mu + m \quad (13)$$

Where:

Q_{O_2} : Specific rate of oxygen consumption (gO₂/(g biomass.h)

$Y_{X/O}$: yield based on consumed O₂ for biomass synthesis

μ : Specific growth rate (h⁻¹)

m_x : maintenance coefficient

The yield based on oxygen consumption ($Y_{X/O}$) and biomass maintenance coefficient (m_x) was calculated by a regression of Q_{O_2} vs μ_x . It was obtained 0.35g of biomass/g of consumed O₂ for $Y_{X/O}$ and 0.013g of consumed O₂/(g of biomass.h) for m_x , similar result was achieved for *Rhizopus formosa* 28422 in cassava flour (Stertz *et al.*, 1999). The value of $Y_{X/O}$ seems to be relatively low; this could be due to the characteristics of the complex substrate, coffee husk.

Other parameter related to the specific growth rate is the yield based on substrate consumption ($Y_{X/S}$) and is defined as:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dX}{dt} \quad \text{or} \quad -\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{X/S}} \mu X + m X \quad (14)$$

Where S is the substrate (g/g d.m) measured as total sugars. It was obtained 0.8g of biomass/g of substrate for $Y_{X/S}$ and 0.022g of substrate/(g of biomass.h) for m_x . The maximum biomass productivity for *Rhizopus* growth in coffee husk was 0.022g of biomass/(g d.m. h).

The Figures 7 and 8 shows the specific rates of substrate consumption, product formation and *Rhizopus delemar* growth during the solid-state fermentation in coffee husk. It was observed that the time for maximum value of specific growth rate and specific rate of

oxygen consumption are the same (100h) and was not found lag phase in both profiles. In 24h of fermentation was achieved the maximum specific rate of substrate consumption, $0.061\text{g of total sugars} \cdot (\text{g of biomass} \cdot \text{h})^{-1}$.

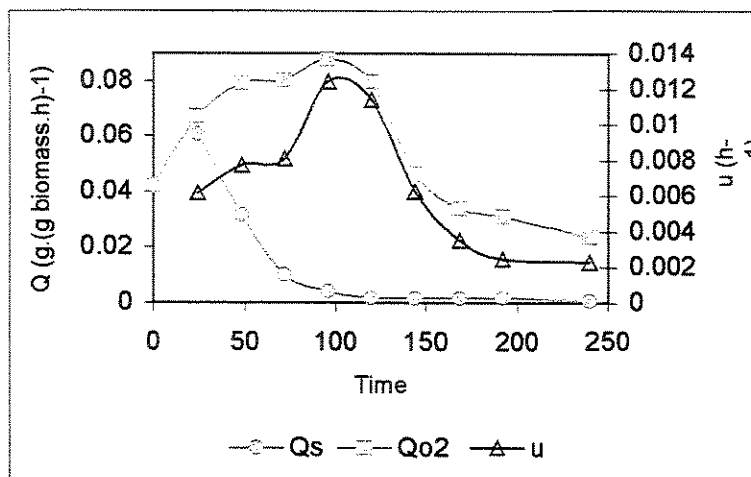


Figure 7. Specific rates of the batch growth of *Rhizopus* in coffee husk

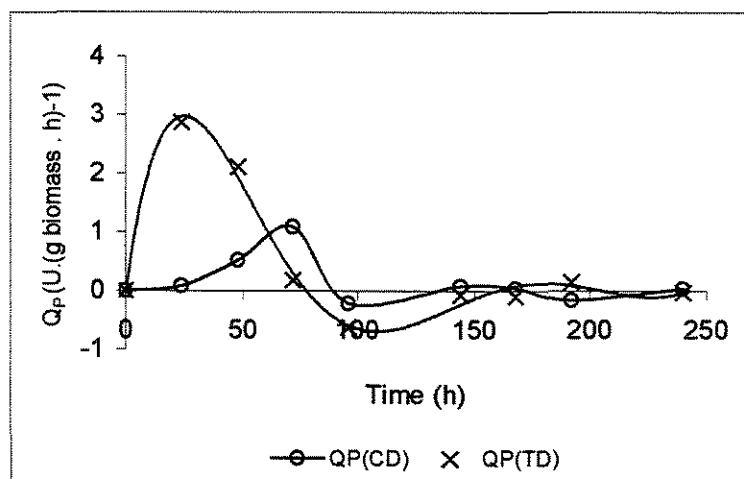


Figure 8. Specific rates of enzymes production during SSF in coffee husk

For enzymes production, it was observed that the specific rate of theophylline demethylase production was higher than specific rate for caffeine demethylase production, this result elucidate the reason why it was not observed accumulation of the theophylline in this fermentative process. The maximum rates of caffeine and theophylline demethylases production, 0.012 and 0.044 U/(g d.m. h), were obtained in 72 and 48h respectively. The

yield based on product formation ($Y_{P/X}$), defined as the amount of product formed per unit of biomass, was calculated by a regression of activity versus biomass. It was obtained 0.094 U/mg of biomass for caffeine demethylase and 0.22 U/mg of biomass for theophylline demethylase.

Methylxanthines and Enzymes Production in Column Bioreactor

For better evaluation of the degradation pathway of caffeine by *Rhizopus* sp. in coffee husk, factors as pH, moisture contents, water activity, total sugars consumption and biomass evolution were monitored (Figure 9). The water activity and the moisture content remained constants during the fermentation in column bioreactor. This can be explained due to saturated aeration made during the process, since in Erlenmeyer flasks without aeration, with the same substrate, the moisture decreases gradually. It was observed that the pH increased drastically from 6.0 to 8.5 after 3 days of fermentation, when the caffeine had already been degraded. Other researchers reported the urea as the final product of this metabolism in filamentous fungi too. The biomass synthesis by the mould appeared to be intimately related to the total sugar consumption as well as the caffeine degradation. The reduction of caffeine could also be related to its utilization of it as a nitrogen source by filamentous fungi, as previously described by Roussos *et al.*, (1994) and Brand *et al.*, (2001).

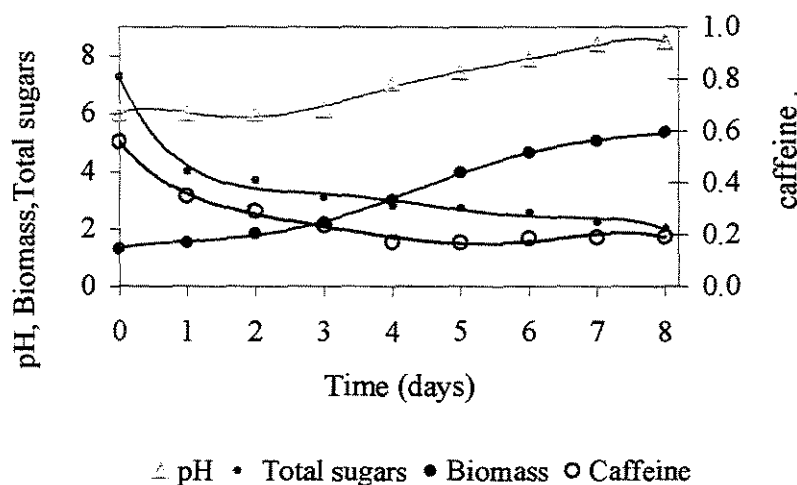


Figure 9. Biomass (g/100g d.m.), pH, total sugars (g/100g d.m.) and caffeine concentration (g/100g d.m.) during SSF in coffee husk

The main caffeine degradation products identified in the fermented from packed bed column bioreactor were the theophylline and the 3-methylxanthine (Figure 10). This result is similar to that observed in glass flasks and by Hakil (1999) and Ina (1971), who identified theophylline as the first product in the caffeine degradation pathway by other filamentous fungi.

