

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Leandro Bernardi Werle

**OBTENÇÃO DE ÁCIDO GIBERÉLICO POR FERMENTAÇÃO EM  
ESTADO SÓLIDO EMPREGANDO RESÍDUO DE CERVEJARIA E  
FARELO DE ARROZ BRUTO COMO SUBSTRATOS**

Santa Maria, RS  
2017

**Leandro Bernardi Werle**

**OBTENÇÃO DE ÁCIDO GIBERÉLICO POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO  
SÓLIDO EMPREGANDO RESÍDUO DE CERVEJARIA E FARELO DE ARROZ  
BRUTO COMO SUBSTRATOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Área de Concentração em Desenvolvimento de Processos Industriais e Ambientais, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luiz Jahn

Santa Maria, RS  
2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bernardi Werle, Leandro

Obtenção de ácido giberélico por fermentação em estado sólido empregando resíduo de cervejaria e farelo de arroz bruto como substratos / Leandro Bernardi Werle.- 2017.

50 p.; 30 cm

Orientador: Sérgio Luiz Jahn

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, RS, 2017

1. Ácido Giberélico 2. Fermentação em estado sólido 3. Resíduos agroindustriais I. Jahn, Sérgio Luiz II. Título.

**Leandro Bernardi Werle**

**OBTENÇÃO DE ÁCIDO GIBERÉLICO POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO  
SÓLIDO EMPREGANDO RESÍDUO DE CERVEJARIA E FARELO DE ARROZ  
BRUTO COMO SUBSTRATOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Área de Concentração em Desenvolvimento de Processos Industriais e Ambientais, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**.

**Aprovado em 21 de março de 2017:**

---

**Sérgio Luiz Jahn, Dr. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

---

**Márcio Antonio Mazutti, Dr. (UFSM)**

---

**Juliana Rosemara Felisberto da Silva, Dra. (IFFAR)**

Santa Maria, RS  
2017

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me dado a vida e tudo de bom que tem me trazido.

Aos meus pais, Rudemar e Justina, e ao meu irmão, César Augusto, pela educação, amor, companheirismo, compreensão e apoio em todos os momentos.

À minha namorada, Juliana, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos.

Aos orientadores, professor Dr. Sérgio Luiz Jahn e professora Dr<sup>a</sup>. Raquel Cristine Kuhn pela oportunidade de orientar-me efetivamente neste trabalho, ensinando e acompanhando a minha formação desde a faculdade.

Ao professor Dr. Marcio Antonio Mazutti, pelos ensinamentos e amizade desde o período da faculdade.

Aos colegas de laboratório que muito ajudaram durante os experimentos e período de aulas, em especial ao colega e amigo professor Ms. Ederson Abaide.

Aos alunos de iniciação científica Tássia Helena Felin e Marcelo Fronza Welter por toda a ajuda e companhia no desenvolvimento deste projeto.

À todos meus amigos que sempre me apoiaram e incentivaram na realização deste projeto.

Ao PPGEPro, CNPq e à CAPES pelo apoio institucional e financeiro.

“A lição número um  
Eu aprendi com meu pai  
Quem não sabe pra onde vai,  
Não vai a lugar nenhum”

*(Jayme Caetano Braun e Luiz Marengo)*

## RESUMO

### **OBTENÇÃO DE ÁCIDO GIBERÉLICO POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO EMPREGANDO RESÍDUO DE CERVEJARIA E FARELO DE ARROZ BRUTO COMO SUBSTRATOS**

AUTOR: Leandro Bernardi Werle

ORIENTADOR: Sérgio Luiz Jahn

O Ácido Giberélico ( $GA_3$ ), fitohormônio pertencente ao grupo das giberelinas, vem se destacando por ser utilizado largamente em formulações agrícolas, uma vez que possibilita aumento na produtividade em diferentes tipos de cultura. Devido ao elevado custo final de produção do  $GA_3$ , novos processos para produção do hormônio vem sendo estudados, dentre eles a Fermentação em Estado Sólido (FES), podendo aumentar a concentração do  $GA_3$  obtido, além de utilizar substratos agroindustriais de baixo valor comercial abundantes na região de Santa Maria como farelo de arroz bruto (FAB) e resíduo de cervejaria úmido (RCU). Assim, objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de  $GA_3$  por FES empregando como substratos RCU e FAB e utilizando uma cepa de *Gibberella fujikuroi*. Inicialmente foi realizada a caracterização dos substratos, sendo possível verificar a partir dos resultados que ambos apresentam grande potencial como fontes de nutrientes por serem ricos em carbono e nitrogênio. Na sequência, foi realizado um planejamento experimental do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR) do tipo  $2^3$  para 3 variáveis totalizando 17 experimentos, com 3 repetições no ponto central, para investigar a influência do teor inicial de umidade do substrato (50 a 70%), a proporção do farelo de arroz no substrato (0 a 50% em peso) e teor de nitrogênio inorgânico (0 a 2 g / kg de substrato). Após 6 dias de cultivo em béqueres, o melhor rendimento de  $GA_3$  (0,93 g / kg de substrato) ocorreu para as condições (65,95% de umidade, 10,12% de farelo de arroz e 1,6 g de N inorgânico/Kg de substrato). Finalmente, a condição de maior rendimento foi utilizada para verificar o perfil cinético de  $GA_3$ , foi possível verificar um aumento da produção do hormônio, principalmente a partir do 4º dia, sendo que a máxima produção (1,31 g / kg de substrato) ocorreu no 10º dia de fermentação, ocorrendo a partir daí uma redução gradativa na produção do hormônio.

**Palavras-chave:** Ácido Giberélico. Fermentação em estado sólido. Resíduos agroindustriais.

## ABSTRACT

### OBTEINTION OF GIBBERELIC ACID BY SOLID STATE FERMENTATION EMPLOYING BREWERY RESIDUE AND CRUDE RICE BRAND AS SUBSTRATES

AUTHOR: Leandro Bernardi Werle

ADVISOR: Sérgio Luiz Jahn

Gibberellic acid (GA<sub>3</sub>), a phytohormone belonging to the group of gibberellins is widely used in agricultural formulations, since it allows increased productivity in different types of crops. Due to the high final cost of production of GA<sub>3</sub>, new processes for the production of the hormone have been studied, among them Solid State Fermentation (SSF). Through this fermentation it is possible to increase the concentration of the GA<sub>3</sub> obtained, as well as to use agroindustrial substrates of low commercial value abundant in the Santa Maria region as crude rice bran (CRB) and wet brewery residue (WBR). Thus, the objective of this work was to evaluate the production of GA<sub>3</sub> by SSF using WBR and CRB substrates and using a strain of *Gibberella fujikuroi*. Initially the characterization of the substrates was performed, and it was possible to verify from the results that both present great potential as sources of nutrients because they are rich in carbon and nitrogen. An central composite rotational design (CCRD) was carried out, with a 2<sup>3</sup> to 3 variables totalling 17 experiments, with 3 replicates to the central point, to investigate the influence of the initial moisture content of the substrate (50 to 70 %), The proportion of rice bran in the substrate (0 to 50% by weight) and inorganic nitrogen content (0 to 2 g / kg of substrate). After 6 days of cultivation, the best GA<sub>3</sub> yield (0.93 g / kg substrate) occurred for the conditions (65.95% moisture, 10.12% rice bran and 1.6 g N Inorganic / kg substrate). Finally, the condition of higher yield was used to verify the kinetic profile of GA<sub>3</sub>, it was possible to verify an increase in the production of the hormone, mainly from day 4, and the maximum production (1.31 g / kg of substrate) occurred on the 10th day of fermentation, with a gradual reduction in hormone production.

**Keyword:** Gibberellic acid. Solid State Fermentation. Agro-industrial waste.

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 - Estrutura química do Ácido Giberélico (GA <sub>3</sub> ). .....	18
Figura 2 - Biossíntese do ácido mevalônico. ....	20
Figura 3 - Biossíntese do geranyl-geranyl pirofosfato (GGPP). ....	20
Figura 4 - Biossíntese do GA <sub>12</sub> - aldeído. ....	21
Figura 5 - Biossíntese de diferentes GAs até serem formadas as giberelinas bioativas GA <sub>1</sub> e GA <sub>3</sub> . ....	22

### ARTIGO

Figure 1 - Pareto chart for moisture (%), crude rice bran % and N (inorganic)(g/kg) in the production of GA <sub>3</sub> by solid state fermentation. ....	37
Figure 2 - Response surface showing the influence of moisture content and CRB on production of GA <sub>3</sub> by solid state fermentation. ....	38
Figure 3 - Kinetic of the GA <sub>3</sub> production and moisture content during SSF. ....	40

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 - Técnicas de purificação relatadas na literatura..... 30

### ARTIGO

Table 1 - Composition of crude rice bran and malt residue. .... 35

Table 2 - Matrix of the CCRD to evaluate the influence of moisture (%), crude rice bran % and N (inorganic)(g/kg) in GA<sub>3</sub> production by solid state fermentation. .... 36

Table 3 - ANOVA for GA<sub>3</sub> production. .... 38

## LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Al	Alumínio
$a_w$	Atividade de Água
BDA	Batata-Dextrose-Agar
Ca	Cálcio
C/N	Relação Carbono/Nitrogênio
CoA	Acetil coenzima A
Cu	Cobre
FAB	Farelo de Arroz Bruto
Fe	Ferro
FES	Fermentação em estado sólido
Fsub	Fermentação Submersa
FSL	Fermentação em superfície líquida
g/kg	Gramas por quilograma
g/L	Gramas por litro
g/mol	Gramas por mol
GA <sub>5</sub>	Giberelinas
GA <sub>3</sub>	Ácido Giberélico
GGPP	Geranyl-geranyl pirofosfato
ICI	Imperial Chemical Industries
K	Potássio
kg	Quilograma
M	Molar
mg	Miligramas
Mg	Magnésio
Mn	Manganês
MVA	Via do ácido mevalônico
N	Nitrogênio
NaOH	Hidróxido de Sódio
ONUBR	Organização das Nações Unidas no Brasil
P	Fósforo
pH	Potencial de Hidrogênio
RCU	Resíduo de Cervejaria Úmido
S	Enxofre
UFMS	Universidade Federal de Santa Maria
U\$	Dólares
v/v	Volume/Volume
Zn	Zinco

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	OBETIVOS.....	15
1.1.1	Objetivo geral.....	15
1.1.2	Objetivos específicos.....	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1	AS GIBERELINAS.....	16
2.2	HISTÓRICO DAS GIBERELINAS.....	16
2.3	PROPRIEDADES DO ÁCIDO GIBERÉLICO (GA <sub>3</sub> ).....	17
2.3.1	Propriedades físico-químicas.....	17
2.3.2	Aplicações.....	18
2.4	MICROORGANISMOS PRODUTORES DE GA <sub>3</sub> .....	19
2.5	BIOSSÍNTESE DAS GIBERELINAS.....	19
2.6	MÉTODOS DE OBTENÇÃO DO GA <sub>3</sub> .....	23
2.6.1	Fermentação submersa (Fsub).....	23
2.6.2	Fermentação em Estado Sólido (FES).....	24
2.7	ESTADO DA ARTE DA PRODUÇÃO DE GA <sub>3</sub> POR PROCESSO DE FES UTILIZANDO SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS.....	24
2.8	RESÍDUO DE CERVEJARIA ÚMIDO (RCU) E FARELO DE ARROZ BRUTO (FAB) COMO SUBSTRATO NO PROCESSO DE FES.....	25
2.8.1	Resíduo de Cervejaria Úmido (RCU).....	25
2.8.2	Farelo de Arroz Bruto (FAB).....	26
2.9	FATORES QUE AFETAM A PRODUÇÃO DO GA <sub>3</sub> NO PROCESSO DE FES... ..	26
2.9.1	Nitrogênio.....	26
2.9.2	Carbono.....	27
2.9.3	Relação C/N.....	27
2.9.4	Elementos traços.....	28
2.9.5	pH.....	28
2.9.6	Atividade de água (a <sub>w</sub> ).....	28
2.9.7	Temperatura.....	29
2.9.8	Aeração.....	29
2.10	EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO GA <sub>3</sub> .....	29

3	ARTIGO: PRODUCTION OF GIBBERELIC ACID USING RICE BRAN AND MALT RESIDUE MIXTURE FROM <i>Gibberella fujikuroi</i> BY SOLID STATE FERMENTATION .....	31
	Abstract .....	31
	1 Introduction .....	31
	2 Materials and Method.....	32
	2.1 Microorganism .....	32
	2.2 Substrate .....	32
	2.3 Inoculum preparation .....	33
	2.4 Solid State Fermentation (SSF) .....	33
	2.5 Central composite rotational design (CCRD) .....	33
	2.6 Kinetics for production of GA <sub>3</sub> .....	33
	2.7 Analytical procedure .....	34
	2.7.1 Sample preparation.....	34
	2.7.2 GA <sub>3</sub> determination.....	34
	2.7.3 Moisture determination .....	34
	2.8 Statistical analysis .....	34
	3 Results and Discussion .....	34
	3.1 Substrate characterization.....	34
	3.2 Solid state fermentation.....	35
	3.3 Kinetic profile of GA <sub>3</sub> production.....	39
	4 Conclusion.....	40
	Acknowledgments .....	40
	References .....	40
4	CONCLUSÃO.....	44
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	45

## 1 INTRODUÇÃO

Estima-se que a população mundial passará de 7,2 bilhões de pessoas em 2015 para 9,6 bilhões de pessoas em 2050 (ONUBR, 2013). Para acompanhar este aumento populacional, a produção mundial de alimentos deverá pelo menos ser duplicada, se não triplicada nos próximos 40 anos utilizando praticamente a mesma área agricultável disponível sendo preciso investir no aumento de produtividade para satisfazer as crescentes necessidades humanas de alimento (MACHADO, 2002).

Dentro deste cenário, a aplicação de hormônios de crescimento vegetal vem ganhando cada vez mais destaque por possibilitarem aumento na produtividade agrícola em diferentes tipos de cultura (RODRIGUES, 2010). Os hormônios vegetais mais utilizados atualmente são as Auxinas, Giberelinas, Etileno, Citocininas e Ácido Abscísico (RAZEM, BARON e HILL, 2006; EROGUL e SEN, 2015). Por serem produzidas naturalmente pelas plantas estas substâncias muitas vezes são denominados de fitohormônios (BRUCKNER e BLECHSCHMIDT, 1991).

Dos fitormônios utilizados, as Giberelinas são os mais efetivos para promover o crescimento de plantas, sendo o ácido giberélico ( $GA_3$ ) o composto mais importante, utilizado largamente em formulações agrícolas (DISSANAYAKE, GEORGE e GUPTA, 2010; ZANUZO, LERMENN e BEZERRA, 2012). Alguns de seus benefícios são: promover e regular crescimento de plantas, causar a quebra da dormência de sementes, induzir o florescimento, induzir a atividade enzimática e retardar o amadurecimento precoce dos frutos colhidos (JEFFERYS, 1970).