After 4 days of fermentation, 65% of caffeine was reduced, resulting only 2mg of caffeine, 0.28mg of theophylline and 0.25mg of 3-methylxanthine by gram of dry material.

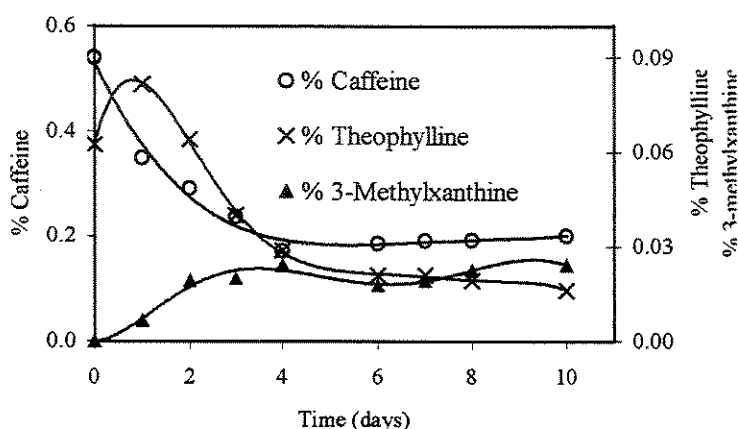


Figure 10. Methylxanthines degradation by *R. delemar* in coffee husk during SSF in column bioreactor

The enzymes activity profiles during caffeine and theophylline degradation by *Rhizopus* sp in packed bed column bioreactor is shown in Figure 11. Nor LAG phase was observed within enzymes production, nor during methylxanthines consumption, probably due to the microorganism previous adaptation to with the substrate. Maximum production of both enzymes, 2.1 U/g of dry substrate for theophylline demethylase and 0.9 U/g of dry substrate for caffeine demethylases were achieved at approximately 72 hours of fermentation. The higher activity for both enzymes was obtained when all substrate was consumed.

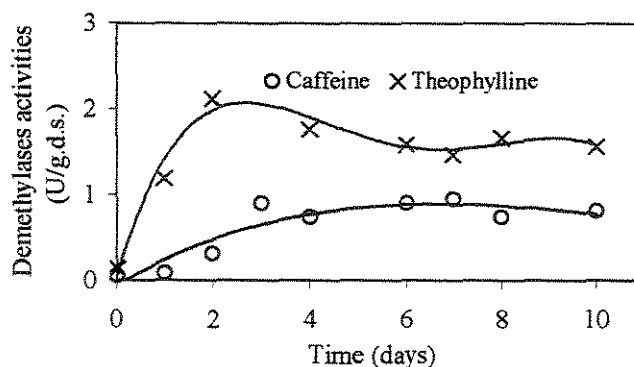


Figure 11. Evolution of enzymes activities during caffeine and theophylline degradation by filamentous fungi in packed bed column bioreactor (U/g dry substrate)

4. CONCLUSIONS

It is essential to understand how the process parameters act on fungal metabolism and the synthesis of some metabolites. When working in larger scales, a great number of factors can affect process behavior such as: oxygen and heat transfer, particle size, layer, type and shape of bioreactor. Experiments in packed bed column bioreactors with forced aeration have given the possibility to estimate the kinetics parameters such as CO_2 production and O_2 uptake, growth rate, process yield, which will be used for scale-up studies.

From the experiments of caffeine consumption metabolism, was concluded that the first steps of microbial degradation of caffeine consist of demethylation reactions. Although, the sequence of demethylation is different for human, bacteria and fungi, resulting in different degradation products. Differences in metabolic pathways of caffeine suggest that different enzymes might be involved in fungal, bacterial and mammalian metabolism of this alkaloid.

This work showed the feasibility of using the strain *Rhizopus delemar* LPB 12 for caffeine degradation and enzymes production in solid-state fermentation using coffee husk as substrate. This fermentation process can be used for theophylline production or for obtainment of decaffeinated products. These decaffeinated coffee residues can be used as feed supplement for animals or as substrate for bioconversion processes.

5. ACKNOWLEDGMENTS

FAPESP, Brazil (project N° 99/09031-7).

6. REFERENCES

1. Asano, Y.; Komeda, T.; Yamada, H. (1993), Microbial production of theobromine from caffeine. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57, 1286-1289.
2. Brand, D.; Pandey, A.; Roussos, S., Soccol, C.R. (2000), *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 127-133.
3. Brand, D.; Pandey, A.; Rodrigues-Leon, J.; Roussos, S., Drand, I.; Soccol, C.R. (2001), Packed Bed Column Fermenter and Kinetic Modeling for Upgrading the nutritional Quality of Coffee Husk in Solid State Fermentation. *Biotechnology Progress*, 17, 1065-1070.
4. Denis, S. (1996), PhD thesis, Montpellier II University, France.
5. Denis, S., Augur, C., Marin, B. and Roussos S. (1998), *Biotechnology Techniques* 12(5), 359-362.
6. Hakil, M., Denis, S., Viniegra-gonzales, G. and Augur, C. (1998), *Enzyme and Microbial Technology*, 22, 355-359.
7. Hakil, M. (1999), Dégénération de la Caféine par les Champignons Filamenteux, Purification et Caractérisation d'une Théophylline Déméthylase d'*Aspergillus tamarii*. Thèse de doctorat, Université de Franche-Comté.
8. Hakil, M., Voisinet, F., Viniegra-gonzales, G. and Augur, C. (1999), *Process Biochemistry* 35 (1), 103-109.
9. Ina, K. (1971), Biochemical studies of caffeine. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 45 (8), 378-380.
10. Instituto Adolfo Lutz (1985), Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.
11. Kurtzman, R. H., Shwimmer, S. (1971), Caffeine removal from growth media by microorganisms. *Experientia*, 127, 481-482.
12. Mazzafera, P. (1994), Review in *Scientia Agricola*, 59 (4), 815-821.