A produção mundial de  $GA_3$  é estimada em 60 toneladas/ano, movimentando por volta de U\$ 400 milhões anuais (Transparency Market Research). Atualmente, no Brasil este insumo não é produzido, necessitando de importação para suprir o mercado nacional, fazendo com que em muitos casos a sua aplicação na agricultura seja dificultada (RODRIGUES, 2010).

Devido às dificuldades técnicas e econômicas de produção por rota química atualmente, o ácido giberélico é produzido industrialmente pelo processo de fermentação submersa ( $F_{sub}$ ), onde o  $GA_3$  é um dos metabólitos secundários gerados quando do crescimento dos fungos *Giberella fujikuroi* e *Fusarium moniliforme*. O grande inconveniente desta rota de produção esta relacionada às baixas concentrações de  $GA_3$  obtidas na fermentação submersa (< 1,0 g/Litro) (MACHADO, 2002), fazendo com que sua remoção do meio reacional seja bastante laboriosa, com conseqüente elevação no custo final do produto.

Porém, por apresentar controle de parâmetros operacionais precisos, principalmente com relação à temperatura de fermentação, e necessitar de espaço reduzido para operação este processo ainda é utilizado industrialmente na produção deste insumo (MURADO *et al*, 1993). Os inconvenientes desta rota tecnológica fazem com que novos processos sejam prospectados visando principalmente elevar a quantidade de produto obtido por volume de reator.

Uma nova rota proposta para a produção de GA<sub>3</sub> é a Fermentação em Estado Sólido (FES), que consiste no desenvolvimento do microrganismo em uma matriz sólida que contém os nutrientes e a água necessários para seu desenvolvimento. Através desta rota normalmente é possível a obtenção de maiores quantidades do metabólito desejado (GA<sub>3</sub>), pois representa as condições mais próximas do habitat natural deste tipo de microrganismo, condição esta onde a indesejada contaminação por bactérias é dificultada. Outra vantagem desta rota consiste na possibilidade da utilização de resíduos agroindustriais como substrato do processo de fermentação (DORAN, 1998).

Vários autores brasileiros vêm realizando estudos para a produção de GA<sub>3</sub> por FES utilizando como substratos resíduos agroindustriais. Machado (2002) utilizou como substrato casca de café/bagaço de mandioca obteve produções da ordem de 0,925 g GA<sub>3</sub>/kg de substrato. Rodrigues (2010) utilizou como substrato bagaço de laranja obteve 5,7 g de GA<sub>3</sub>/kg de substrato e finalmente Oliveira (2010) também utilizou polpa cítrica (PC) em diferentes biorreatores em escala laboratorial obteve 7,7 g de GA<sub>3</sub>/kg de PC seca, mostrando a potencialidade deste processo de fermentação.

O Brasil como país agroindustrial possui uma grande quantidade de resíduos agroindustriais gerados alguns destes resíduos que podem ser citados são: bagaço de cana-de-açúcar, casca de café, bagaço de laranja, farelo de arroz e bagaço de malte, dentre outros (SOCCOL *et al*, 2010). No município de Santa Maria estão instaladas diversas empresas beneficiadoras de Arroz, onde do processo de polimento são geradas grandes quantidades de Farelo de Arroz Bruto (FAB), que representa em média 10% em peso dos produtos de processamento do arroz em casca (EMBRAPA, 2004). Neste município também existe instalada uma unidade industrial, de médio porte, produtora de cerveja, onde são geradas quantidades consideráveis de resíduos, principalmente do setor de maltaria onde são gerados de 14 - 20 kg/100 litros de cerveja produzidos (SANTOS e RIBEIRO, 2005). Estes resíduos são ricos em nutrientes como carbono, nitrogênio e sais minerais, necessários ao bom crescimento de fungos empregados no processo de FES, que descartados de maneira inadequada podem trazer riscos ambientais significativos (CASTILHO *et al*, 2000; DURAND, 2003).

Assim, o principal objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade técnica de produção de GA<sub>3</sub>, fitohormônio de larga aplicação agrícola, por FES empregando como substrato resíduo de bagaço de malte e farelo de arroz e como microrganismo uma cepa de *Gibberella fujikuroi*. Os ensaios foram realizados em escala de bancada, sendo estudado o efeito dos seguintes parâmetros: teor de umidade, percentual de farelo de arroz incorporado ao bagaço de malte e adição de nitrogênio inorgânico. Com a condição de maior produtividade foi realizado o estudo da cinética de fermentação para avaliar o perfil de produção de GA<sub>3</sub> e a variação da umidade do meio com o passar do tempo.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a viabilidade técnica de produção de ácido giberélico por fermentação em estado sólido, em escala de bancada, empregando resíduo de malte e farelo de arroz bruto como substratos.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- 1) Caracterizar quimicamente os substratos Farelo de Arroz Bruto e Resíduo de Malte.
- 2) Determinar, através de planejamento de experimento, as melhores condições de Umidade Inicial do substrato, Relação Resíduo de Malte/Farelo de Arroz Bruto e Quantidade de Nitrogênio Inorgânico, na produção de GA<sub>3</sub> por FES em escala de bancada (Béqueres).
- 3) Empregando as melhores condições obtidas no objetivo anterior, avaliar o efeito do tempo de fermentação na produção de GA<sub>3</sub> e umidade final do substrato.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 AS GIBERELINAS

As Giberelinas (GAs) são um grande grupo de ácidos diterpenóides formados por uma estrutura cíclica com sistemas de quatro ou cinco anéis, contendo no total 19 ou 20 carbonos. Elas estão naturalmente presentes em plantas e certos microrganismos como bactérias e fungos (PHINNEY, 1983).

Atualmente, são conhecidas mais de 130 moléculas desta família, muitas delas apresentam atividade biológica atuando como hormônios e reguladores de crescimento de diferentes tipos de plantas (BRUCKNER e BLECHSCHMIDT, 1991).

Dentre as principais moléculas pertencentes à família das giberelinas com propriedades bioativas temos GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, e GA<sub>7</sub>. Como resultado destas propriedades e suas aplicações comerciais, o Ácido Giberélico (GA<sub>3</sub>) vem sendo a principal giberelina estudada e produzida comercialmente desde a metade do século passado (SPONSEL e HEDDEN, 2004).

### 2.2 HISTÓRICO DAS GIBERELINAS

Inicialmente, os primeiros relatos científicos com respeito às giberelinas datam de 1898, onde pesquisadores estudavam uma doença que afetava dentre outras plantas, o arroz, causando crescimento acelerado do mesmo, logo após, as plantas afetadas morriam (BÖMKE e TUDZYNSKI, 2009). Hori (1903) chamou esta anomalia por “Bakanae” (doença das plantas loucas) e descobriu que esta doença era causada pela presença de um fungo do gênero *Fusarium* cuja forma sexuada foi identificada e batizada como *Gibberella fujikuroi*.

Em 1926, o cientista japonês Eiichi Kurosawa descobriu que a disfunção no crescimento das plantas era causada por uma substância secretada pelo fungo *Gibberella fujikuroi* (KUROSAWA, 1926). Yabuta foi o primeiro pesquisador a isolar um composto sólido não-cristalino, proveniente da secreção destes fungos batizada de Giberelina A, em alusão ao nome do fungo da qual foi extraída (ITO e KIMURA, 1931).

Entre 1927 e 1940, houve mais de 50 publicações tratando das propriedades químicas e biológicas das giberelinas (BRUCKNER e BLECHSCHMIDT, 1991).

Na década de 50, Takahashi *et al.* (1955) obtiveram sucesso na separação da Giberelina A em 3 componentes que foram chamados A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> e A<sub>3</sub>, sendo que o número da

giberelina se refere a ordem cronológica da sua descoberta. Ainda, nesta década, cientistas descobriram que as GAs eram reguladores naturais do crescimento e desenvolvimento em muitas plantas (RADLEY, 1956; KATO *et al.*, 1962).