13. Mingoia Q, 1967, Excitantes do sistema nervoso central, in: Mingoia Q, Química farmacêutica, São Paulo, Melhoramentos, pp 222-227
14. Nelson, N. (1944), A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 153, 375-380.
15. Pandey, A.; Soccol, C.; Rodrigues-Leon, J.; Nigam, P. (2001), Solid State Fermentation in Biotechnology. Fundamentals and Applications. New Delhi, 221p.
16. Penaloza, W.; Molina, M. R.; Brenes, R. G.; Bressani, R. (1985), Solid-State Fermentation: an Alternative to Improve the nutritive Value of Coffee Pulp. *Applied and Environmental Microbiology*, 49 (2), 388-393.
17. Raimbault, M. Allazard, D. (1980), Culture method to study fungal growth in solid state fermentation. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 9, 199-209.
18. Rodriguez-León, J. A.; Sastre, L.; Echevarria, J.; Delgado, G.; Bechstedt, W. A (1988), Mathematical approach for the estimation of biomass production rate in solid state fermentation. *Acta Biotechnol.* 8, 307-310.
19. Roussos, S.; Hannibal, L.; Aquiahuatl, M. A.; Trejo Hernandez, M. R.; Marakis, S. (1994), *J. Food Sci. Technol.* 31, 316-319.
20. Sato, K.; Nagatani, M.; Nakamura, K.; Sato, S. (1983), Growth estimation of *Candida lipolytica* from oxygen uptake in a solid-state culture with forced aeration. *Journal of fermentation technology*, 61(6): 623-629.
21. Somogyi, M. (1945), A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.* 160, 61-68.
22. Stertz, S.C., Soccol, C.R., Raimbault, M., Pandey, A. & Rodriguez-Léon, J. (1999), Growth kinetics of *Rhizopus formosa* MUCL 28422 on raw cassava flour in solid state fermentation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 74, 1-7.
23. Suzuki, T.; Ashihara, H.; Waller, G.R. (1992), Purine and purine alkaloid metabolism in *Camellia* and *Coffea* plants. *Phytochemistry*, 31: 2575-2584.
24. Tagliari, C.V., Sanson, R.K., Paca, J. Franco, T.T., Soccol, C.R. (2002), Biological detoxification of coffee husk by *Rhizopus* sp. by solid state fermentation using a column bioreactor. 15th International Congress of Chemical and Process Engineering. Praga, República Tcheca.

25. Tagliari, C.V., Sanson, R.K., Zanette, A.; Pandey, A; Franco, T.T., Soccol, C.R. (2003), Comparison between enzymes production and toxic compounds degradation during solid state fermentation in coffee husk. International Conference on Emerging Frontiers at the Interface of Chemistry & Biology, Trivandrum, India, p. 66.
26. Vervack, W. (1973), Analyse des alimentes, méthodes courantes d'analyses. Louvain-la-Neuve: Laboratoire de Biochimie de la Nutrition.

6. RESULTADOS: ARTIGO 3

CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS CAFEÍNA E TEOFILINA DEMETILASES DE FUNGOS FILAMENTOSOS

No terceiro artigo as enzimas responsáveis pelas duas primeiras etapas de demetilação são extraídas e caracterizadas quanto à temperatura e pH ótimos, K_m , V_m e estabilidade frente à temperatura de armazenamento. A caracterização destas enzimas é de extrema importância para estudar a viabilidade da aplicação das mesmas em bioprocessos.

CHARACTERIZATION OF CAFFEINE AND THEOPHYLLINE DEMETHYLASES FROM FILAMENTOUS FUNGI

Keywords: Enzymes, kinetics, *Rhizopus*, stability, optimum temperature, pH, extraction.

ABSTRACT

New enzyme applications may lead to processes and products improvements. Enzymes involved in fungal decaffeination process of coffee husk have not been enoughly studied yet. The purpose of this work was to extract and characterize enzymes involved in caffeine and theophylline degradation by filamentous fungi in solid-state fermentation. The best extraction condition for caffeine and theophylline demethylase was observed with fermented and grinded substrate 1g/20ml of 1% NaCl, under mechanical agitation with blade homogenizer. Demethylases were quantified by substrate consumed in the linear region of time-course profile. The caffeine and the theophylline demethylases presented maximum activity in sodium phosphate buffer at about pH 6.5 and 7.4, respectively, and the optimum temperature was 30°C for both enzymes. The enzymatic extract was stable when stored at -2°C for 15 days. Enzyme kinetics parameters were determined using a steady-state approximation measuring initial rates of substrate concentration. Substrate inhibition was observed for caffeine demethylase. Calculated K_m values were 150µM for caffeine demethylase and 180µM for theophylline demethylase.

1. INTRODUCTION

Enzymes are extensively used in the food, pharmaceutical and chemical industries and also in analytical purposes (Blanch & Clark, 1997). Solid-state fermentation (SSF) holds great potential for the production of microbial enzymes. Type of strain, culture

conditions, substrate nature and nutrient availability are critical factors affecting yield and should be taken in consideration when selecting the enzyme production technique. Agro-industrial residues are generally considered as the best substrates for the SSF process and enzyme production by filamentous fungi (Pandey *et al.*, 2001).

Scientists have studied enzymes involved in caffeine and methylxanthines degradation by various microorganisms. Caffeine degradation pathway is different in bacterial (Ina, 1971 and Asano *et al.*, 1993) and fungal metabolism (Hakil *et al.*, 1998; Tagliari *et al.*, 2003). Differences in metabolic pathways suggest that different enzymes might be involved in fungal, bacterial and mammalian metabolism of this alkaloid, resulting in different degradation products (Denis *et al.*, 1998).

A demethylase, specific for theobromine, was purified and characterized by Asano *et al.*, (1994). This enzyme consists of six identical subunits (40 kDa) and its calculated molecular weight was about 250 kDa. The purified enzyme was brown and had optimal adsorption at 415nm. The theobromine demethylase was activated by NADH, β -mercapto-ethanol and Co^{2+} and inhibited by Zn^{2+} . The K_m was 1.1mM at 25°C and pH 7.5.

The intracellular and monomeric theophylline demethylase is water-soluble, with molecular weight about 40 kDa and isoelectric point between 5.2 and 5.8 (Hakil, 1999). This enzyme catalyzes the second step of caffeine degradation by filamentous fungi, which forms 3-methylxanthine from theophylline. The theophylline demethylase is unstable at high temperature.

The stability of caffeine demethylase from *Pseudomonas putida* was greatly improved by the use of cryoprotectants and freeze-drying to low moisture contents. Freeze-dried cell-free extracts maintained 83% of its activity after storing for 200 days at 4°C (Sideso *et al.*, 2001).

The purpose of this work was to study the demethylases involved in the caffeine degradation by *R. delemar* in coffee residues.

2. MATERIAL AND METHODS

Microorganism and growth conditions

Rhizopus delemar LPB 12 was used for caffeine degradation and enzyme production. SSF was carried out in glass flasks with 20g of coffee husk (dry weight basis) under previously optimized conditions: pH 6.5, initial moisture content 75%, inoculum concentration 1×10^6 spores/g of substrate and temperature 28°C. The experiment was executed in duplicates (Tagliari *et al.*, 2002).

Enzymes extraction

The extraction of proteins from fermented coffee husk was studied applying experimental design (Haaland, 1989; Barros Neto *et al.*, 1995). A complete experimental design 2^3 , with 3 factors, 2 levels and 2 central points, was performed according to randomized structure in order to approach the optimum response region and define most significant variables in protein extraction (Table 1). The investigated factors were: agitation type, agitation time and extraction solution type. Statistica software version 5.0 was used in this study.

The fermented coffee husk was manually grinded for sample homogenization and cell disruption by shear force. Five grams of fermented substrate were added to 100mL of extraction solution, agitated at room temperature, filtered under vacuum and then centrifuged for 10 min at 3000 rpm. The amount of soluble protein in the extract was the response in all assays. The presented results are the average of duplicates.