Depois desta descoberta, a empresa britânica *Imperial Chemical Industries* (ICI), ainda que em escala laboratorial, começou a produção de giberelinas. Após várias etapas de purificação, uma giberelina foi isolada e chamada de “ácido giberélico” (GA<sub>3</sub>), esta apresentava a mesma estrutura da giberelina A<sub>3</sub> isolada anteriormente (BRUCKNER e BLECHSCHMIDT, 1991).

Até o final da década de 60, cerca de 27 giberelinas já haviam sido descobertas e a técnica de produção por fermentação submersa era a mais empregada (BRUCKNER e BLECHSCHMIDT, 1991; FUSKA *et al.*, 1961).

As décadas subsequentes de 70 e 80 foram marcadas por estudos de produção destes fitohormônios por Fsub e otimizações na produção de GA<sub>3</sub> sendo que os rendimentos obtidos encontram-se em torno de 0,5 – 5 g/L (JEFFERYS, 1970; VASS e JEFFERYS, 1979; GOHLWAR *et al.*, 1984; KAHLONK e MALHOTRA, 1986).

Na década de 90 e nos anos 2000, ocorreram os estudos com Fsub em processos de batelada alimentada e células imobilizadas, tendo por finalidade tentar minimizar efeitos de inibição na produção do fitohormônio, porém, não houve um aumento significativo quando comparado com as décadas anteriores (BRUCKNER e BLECHSCHMIDT, 1991; PASTRANA *et al.*, 1995; ESCAMILLA *et al.*, 2000; SHUKLA *et al.*, 2005a).

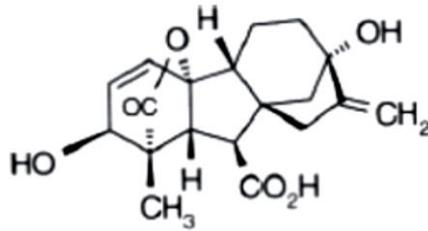
Buscando aumentar os rendimentos de produção de GA<sub>3</sub>, muitas pesquisas vêm sendo realizadas desde a década de 90 utilizando a técnica de FES, inclusive utilizando substratos agroindustriais. Resultados promissores foram obtidos com a produção de até 10 g de GA<sub>3</sub> /kg de substrato, resultados estes provenientes de ensaios em escala laboratorial (KUMAR e LOUSANE, 1990; MACHADO, 2002; RODRIGUES, 2010; OLIVEIRA, 2012).

## 2.3 PROPRIEDADES DO ÁCIDO GIBERÉLICO (GA<sub>3</sub>)

### 2.3.1 Propriedades físico-químicas

O Ácido Giberélico, caracterizado quimicamente como ácido tetracíclico dihidroxi- $\gamma$ -lactônico, possui fórmula química representada por C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub> e sua estrutura química representada segundo a Figura 1 (RODRIGUES *et al.*, 2011). É um sólido cristalino branco, com massa molecular de 346,37 g/mol e de ponto de fusão: 233 - 235 °C (O'NEIL, 2001).

Figura 1 - Estrutura química do Ácido Giberélico (GA<sub>3</sub>).



Fonte: (RODRIGUES *et al.*, 2011).

Sua solubilidade em água pode alcançar 5 g/L, porém, pode ser mais facilmente solubilizado em solventes orgânicos como etanol, metanol, acetato de etila, acetato de butila e acetonas (MANDER, 1992). Apresenta boa estabilidade química quando seco, mas é instável quando em solução aquosa com pH maior que 3. O tempo de meia vida do GA<sub>3</sub> diluído em solução aquosa é da ordem de 14 dias em temperatura de 20°C e de 2 horas em temperatura de 50°C. Quando dissolvido em solução aquosa possui pH entre 3-4 (PALMER, 1971).

### 2.3.2 Aplicações

A giberelina mais detectada e ativa em plantas é o ácido giberélico. Os tecidos vegetais contêm normalmente, apenas cerca de 0,001 a 1,0 mg de equivalentes de ácido giberélico por quilograma de peso fresco de matéria vegetal (PHINNEY, 1983).

O GA<sub>3</sub> presente nos tecidos vegetais possui diversas funções no desenvolvimento das plantas. Assim, a partir desta observação, esse hormônio passou a ser aplicado em formulações agrícolas. Como exemplos tem-se a aplicação de GA<sub>3</sub> no processo de malteamento da cevada, germinação dos tubérculos de batata-inglesa, aumento no tamanho das bagas de uva, processo de fertilização de certas frutíferas, aumento gerado nas distâncias intermodais de algumas espécies vegetais, indução na floração de certas espécies de plantas, minimização na deterioração e amadurecimento de alguns tipos de frutas, auxílio no enraizamento de plantas (DE MALACH, SACHS e ROTEM, 1976; ESCHER *et al.*, 2000; YU *et al.*, 2006; PIEROTTY, OTÁLVARO e ALGECIRA, 2006).

## 2.4 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE GA<sub>3</sub>

Uma grande variedade de microrganismos são capazes de produzir GA<sub>3</sub>. Alguns exemplos de bactérias produtoras são as *Azotobacter* e *Azospirillum*, além de vários fungos como *Sphaceloma* sp., *Phaeosphaeria* sp., *Neurospora* sp., *Fusarium moniliforme* e *Gibberella fujikuroi* (RANGASWAMY *et al.*, 2008).

Industrialmente, o fungo ascomiceto *Gibberella fujikuroi* (renomeado recentemente de *Fusarium fujikuroi*) é o mais utilizado para a produção do hormônio, porém sua fase assexuada *Fusarium moniliforme*, também pode ser utilizada (BRUCKNER e BLECHSCHMIDT, 1991).

Os microrganismos do gênero *Fusarium*, em meio de cultivo Batata – Dextrose – Ágar (BDA) apresentam inicialmente coloração branca, podendo alterar a mesma para uma coloração cinza, púrpura ou laranja com o passar do tempo. Ainda, a diferença entre os estágios sexuado e assexuado somente é perceptível em microscópio (LESLIE e SUMMERELL, 2006).

Inicialmente, a taxonomia deste gênero encontrava-se pouco estudada, porém, atualmente, ela encontra-se estabelecida conforme segue abaixo:

TAXONOMIA (NCBI, 2002)

Superreino: Eukaryota

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota (fungos verdadeiros)

Subfilo: Pezizomycotina (também chamados Euascomycota)

Classe: Sordariomycetes (também chamados Pyrenomycetes)

Subclasse: Pyrenomycetideae (SILVEIRA, 1981)

Ordem: Hypocreales

Família: Nectriceae

Gênero: *Gibberella*

Espécie: *fujikuroi*

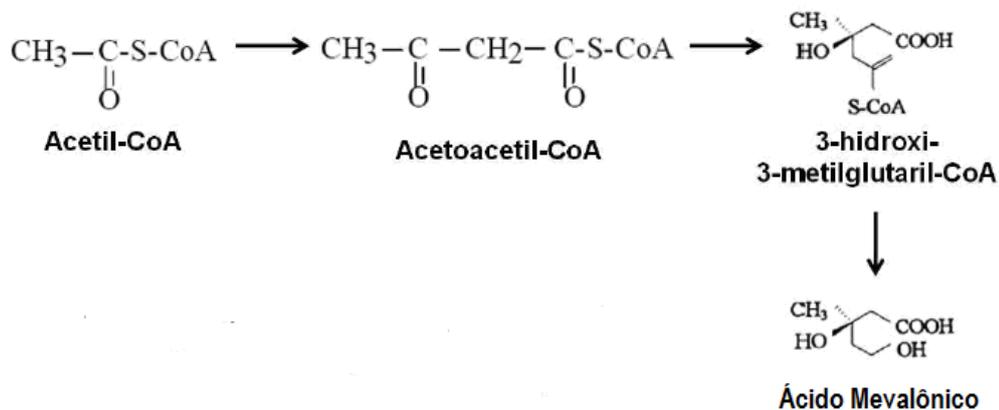
## 2.5 BIOSÍNTESE DAS GIBERELINAS

Segundo Demaind (1989), estudos mostram que a rota de biossíntese de produção das giberelinas em plantas e em microrganismos são similares. Também, devido à elevada

capacidade de formação de giberelina, o fungo *Gibberella fujikuroi* tem sido amplamente utilizado em estudos biossintéticos.

As GAs fúngicas são diterpenóides formados através da via do ácido mevalônico (MVA). O MVA é formado a partir de 3 moléculas de acetil coenzima A (CoA) conforme pode ser visto na Figura 2 (TUDZYNSKI, 2005).

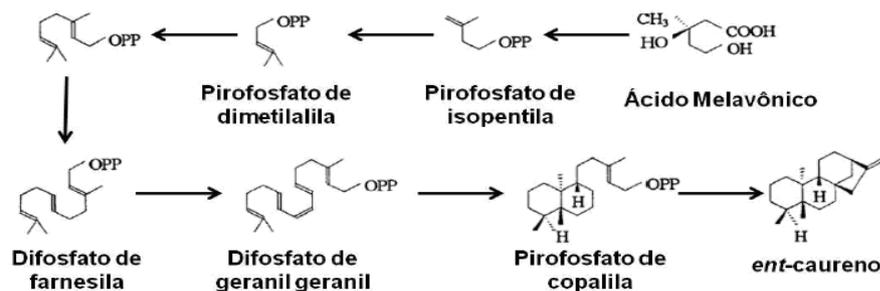
Figura 2 - Biossíntese do ácido mevalônico.



Fonte: Adaptado de TUDZYNSKI (2005).

Após esta etapa, como mostra a Figura 3, o MVA é convertido sucessivamente em isopentenil, dimetilalil, geranyl e pirofosfatos farnesilo para geranyl-geranyl-pirofosfato (GGPP). O GGPP é ciclizado pela enzima ent-caureno sintetase em copalil pirofosfato, o qual é ciclizado novamente formando o ent-caureno, precursor direto da giberelina (BRUCKNER e BLECHSCHMIDT, 1991).

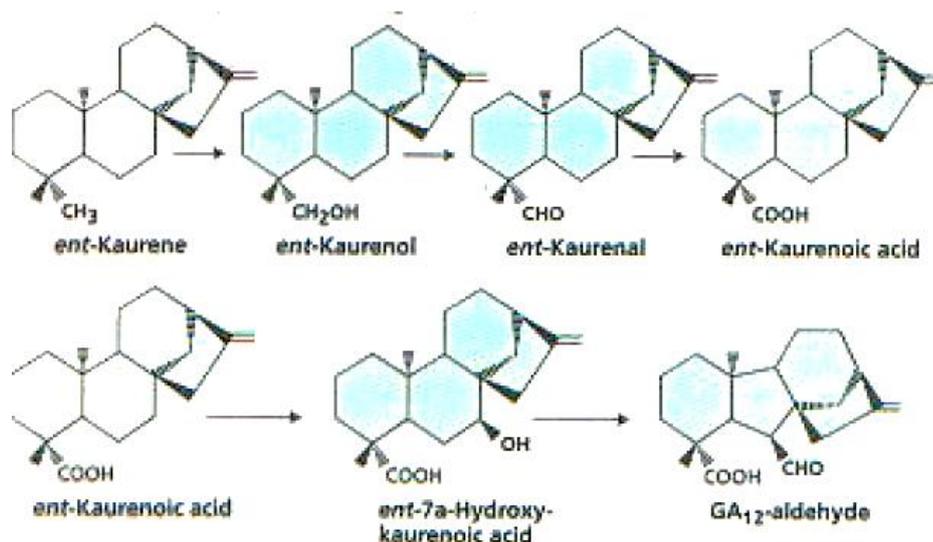
Figura 3 - Biossíntese do geranyl-geranyl pirofosfato (GGPP).



Fonte: Adaptado de TUDZYNSKI (2005).

A Figura 4 mostra o ent-caureno sendo convertido por oxidações sucessivas em ent-caurenol, ent-caurenal, ácido ent-caurenóico, ácido 7-a-hidroxicaurénóico e finalmente em GA<sub>12</sub> – aldeído (TUDZYNSKI, 2005).

Figura 4 - Biossíntese do GA<sub>12</sub> - aldeído.

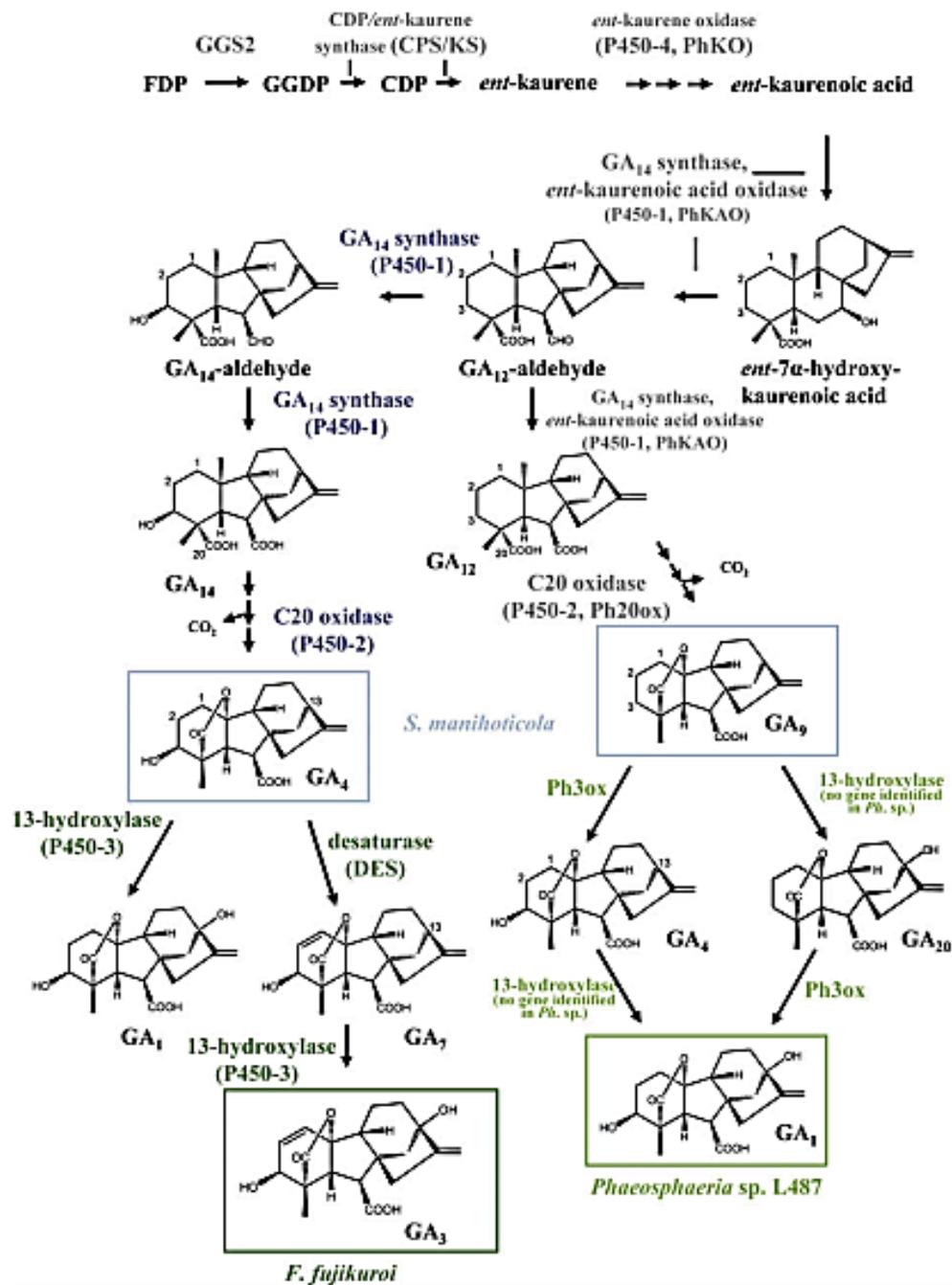


Fonte: Adaptado de MOSS (1982).