Table 1. Decoding values to investigate the effect of variables in the proteins extraction

Factor	Level		
	-1	0	+1
Agitation type	Magnet	Shaker	Mechanical (Propeller)
Agitation time (min)	15	30	45
Extraction solution type	Water	Buffer	NaCl (1% w/v)

The mechanical agitation with blade homogeniser was used to study the best concentration of fermented material for caffeine and theophylline demethylases extraction (Table 2).

Table 2. Conditions for enzymes extraction tested in blade homogenizer.

Fermented material: NaCl 1% (w/v)	Operating condition
1:20	Continually agitating for 5 min
1:10	Continually agitating for 5 min
1:10	Pulse, 5 x 5 s, repose for 30 min at 10°C, 5 x 5 s
1:10	Pulse, 5 x 5 s, repose for 24 h at 10°C
1:10	Pulse, 5 x 5 s
1:2	Pulse, 5 x 5 s

Influence of pH and temperature on enzyme activity

The influence of pH (6.0, 6.5, 7.0, 7.4 and 8.0) on the demethylases activity was studied at 30°C using 50mM sodium phosphate buffer.

Thermal activation experiments were carried out in 50mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) and temperature range between 20 and 40°C using a thermostatic bath.

The influence of storage temperature (2 or 10 °C) and addition of protease inhibitor (EDTA) on the stability of both enzymes was studied for different storage times. The remaining activity was measured as described in the enzyme assay.

Kinetic studies of demethylases

The kinetics parameters K_m and V_{max} for caffeine and theophylline demethylases were determined using a steady-state approximation measuring the initial rates of reaction (differential method). Varying the concentration of the respective substrate, caffeine (0.025 to 0.8 mM) or theophylline (0.05 to 0.8 mM), initial rates of enzymatic reactions were determined.

Protein concentration

Protein concentration was measured using Coomassie Brilliant Blue dye G 250, according to the Bradford (1976) modified procedure. Bovine serum albumin (BSA) was used as standard.

Enzyme Assay

The demethylases were quantified by substrate reduction (caffeine 0.1mM or theophylline 0.2mM) in the linear region of time-course profile, based on the procedure described by Hakil (1999). The enzymatic reaction was carried out in Eppendorf tubes containing 100 μ L of substrate, 400 μ L of phosphate buffer (50mM) and 500 μ L of enzymatic extract. The reaction was stopped by trichloroacetic acid (50%) after 15min of incubation. The supernatant recovered after centrifugation for 10 min at 10000 rpm was filtered and analyzed by high performance liquid chromatography. One unit of enzyme activity (U) was defined as the quantity of enzyme required to degrade 1 μ mol of substrate per minute at 30°C and pH 7.4.

HPLC Analysis

Caffeine and theophylline were determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The analyses were performed on a Varian system with photodiode array detector (PDA) and Microsorb C18 column (4,6 x 250 mm), using 24% methanol as isocratic solvent at a flow rate of 1mL/min.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Enzymes extraction

An experimental design 2^3 was performed to define which variables affect the proteins extraction. The results were fitted with a first-order model (Eq.1).

$$P = 1.72 - 0.0175 A + 0.0825 T + 0.06 S + 0.025 A T - 0.0025 A S - 0.0725 T S \quad (1)$$

Where:

- P = Protein concentration
- A = Agitation type
- T = agitation Time
- S = extraction Solution type

The results obtained for protein extraction were submitted to analysis of variance (ANOVA), determining regression value, deviation and correlation coefficient for regression model. The F value represents the relation between regression and deviation sum of squares. The F test obtained in this analysis was compared with the listed F . The regression equation presented good correlation coefficient and the linear model is adequate for representation of the experimental results in the studied region. The linear model may not predict the protein extraction because the F_{calc} (see Table 3) should be four times higher than F_{listed} . Nevertheless, the contour curve is an interesting tool to understand how such parameters may affect this extraction process.

Table 3: ANOVA for the full linear model plus two central points for proteins extraction

F_{listed} values are significant at a 90% confidence level; Regression coefficient (R) = 0.95; $F_{calc} (MQ_{LF}/MQ_{PE}) < F_{listed}$; $F_{calc} (MQ_R/MQ_T) > 1.9\text{-fold } F_{listed}$;					
Source of Variation	Sum of Squares	Degrees of freedom	Mean quadratic	F test	
				F_{calc}	F_{listed}
Regression (R)	20.281	6	3.38	9.66	5.2 ($F_{0.90; 6,3}$)
Residual (r)	1.0416	3	0.35		
Lack of fit (LF)	0.980	2	0.49	7.95	49.5 ($F_{0.90; 2,1}$)
Pure error (PE)	0.0616	1	0.0616		
Total variation	21.323	9	-		

The agitation time was not a significant factor when 1% NaCl (w/v) was used (Figure 1). The best condition for proteins extraction (426 mg/g of dry material) was 20mL of NaCl 1% for each gram of fermented substrate and 15 minutes mechanical agitation (using propeller).

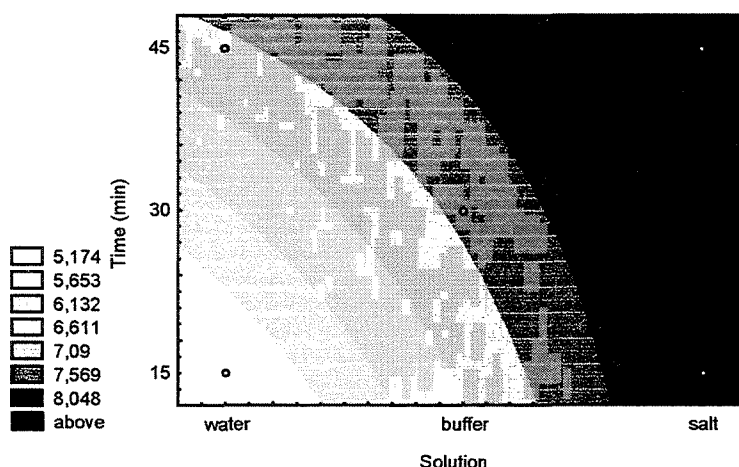


Figure 1. Contour plot for protein extraction (mg/mL) with mechanical agitation

The activity of caffeine and theophylline demethylase in the extract prepared with optimized conditions using a blade homogenizer is shown in Table 4.

Table 4. Enzyme activities obtained under optimised conditions.

Enzyme	Enzyme activity (U/mL)	Enzyme activity (U/g of dry material)	Specific activity (U/mg of protein)
Caffeine demethylase	0.09 ± 0.004	1.8 ± 0.022	0.011 ± 0.001
Theophylline demethylase	0.165 ± 0.003	3.3 ± 0.017	0.02 ± 0.0009

The highest value for caffeine and theophylline demethylases using a blade homogenizer for extraction was 0.17 U/mL and 0.43U/mL, respectively; achieved with 2mL of 1% NaCl for each gram of fermented substrate. However, the activity of enzymes per gram of fermented coffee husk was lower than obtained with 20mL 1% NaCl solution for each gram of fermented husk, 0.45 U/g and 1.13 U/g for caffeine and theophylline demethylase respectively.

Influence of temperature and pH on enzymes activities

Enzyme activity is affected by the concentrations of substrate, activators and specific inhibitors as well as other nonspecific compounds (salts and buffers) and pH, ionic

strength, temperature and in some cases interactions with other proteins present (Scopes, 1987).