A Figura 5 ilustra as etapas envolvidas na produção das diferentes giberelinas bem como quais as enzimas envolvidas nas reações.

O GA<sub>12</sub>-aldeído pode ser precursor de 2 vias distintas que formaram diferentes componentes. Na primeira rota, o GA<sub>12</sub>-aldeído é 3b-hidroxilado a GA<sub>14</sub>-aldeído que, quando oxidado no carbono C-7 forma o GA<sub>14</sub>. Este, por sua vez, sofre oxidação do carbono C-20 para formar o GA<sub>4</sub>. A desnaturação de GA<sub>4</sub> entre os carbonos C - 1,2 resulta na formação de GA<sub>7</sub>, que é convertido para o produto principal da *G. fujikuroi*, GA<sub>3</sub>, por hidroxilação no carbono C-13 (HEDDEN *et al.*, 1974). O GA<sub>1</sub> é formado como um produto em menor concentração da hidroxilação no carbono C-13 da molécula de GA<sub>4</sub> (MACMILLAN, 1997).

Figura 5 - Biossíntese de diferentes GAs até serem formadas as giberelinas bioativas  $GA_1$  e  $GA_3$ .



Fonte: Adaptado de BÖMKE e TUDZYNSKI (2009).

Já na segunda rota, o  $GA_{12}$ -aldeído é convertido em  $GA_{12}$ , que é então oxidado primeiro no carbono C-20 para formar a giberelina  $GA_9$ . Esta última pode sofrer uma reação de hidroxilação no carbono C-13 ou C-3 formando, respectivamente a giberelina  $GA_{20}$  e  $GA_4$ .

Finalmente, a giberelinas GA<sub>20</sub> e GA<sub>4</sub> sofrem uma ultima reação de hidroxilação nos carbonos C-3 e C-13 respectivamente formando a giberelina bioativa GA<sub>1</sub> (HEDDEN et al., 2002).

## 2.6 MÉTODOS DE OBTENÇÃO DO GA<sub>3</sub>

O Ácido Giberélico pode ser obtido por síntese química, extraído diretamente das plantas e por processo de fermentação microbológica. O processo de síntese química envolve muitas etapas de reação e usa reagentes caros inviabilizando, atualmente, sua produção para fins comerciais, quando comparado com o produto obtido por processo fermentativo. A extração direta de GA<sub>3</sub> de plantas, também não é economicamente viável devido à baixa concentração do produto de interesse nos tecidos das mesmas. Um grande número de bactérias, leveduras e fungos são reportados na literatura como produtores do hormônio, porém nem todos podem produzi-los em níveis comerciais (JEFFERYS, 1970; VASS e JEFFERYS, 1979).

Atualmente, o Ácido Giberélico é produzido pelo processo de fermentação, utilizando fungos, sendo que as técnicas mais estudadas são: fermentação submersa e fermentação em estado sólido (SHUKLA, SRIVASTAVA e CHAND, 2003).

### 2.6.1 Fermentação submersa (Fsub)

É a partir desta técnica que o GA<sub>3</sub> vem sendo produzido industrialmente utilizando cepas de fungos *Gibberella fujikoroii* ou *Fusarium moniliforme*. O processo ocorre em um reator, onde a cepa de fungo encontra-se suspensa juntamente com uma solução contendo os nutrientes necessários para seu desenvolvimento (BANDELIER, RENAUD e DURAND, 1997).

A produção deste hormônio por esta técnica é influenciada por uma grande quantidade de fatores físicos (pH, temperatura, luz, taxa de aeração e velocidade de agitação), além de fatores nutricionais (fontes de Carbono e Nitrogênio, relação C/N e sais minerais), sendo necessária a otimização de todos estes parâmetros para o desenvolvimento comercial do processo (SHUKLA, SRIVASTAVA e CHAND, 2003).

Os resultados obtidos na produção de GA<sub>3</sub> utilizando o processo de Fsub variam bastante para o tipo de meio líquido empregado, onde foram observados em estudos produções de cerca de 0,5 g/L de hormônio utilizando meio contendo glicose e glicina (HOLLMANN et al, 1995), 2,87 g/L de GA<sub>3</sub> utilizando meio contendo glicose e farelo de

arroz (ESCAMILLA *et al.*, 2000), chegando a produções de cerca de 15 g/L de Ácido Giberélico, utilizando meio líquido com sacarose descrito na patente do Reliance Life Sciences Private Limited (2008).

Pelo fato do GA<sub>3</sub> encontrar-se bastante diluído no meio aquoso, altos custos envolvidos no processo de purificação, dificuldade de disposição e tratamento dos resíduos apresentam-se como entraves deste processo. Novas técnicas vêm sendo estudadas como a fermentação em estado sólido (FES) para tentar contornar esses problemas (KUMAR e LONSANE, 1989).

## 2.6.2 Fermentação em Estado Sólido (FES)

A Fermentação em Estado Sólido é definida como a fermentação que ocorre sobre um material não solúvel que atue tanto como suporte físico, como fonte de nutrientes na ausência de água livre. A ausência de água livre faz com que nem todos os tipos de microrganismos possam se desenvolver, sendo favorável o desenvolvimento de fungos, leveduras e alguns tipos de bactérias (KUMAR e LONSANE, 1989).

Algumas das vantagens da FES são a produção de metabólitos secundários, produção de altas concentrações de produtos de interesse, menor demanda energética, fermentadores menores, condições ambientais mais próximas das naturais dos microrganismos, utilização de resíduos agroindustriais e processos de extração e purificação mais fáceis que os de Fsub (SHUKLA, SRIVASTAVA e CHAND, 2003).

Mesmo com todas as vantagens apresentadas quando comparada ao processo de Fsub, o processo de FES apresenta entraves que precisam ser estudados para que este processo possa ser utilizado industrialmente. Os principais entraves são a dificuldade de controlar fatores importantes do processo de fermentação como: atividade de água, temperatura, pH, granulometria da matriz sólida, taxa de aeração, aumento de escala dos reatores e dificuldade de manter a assepsia do meio (ROBINSON, SINGH e NIGAM, 2001; HESSELTINE, 1972).

## 2.7 ESTADO DA ARTE DA PRODUÇÃO DE GA<sub>3</sub> POR PROCESSO DE FES UTILIZANDO SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS

Vários estudos foram realizados utilizando diferentes substratos agroindustriais: em casca de mandioca, casca de café e bagaço de laranja seco, em escala laboratorial, obtiveram produções de GA<sub>3</sub> da ordem de 0,25, 0,49 e 5,9 g/kg de substrato respectivamente

(MACHADO, SOCCOL e PANDEY, 2002; MACHADO *et al.*, 2001). Outros estudos internacionais obtiveram resultados expressivos utilizando como substrato farelo de trigo em um reator de 50L e substrato de pinhão manso seco, as produções do hormônio alcançaram valores de 5 e 105 g/kg de substrato, respectivamente (CORONA, SANCHEZ e AUGUSTIN, 2005; RANGASWAMY, 2012).

Contudo, existem outros resíduos com grande potencial de utilização nos processo de FES como Resíduos de Cervejaria e Farelo de Arroz Bruto que já foram estudados para produção de enzimas, biomassa e produção de ácido cítrico mostrando toda sua potencialidade, mas praticamente nenhum estudo foi realizado utilizando estes resíduos para produção de GA<sub>3</sub> (RAJESH, RAJESH e ABACHIRE, 2012; SUMANTHA *et al.*, 2006; SANTOS, 2008).

## 2.8 RESÍDUO DE CERVEJARIA ÚMIDO (RCU) E FARELO DE ARROZ BRUTO (FAB) COMO SUBSTRATO NO PROCESSO DE FES

Os resíduos agroindustriais apresentam um grande potencial para serem usados como substrato no processo de FES, geralmente porque eles cumprem os requisitos de serem bons suportes físicos para o desenvolvimento da FES, apresentam boa porosidade e são fontes de nutrientes (BANDELIER, RENAUD e DURAND, 1996).

### 2.8.1 Resíduo de Cervejaria Úmido (RCU)

Segundo dados da Associação Brasileira da Indústria da Cerveja, no ano de 2014, o Brasil produziu 14 bilhões de litros de cerveja, sendo o terceiro maior produtor mundial, perdendo apenas para China e Estados Unidos (CERVBRASIL, 2015).

Durante o processo de produção da cerveja, mais especificamente nas etapas de filtração do mosto, clarificação do mosto e filtração do caldo fermentado ocorre a formação do RCU. Dados apontam que são gerados em torno de 14-20 kg deste resíduo para cada 100 litros de cerveja produzidos (SANTOS e RIBEIRO, 2005).

Ainda que sua composição varie em função do processo de produção, variedade do malte e época de colheita, o RCU apresenta composição em base úmida de até 60-80% de água, 10-15% de carboidratos, 2-5,5% de proteína bruta e 0,5-2,5% gorduras totais (DEBIAGI *et al.*, 2012).

Devido à sua composição nutritiva, seu baixo custo de aquisição e sua disponibilidade anual, o RCU vem sendo empregado principalmente na alimentação animal. Contudo, quando seco este material apresenta as características importantes de substratos para o processo de FES como boa porosidade, fonte de nutrientes e baixo custo de aquisição (COSTA *et al.*, 2006; PANDEY, SOCCOL e LARROCHE, 2008).

## **2.8.2 Farelo de Arroz Bruto (FAB)**

O arroz é um dos cereais mais produzidos e consumidos no mundo, tendo uma produção mundial estimada do grão de 475 milhões de toneladas, sendo 8,3 milhões de toneladas produzidas no Brasil (USDA/FAS, 2015).

Durante o processo de beneficiamento do arroz para a produção do arroz branco, mais especificamente na fase de polimento dos grãos descascados, é gerado o subproduto farelo de arroz bruto. Aproximadamente, para cada 100 kg de arroz em casca processados são gerados 10 kg de FAB, contabilizando uma produção no Brasil de aproximadamente 0,8 - 1 milhão de toneladas/ano (NOLETO, CORDEIRO e CHAVES, 2004).

Ainda que sua composição varie em função do processo de produção, variedade e época de colheita, o FAB apresenta composição em base úmida de até 10% de água, 50 % de carboidratos, 15% de proteína bruta, 17% gorduras totais e 10% de cinzas (COUTINHO *et al.*, 2013).

Com esta composição rica em nutrientes e por ter um preço relativamente baixo, o FAB tem sido empregado na alimentação de animais e humanos, fonte de carbono e nitrogênio em processos de Fsub e FES (LIMA *et al.*, 2000; SHUKLA, CHAND e SRIVASTAVA, 2005b).

## **2.9 FATORES QUE AFETAM A PRODUÇÃO DO GA<sub>3</sub> NO PROCESSO DE FES**

### **2.9.1 Nitrogênio**

Vários estudos relacionando o efeito da adição de nitrogênio ao substrato no processo de FES têm sido realizados para a produção de GA<sub>3</sub>. De modo geral, o nitrogênio é de suma importância para o processo de desenvolvimento celular do microrganismo diminuindo gradativamente com a sua exaustão. Já a produção do Ácido Giberélico é intensificada

somente após a fonte de nitrogênio ter sido esgotada (JEFFERYS, 1970; KUMAR e LONSANE, 1990; BANDELIER, RENAUD e DURAND, 1996).

Altas concentrações de nitrogênio no substrato reprimem a biossíntese de giberelina. Uma possível explicação para tal fenômeno pode ser pelo fato da desidrogenação de GA<sub>4</sub> para GA<sub>7</sub>, catalisada pela 1,2 – GA<sub>4</sub> desidrogenase ser reduzida pelo excesso de nitrogênio (TUDZYNSKI, 1999; BRUCKNER e BLECHSCHMIDT, 1991).

### 2.9.2 Carbono

O carbono tem um papel importante nas etapas de manutenção celular e crescimento, sendo que o mesmo pode estar presente em compostos facilmente assimiláveis como monossacarídeos ou em compostos complexos como polissacarídeos e lipídios (DORAN, 1998).

Diversos trabalhos têm sido realizados para estudar o efeito das fontes de carbono na produção do GA<sub>3</sub>. Os melhores resultados mostram que uma combinação entre fontes de carbono prontamente assimiláveis como glicose, frutose, sacarose, juntamente com fontes lentamente assimiláveis como amido ou óleos tem apresentado bons resultados na produção do hormônio de interesse (BANDELIER, RENAUD e DURAND, 1996; RANGASWAMY, 2012; e MACHADO, SOCCOL e PANDEY, 2002).

A utilização de fontes prontamente assimiláveis de carbono faz com que se atinja rapidamente a máxima taxa de crescimento celular. Contudo, faz com que seja inibida a produção de metabólitos secundários. Esta “repressão catabólica” ocorre provavelmente devido a intermediários gerados pelo rápido catabolismo da glicose interferindo com enzimas no processo de metabolismo secundário (MARWICK, WRIGHT e BURGESS, 1999).

### 2.9.3 Relação C/N

A influência da relação C/N é frequentemente relatada na literatura para a produção de GA<sub>3</sub>. Em estudos realizados tanto nos processos de Fsub, quanto FES para a produção do ácido giberélico foi verificado que a relação C/N ideal para a máxima produção varia no decorrer da fermentação (RODRIGUES *et al.*, 2011).

Na etapa de crescimento do microrganismo, a relação C/N deve ser baixa situando-se na faixa de 10/1 até 25/1. Contudo, para que haja produção de GA<sub>3</sub>, a relação C/N no meio reacional deve ser alta entre 100/1 até 200/1, ou seja, com baixos teores de nitrogênio. Estes

valores de relação C/N podem ser explicados uma vez que na etapa de crescimento celular é necessária uma maior quantidade de nitrogênio, já na etapa de produção de metabólitos secundários, é importante a presença em quantidade maior de carbono em comparação a de nitrogênio (SHUKLA, CHAND e SRIVASTAVA, 2005b; ESCAMILLA *et al.* 2000; BANDELIER, RENAUD e DURAND, 1996) .