The temperature activity profile of caffeine and theophylline demethylase was determined between 20 and 40°C at pH 7.4 (Figure 2). Both demethylases had a typical bell-shaped profile in this range, revealing an optimal value at about 30°C.

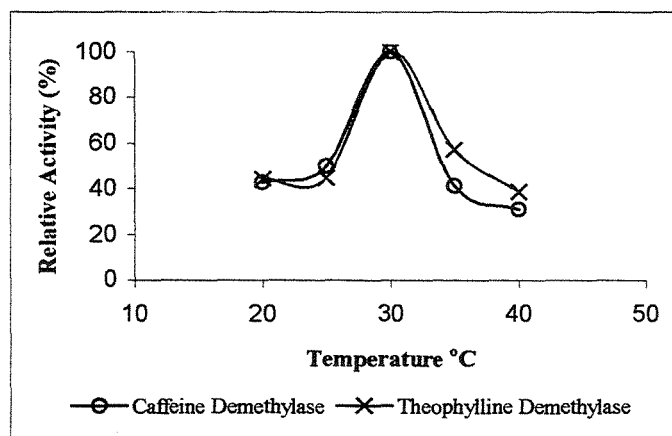


Figure 2. Influence of temperature at pH 7.4 on enzymes activities from fungal decaffeination

The influence of pH on enzymatic activities was determined in the range from pH 6.0 to pH 8.0 using a mixture of different buffers (Figure 3). The maximum enzymatic activity occurred at pH 6.5 for caffeine demethylase and pH 7.4 for theophylline demethylase.

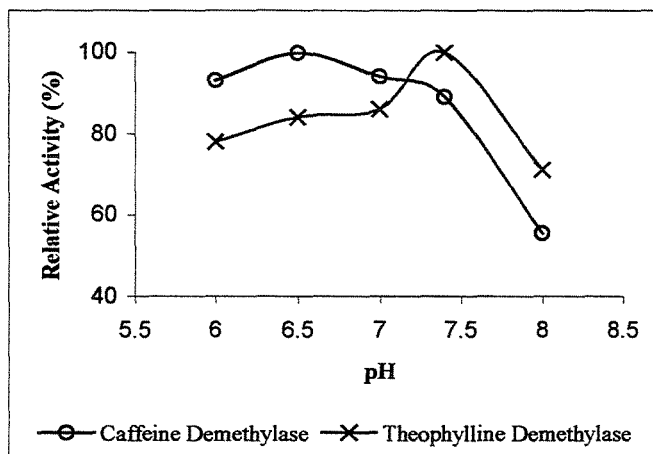


Figure 3. Enzymatic activity of enzymes from fungal decaffeination in different pH at 30°C

In the absence of enzymes, there was no degradation of caffeine or theophylline at temperature and pH investigated within 15 min of reaction.

Storage stability

The theophylline demethylase maintained 85% activity after 30 days storage at 10°C and caffeine demethylase maintained 60% in 2 days, reaching 45% loss after 3 days storage as 10°C (Figure 4). The loss of residual activity may be explained by protease action, as enzyme activities remained stable when adding EDTA to the extract. The enzymatic extract was stable when frozen for 15 days at -2°C.

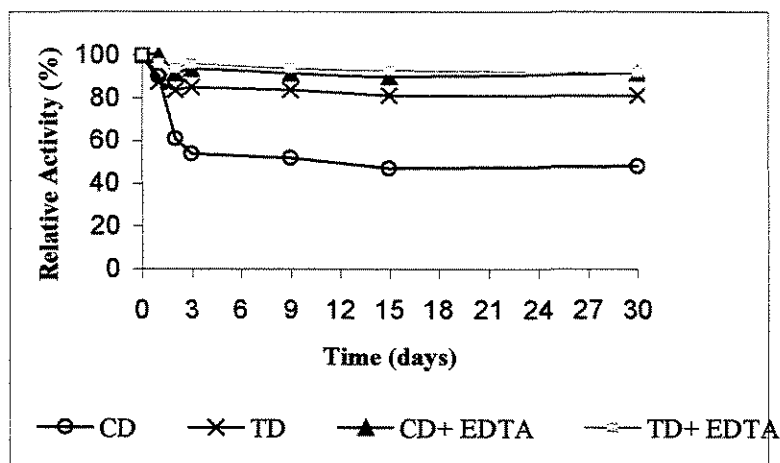


Figure 4. Activity of enzymatic extract stored at 10°C

Enzyme kinetic studies

Details of the kinetics are important because they provide essential information about how an enzyme will behave or respond in given situations (Franco et al., 2000).

Enzymatic reactions were performed by varying the concentration of respective substrate. The kinetics of the caffeine and theophylline demethylase from filamentous fungi in the range on the K_m concentration is shown in Figures 5 and 6.

Rates of 0.060 ± 0.004 and $0.110 \pm 0.003 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ were obtained for caffeine (0.1mM) and theophylline (0.1mM), respectively. Substrate inhibition was

observed for caffeine demethylase because the activity decreased at high substrate concentration.

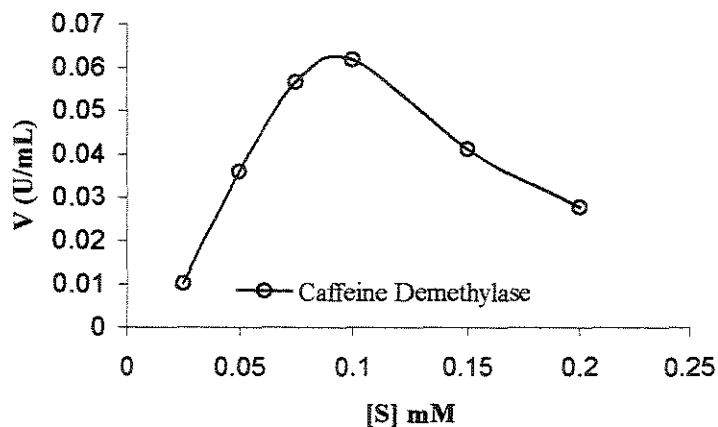


Figure 5. Reaction rate ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$) versus caffeine concentration (mM)

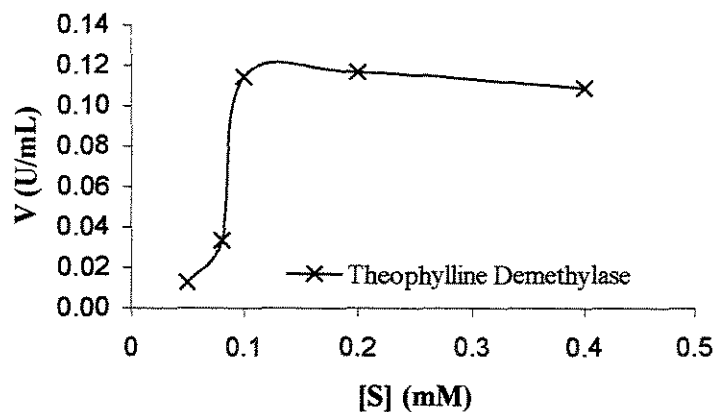


Figure 6. Reaction rate ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$) versus theophylline concentration (mM)

The Lineweaver-Burk reciprocal plot was used for K_m estimation (at low substrate concentration). Obtaining K_m of $150\mu\text{M}$ for caffeine demethylase and $180\mu\text{M}$ for theophylline demethylase.

4. CONCLUSIONS

For industrial applications, enzymes obtained by highly efficient processes and with low cost should be employed, besides that they must be active and stable during the whole process. Studies of kinetic, characterization and stability are extremely important to allow enzyme applications.

Best extraction conditions for caffeine and theophylline demethylase (1.8 and 3.3 U/g of dry material, respectively) were 1g of fermented and grinded substrate / 20ml of 1% NaCl, under mechanical agitation with blade homogenizer.

The enzyme activities were influenced by assay temperature and the highest activity value for both enzymes was achieved at 30°C. At this temperature the optimum pH for caffeine demethylase was 6.5 and for theophylline demethylase was 7.4. The enzymatic extract was stable when stored at -2°C and at 10°C when EDTA was added.

Substrate inhibition was observed for caffeine demethylase. The K_m values were calculated to be 150µM for caffeine demethylase and 180µM for theophylline demethylase.

5. ACKNOWLEDGMENTS

FAPESP, Brazil (project N° 99/09031-7).

6. REFERENCES

1. Asano, Y.; Komeda, T. and Amada, H. (1993), Microbial production of theobromine from caffeine. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57(8), 1286-1289.
2. Asano, Y.; Komeda, T. and Amada, H. (1994), Enzymes involved in theobromine production from caffeine by *Pseudomonas putida*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58(12), 2303-2304.
3. Barros Neto, B., Bruns, R.E. E Scarminio, I.S. (1995), *Planejamento e Otimização de Experimentos*. Editora da Unicamp, Campinas-SP.
4. Blanch, H. W., Clark, D. S. (1997), *Biochemical Engineering*. New York: Marcel Dekker, 702p.
5. Bradford, M. (1976), *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

6. Denis, S., Augur, C., Marin, B. and Roussos S. (1998), *Biotechnology Techniques*. 5, 359-362.
7. Franco, T.T., Portugal, E.P., Ponezi, A.N., Duarte, M.C., Pellegrino, A.C. (2000), Characterization of alkaline xylanases from *Bacillus pumilus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.31, p.90 - 94.
8. Haaland, P. D. (1989), *Experimental Design in Biotechnology*. New York: Ed. Marcel Dekker.
9. Hakil, M. (1999), Dégradation de la Caféine par les Champignons Filamenteux, Purification et Caracterization d  une Théophylline D  methylase d  *Aspergillus tamarii*. Thèse de doctorat, Universit   de Franche-Comté.
10. Hakil, M., Denis, S., Viniegra-gonzales, G. and Augur, C. (1998), *Enzyme and Microbial Technology*, 22, 355-359.
11. Ina, K. (1971), Biochemical studies of caffeine. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 45(8), 378-380.
12. Pandey, A.; Soccol, C.R.; Rodrigues-Leon, J.; Nigam, P. (2001), *Solid State Fermentation in Biotechnology. Fundamentals and Applications*. New Delhi, 221p.
13. Scopes, R.K. (1987), *Protein Purification*. Springer-Verlag New York, 283p.
14. Sideso OFP, Marvier AC, Katerelos, NA, Goodenough PW, 2001, The characteristics and stabilization of a caffeine demethylase enzyme complex, *International Journal of Food Science & Technology*, 36 (6), 693.
15. Tagliari, C.V., Sanson, R.K., Paca, J. Franco, T.T., Soccol, C.R. (2002), Biological detoxification of coffee husk by *Rhizopus* sp. by solid state fermentation using a column bioreactor. 15th International Congress of Chemical and Process Engineering. Praga, República Tcheca.
16. Tagliari C.V., Sanson R.K., Zanette A, Franco T.T., Soccol C.R. (2003), Caffeine Degradation by *Rhizopus delemar* in Packed Bed Column Bioreactor Using Coffee Husk as Substrate. *Brazilian Journal of Microbiology*, n.34, November v.1.

7. CONCLUSÕES

- Os melhores níveis de detoxificação da casca de café por *Rhizopus delemar*, 86% de cafeína e 58% de taninos, foram obtidos em frascos de Erlenmeyer contendo 20g de substrato com 75% de umidade, 10^6 esporos/g substrato, pH 6,5 e 28°C. O teor de umidade inicial do substrato foi a variável que mais influenciou a degradação de ambos os compostos.
- Os principais produtos de degradação da cafeína por *Rhizopus delemar*, verificados na casca de café fermentada em frascos de erlenmeyer foram os mesmos obtidos na fermentação em biorreator de colunas e por outros fungos filamentosos, ou seja, a cafeína foi demetilada em teofilina e 3-metilxantina.
- Os valores máximos de atividade enzimática, 1.8 e 3.3 U/g s.s. para cafeína e teofilina demetilase respectivamente, foram verificados após dois dias de fermentação em frascos de Erlenmeyer.
- O estudo cinético da fermentação no biorreator de colunas mostrou que o desenvolvimento do fungo e sua respiração estão relacionados com a degradação da cafeína e dos açúcares totais presentes na casca de café. A fase exponencial de crescimento microbiano foi encontrada entre 3 e 5 dias, após a máxima produção das enzimas e degradação da cafeína (65%), resultando 2mg de cafeína e 0.28mg de teofilina por grama de fermentado.
- O extrato enzimático foi estável por 15 dias após estocagem a -2°C e a 10°C com adição de EDTA. A atividade enzimática de ambas as enzimas foi fortemente influenciada pela temperatura do ensaio sendo que o maior valor foi encontrado a 30°C em tampão fosfato pH 7,4. Nesta temperatura o pH ótimo para a cafeína demetilase foi 6,5 e para a teofilina demetilase 7,4. A cafeína demetilase foi inibida pelo substrato e o K_m foi estimado em 150 μ M e para teofilina demetilase 80 μ M.

- Os resultados mostraram boas perspectivas para utilização de *Rhizopus delemar* tanto em processos de degradação da cafeína como para produção das enzimas cafeína e teofilina demetilases.

8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Investigar outros processos para produção das enzimas, como fermentação em meio líquido contendo suporte inerte para crescimento do fungo.
- Purificação das enzimas cafeína demetilase e teofilina demetilase de *Rhizopus delemar* para investigar a especificidade de cada enzima, determinar da massa molar e sequenciamento.
- Investigar a ação de cofatores e de métodos mais eficientes para o rompimento celular, objetivando maximizar a atividade enzimática.
- Estudo das condições de aplicação do extrato enzimático em processos de descafeinação.
- Investigar outras enzimas envolvidas neste processo fermentativo.

ANEXOS

PUBLICAÇÕES E PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS

- BIOLOGICAL DETOXIFICATION OF COFFEE HUSK BY *RHIZOPUS SP.* IN SOLID STATE FERMENTATION USING A COLUMN BIOREACTOR. Resumo, Artigo completo e Pôster apresentado no 15th International Congress of Chemical and Process Engineering - CHISA, realizado de 25 a 29 de agosto de 2002 em Praga na República Tcheca.
- DEVELOPMENT OF A SOLID STATE FERMENTATION PROCESS TO IMPROVE THE NUTRITIVE VALUE OF COFFEE HUSK. Artigo completo e Pôster apresentado no VII Simpósio de Hidrólise de Biomassa - SHEB, realizado em Maringá, PR de 02 a 06 de dezembro de 2002.
- COMPARISON BETWEEN ENZYMES PRODUCTION AND TOXIC COMPOUNDS DEGRADATION DURING SOLID STATE FERMENTATION IN COFFEE HUSK. Resumo, artigo completo e Pôster apresentado no ICB-2003 - International Conference on the Emerging Frontiers at the Interface of Chemistry and Biology, realizado em Trivandrum, Índia, de 28-30 de abril de 2003.
- EXTRACTION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF ENZYMES INVOLVED IN CAFFEINE AND THEOPHYLLINE DEGRADATION BY FILAMENTOUS FUNGI. Artigo completo e Pôster apresentado no XIV Simpósio Nacional de Fermentações – SINAFERM, realizado em Florianópolis, SC de 5 a 8 de agosto de 2003.
- DEGRADATION KINETICS OF CAFFEINE BY *RHIZOPUS DELEMAR* IN PACKED BED COLUMN BIOREACTOR USING COFFEE HUSK AS SUBSTRATE. Artigo completo selecionado para apresentação oral no XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia – CBM 2003, realizado em Florianópolis, SC de 16 a 21 de novembro de 2003.

- RELATION BETWEEN GROWTH KINETICS, ENZYMES PRODUCTION AND CAFFEINE DEGRADATION BY RHIZOPUS SP. IN PACKED BED COLUMN BIOREACTOR. Resumo enviado para o Congresso Brasileiro de Engenharia Química – COBEQ, a ser realizado em Curitiba de 26 a 29 de setembro de 2004.
- DETERMINATION OF THE GROWTH KINETICS PARAMETERS OF *RHIZOPUS DELEMAR* IN SOLID-STATE FERMENTATION. Resumo enviado para o 16th International Congress of Chemical and Process Engineering – CHISA-2004, a ser realizado Praga na República Tcheca de 22 a 26 de agosto de 2004.
- CAFFEINE DEMETHYLASES. Capítulo do livro: ENZYME TECHNOLOGY, Ashok Pandey, Colin Webb, Carlos Ricardo Soccol, Christian Larroche, Asiatech Publishers, Inc., New Delhi, in press.
- DESCAFEINAÇÃO ENZIMÁTICA. Patente em andamento.

Caracterização Físico-Química da Casca de Café (COCAMAR)

Métodos analíticos usados:

- pH
- Umidade: método termogravimétrico
- Atividade de Água (A_w): medida com o auxílio do aparelho Aqualab
- Resíduo Mineral (Cinzas): método termogravimétrico (IAL, 1985 e AOAC, 1980)
- Proteínas: nitrogênio total pelo método de Kjeldahl (IAL, 1985 e AOAC, 1980)
- Extrato Etéreo (Lipídios): extração de Soxhlet (IAL, 1985 e AOAC, 1980)
- Fibra em Detergente Ácido (FDA)
- Fibra em Detergente Neutro (FDN)
- Hemicelulose: %FDN - %FDA
- Determinação de Lignina: determinado por titulação
- Determinação de Celulose: incineração da amostra após a determinação da lignina
- Açúcares (NELSON, 1944 e SOMOGYI, 1945)
- Cafeína: HPLC
- Taninos: Folin-Denis

A Tabela 1 apresenta as características físico-químicas da casca de café. O conteúdo de nutrientes da casca de café é comparável a outros resíduos agro-industriais utilizados em ração animal. Sua utilização é descartada devido à presença de compostos antifisiológicos como a cafeína e taninos. A casca de café apresentou um elevado teor de fibras (60,15%), devido à presença de celulose (31,60%), hemicelulose (10,23%) e lignina (9,35%). A casca também apresentou um apreciável teor de açúcares (8,61%), podendo fornecer a energia necessária para o metabolismo dos microrganismos, bem como os minerais, representados pela composição de cinzas (9,62%). O nitrogênio necessário ao desenvolvimento dos microrganismos provém das proteínas e da cafeína presente na casca de café. O processo empregado no beneficiamento dos grãos, a variedade do café e as condições de cultivo poderão ocasionar alterações na composição centesimal.

Tabela 5.1. Características Físico-Químicas da Casca de Café.

Características	
Umidade (%)	11,15
pH	4,92
A _w	0,65
Proteínas (% p.s.)	7,00
Fibras (% p.s.)	60,15
Lipídeos (% p.s.)	1,56
Cinzas (% p.s.)	9,62
Açúcares redutores (% p.s.)	4,22
Açúcares não redutores (% p.s.)	4,39
Açúcares totais (% p.s.)	8,61
Taninos (% p.s.)	1,61
Cafeína (% p.s.)	0,56

Relação Carbono / Nitrogênio Presente na Casca de Café:

Uma aproximação da relação carbono/nitrogênio (C/N) foi calculada utilizando a composição centesimal da casca de café.

Quantidade de nitrogênio: foi considerado o nitrogênio proveniente das proteínas e da cafeína presentes no substrato. Para o cálculo da percentagem de nitrogênio presente nas proteínas utilizou-se como fórmula básica o aminoácido alanina ($C_3H_4O_2NH_3$). A quantidade de nitrogênio no substrato foi calculada pela seguinte equação:

Teor de N na casca de café = (Teor de proteínas x % de N em $C_3H_4O_2NH_3$) + (Teor de cafeína x % de N em $C_8H_{10}N_4O_2$)

Teor de N = (7 x 0,16) + (0,56 x 0,29) = 1,28%

Quantidade de carbono: foi considerado o carbono proveniente dos carboidratos, das proteínas e das fibras presentes no substrato. Para o cálculo da percentagem de carbono presente nos carboidratos utilizou-se a fórmula do monômero básico dos açúcares, a glicose ($C_6H_{12}O_6$). Para o cálculo da percentagem de carbono presente nas fibras utilizou-se a

fórmula do monômero básico da celulose, a celobiose. A quantidade de carbono no substrato foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{Teor de C} = (\text{Teor de açúcares totais} \times \% \text{ de C em } \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6) + (\text{Teor de proteínas} \times \% \text{ de C em } \text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2\text{NH}_3) + (\text{Teor de fibras} \times \% \text{ de C em } \text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_{11}) + (\text{Teor de cafeína} \times \% \text{ de C em } \text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2)$$

$$\text{Teor de C} = (8,61 \times 0,4) + (7 \times 0,4) + (60,15 \times 0,44) + (0,56 \times 0,49) = 32,98\%$$

Portanto, a relação C/N encontrada foi de 25,77.

Microscopia Óptica do *Rhizopus delemar* LPB 12

Testes de microscopia óptica foram realizados com o objetivo de observar as características morfológicas do microrganismo. Pode-se observar na Figura 1 que o *Rhizopus delemar* LPB 12 apresenta micélio abundante e que suas hifas não são septadas, característica típica deste fungo. A Figura 2 apresenta um esporângio antes do rompimento e a Figura 3 mostra os esporos após o rompimento. Pode-se observar que os esporos não são uniformes e que o esporângio é negro, outras características típicas deste fungo. Finalmente, a Figura 4 apresenta uma foto englobando as hifas e os esporângios.

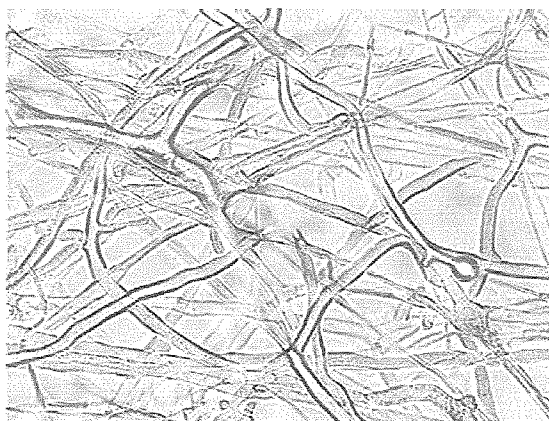


Figura 1: Micélio do *Rhizopus delemar* 34612 em aumento de 400x

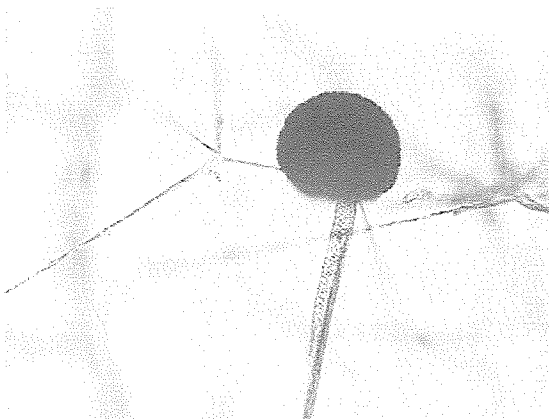


Figura 2: Esporângio *Rhizopus delemar* 34612 em aumento de 400x

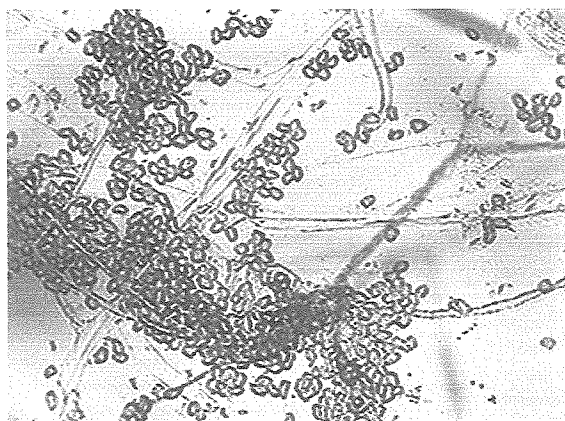


Figura 3: Esporos do *Rhizopus delemar* 34612 em aumento de 400x

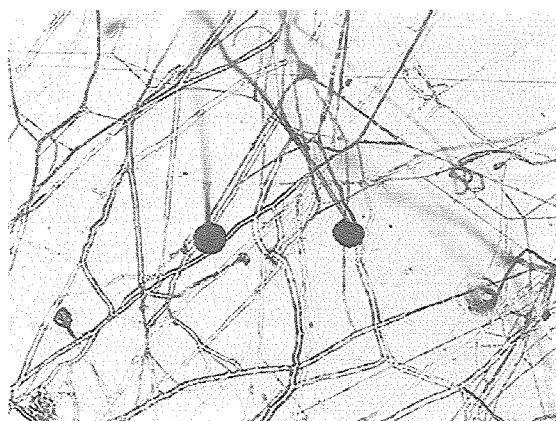


Figura 4: Hifas e esporângio do *Rhizopus delemar* 34612 em aumento de 100x

Extração das Enzimas: Rompimento Celular

Para obter a biomassa utilizada no experimento 10 frascos de erlenmeyer contendo 50mL de extrato de casca de café 20% (200g em 1L) foram inoculados 10^7 cél./mL e incubados por 7 dias em shaker a 30°C e 140 rpm. O caldo de fermentação foi filtrado à vácuo e a biomassa foi pesada. O rompimento foi realizado por força mecânica em um reator de aço inox, encamizado, com sistema de agitação composto por 3 turbinas, a biomassa foi submetida a agitação intensa e atrito com esferas de vidro. Foi utilizada a mesma proporção em massa (g) de células e de esferas de vidro (4:4). Foi adicionado 14mL de água e a mistura foi agitada por 150 segundos à 1°C. Foram tiradas 6 alíquotas ao longo do tempo, estas foram centrifugadas e submetidas ao teste de proteínas pelo método de Bradford (1976).

A Figura 1 apresenta os resultados obtidos. O melhor tempo de extração para este sistema foi de 120s liberando 6mg/mL de proteína. Devido a dificuldade em obter a quantidade de biomassa necessária para a extração e ainda não estar utilizando o mesmo processo de fermentação, foi decidido não aprofundar o estudo de extração em fermentação submersa.

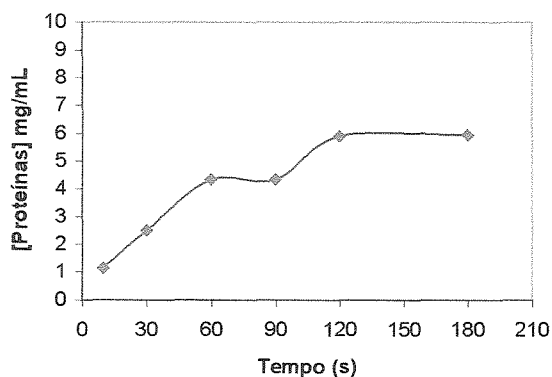


Figura1: Rompimento celular

Fermentação no Estado Sólido em Biorreator de Duplo Casco

Esta fermentação foi conduzida para verificar variações no processo com um aumento 25 vezes na quantidade de substrato fermentado, quantidade necessária para iniciar os testes de aplicação em alimentação de ruminantes. O biorreator (Figura 1) é constituído de um tambor cilíndrico de aço inox com distribuição de ar pela superfície interna e capacidade para 3 kg de substrato seco. A agitação se dá por meio de uma pá com velocidade controlada.

Um kg do substrato foi esterilizado em copos de bécker de 2 L por 20 minutos. A inoculação foi realizada no próprio bécker após a correção da umidade (70%) e do pH (em torno de 7). O biorreator foi preenchido assepticamente após homogeneização do substrato. A fermentação conduzida à temperatura ambiente e agitações periódicas por 7 dias.

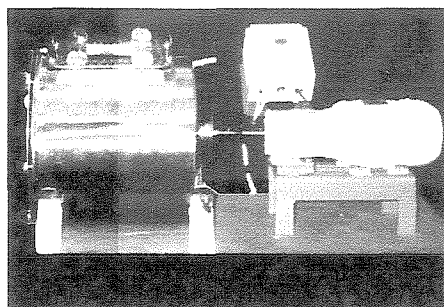


Figura 1: Biorreator de tambor

Condições de operação:

- Agitação: 10 rpm por 5 minutos 1 vez ao dia
- T = ambiente
- pH inicial = 6,2
- Concentração do inóculo = 10^6 esporos/ grama de substrato

Foi obtido aproximadamente 50% de redução da cafeína ao final de 6 dias de fermentação. Este valor ainda pode ser otimizado visto que este é um teste preliminar.