#### **2.9.4 Elementos traços**

Elementos traços como Fe, Cu, Mn, Zn, Al, Mg, K, P, S, Ca e vitaminas são requeridos em processos fermentativos para produção de GAs. Estes elementos podem ser adicionados de maneira sintética ou estarem presentes em combinação com os substratos utilizados (KUMAR e LONSANE, 1989; BRÜCKNER e BLECHSCHMIDT, 1991; MACHADO *et al.*, 2001).

#### **2.9.5 pH**

O pH é um fator muito influente na seleção da giberelina a ser produzida, sendo que o valor inicial empregado em processos de fermentação para a produção de GA<sub>3</sub> encontra-se na faixa de 3,5 até 5,8. O pH usualmente ajustado nestes tipos de fermentações encontra-se por volta de 5,5 (RODRIGUES *et al.*, 2011).

Medir o pH em processos de FES é um tanto quanto complexo, sendo que de modo geral, não é realizado um controle sobre o mesmo durante o processo de fermentação, como resultado os valores finais de pH são normalmente, diferentes dos iniciais (GELMI *et al.*, 2000 e MACHADO *et al.*, 2001).

#### **2.9.6 Atividade de água ( $a_w$ )**

A atividade de água tem um efeito significativo no crescimento microbiano, esporulação e produção de metabólitos primários e secundários (DORAN, 1998). Os estudos realizados na produção de GA<sub>3</sub> mostram que existe uma  $a_w$  ótima em torno de 0,99 para o crescimento do microrganismo e outra faixa ótima de  $a_w$  entre 0,98 e 0,999 para a produção do ácido giberélico (GELMI *et al.*, 2000 e CORONA, DORIS e AGOSIN, 2004).

### 2.9.7 Temperatura

De modo geral, empregando cepas de *G. fujikuroi* ou *F. moniliforme* estudos mostram que existe uma faixa de temperatura ótima para o desenvolvimento do microrganismo e outra para a máxima produção do Ácido Giberélico. Para a máxima velocidade de crescimento dos microrganismos a faixa de temperatura ótima encontra-se entre 25-28°C, já para a máxima velocidade de produção de GA<sub>3</sub>, a faixa de temperatura ótima encontra-se entre 28-31°C (BORROW *et al*, 1964, GELMI *et al*, 2000 e RANGASWAMY, 2012),

### 2.9.8 Aeração

O processo de aeração do meio em FES tem um papel fundamental na obtenção de bons resultados na fermentação. Quanto maior a altura da camada de substrato mais difícil o processo de difusão do ar ao longo da mesma, fato este que pode ser minimizado com a aeração forçada do meio (DURAND, 1998).

As taxas de aeração empregadas no processo de FES para a produção GA<sub>3</sub> encontradas na literatura são muito variadas sendo os valores encontrados desde 0,18 até 1,8 L de ar/hora.kg de substrato (MACHADO, 2002; BANDELIER *et al*, 1997; GELMI *et al*, 2000 e RODRIGUES, 2010).

No estudo mais detalhado Machado (2002) mostra que existe uma taxa de aeração ótima para a etapa de crescimento do microrganismo, que se encontra na faixa de 0,18 L de ar/hora.kg de substrato e outra taxa de aeração mais alta na faixa de 0,74 L de ar/hora.kg de substrato na etapa de produção de GA<sub>3</sub>. O autor justifica que taxas de aeração elevadas agitam o meio e impedem o desenvolvimento dos microrganismos, já a formação do GA<sub>3</sub> ocorre por várias etapas oxidativas, deste modo taxas de aeração mais elevadas, até um valor ótimo, tem efeito positivo na produção do metabólito de interesse.

## 2.10 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO GA<sub>3</sub>

A extração e purificação do GA<sub>3</sub> são etapas importantes no processo de produção do fitohormônio, uma vez que o mesmo encontra-se disperso em um meio de fermentação com diversos tipos de macromoléculas orgânicas provenientes do processo fermentativo (RODRIGUES, 2010).

Diversos solventes são empregados na literatura para realizar a extração do ácido giberélico do meio de FES, dentre eles, podemos citar: a água, solução 0,1 M de NaOH, acetato de etila, solução aquosa de etanol 10% (v/v), tampão acetato e fosfato com pH entre 7,4-8,0 (RANGASWAMY, 2012; QIAN, PREEZ e KILIAN, 1994; MACHADO *et al.*, 2001; BANDELIER, RENAUD e DURAND, 1996 e RODRIGUES *et al.*, 2009)

Após obter o extrato fermentado utilizando algum dos solventes descritos anteriormente, é necessário realizar a purificação do caldo antes da análise para quantificação do GA<sub>3</sub>. A técnica de purificação e o número de etapas de realização da mesma dependem basicamente do grau de pureza do produto de interesse e da técnica de quantificação analítica (RODRIGUES, 2010).

As técnicas de purificação empregadas com maior frequência encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Técnicas de purificação relatadas na literatura.

<b>Técnica</b>	<b>Autores</b>
Centrifugação ou filtração do extrato fermentado.	RANGASWAMY, 2012.
Precipitação de macromoléculas utilizando acetato de zinco e ferrocianato de potássio.	BANDELIER, RENAUD E DURAND, 1996.
Adsorção em carvão ativado.	RODRIGUES, 2010.
Extração líquido/líquido com acetato de etila, seguida de evaporação do solvente.	RANGASWAMY, MUMBAI E BALU, 2008.
Colunas de sílica C-18.	MACHADO <i>et al.</i> , 2001.

### 3 ARTIGO: PRODUCTION OF GIBBERELIC ACID USING RICE BRAN AND MALT RESIDUE MIXTURE FROM *Gibberella fujikuroi* BY SOLID STATE FERMENTATION

Werle, L.B.; Abaide, E.R.; Felin, T.H.P.; Kuhn, R.C.; Jahn, S.L.; Mazutti, M A.\*

Department of Chemical Engineering, Federal University of Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Santa Maria 97105-900, Brazil

#### Abstract

The aim of this work was the production of gibberelic acid (GA<sub>3</sub>) by solid-state fermentation of *Gibberella fujikuroi* using a mixture of two agroindustrial waste. The rice bran and malt residue, the moisture and amount of inorganic nitrogen were parameters evaluated in the fermentative process. After 06 days of the cultivation, the best yield of GA<sub>3</sub> was 0.93 g/kg of substrate under optimum condition (65.95% of moisture; 10.12% of rice bran and 1.6 g inorganic nitrogen/kg of substrate). The better conditions were to use in a kinetic profile of GA<sub>3</sub>, where the maximum production of gibberelic acid was 1.31 g/kg of substrate after 10 days of fermentation. From the obtained GA<sub>3</sub> production it was possible to verify that the mixture of rice bran and malt residue is an interesting substrate for the production of GA<sub>3</sub> by SSF.

**Keywords:** gibberelic acid, solid state fermentation, crude rice brain, malt residue, *Gibberella fujikuroi*.

#### 1 Introduction

Gibberelic acid (GA<sub>3</sub>) is a phytohormone belonging to the group of gibberellins. GA<sub>3</sub> has been widely used in agricultural formulations, since it allows an increase in productivity in different types of crops (Rodrigues et al., 2009). The application of the gibberelic acid present some advantageous such as promote and regulate the plant growth, it cause dormancy to break, induce flowering and enzymatic activity and delay the early maturation of harvested fruits (Dissanayake et al., 2010; Meleigy and Khalaf, 2009).

The solid state fermentation (SSF) has been used to produce GA<sub>3</sub> due the low yield in some industrial processes used to produce GA<sub>3</sub> and the laborious techniques to recovery the

metabolite from the liquid medium (Molaverdi et al., 2013; Rodrigues et al., 2012). In the SSF is possible to obtain higher concentrations of metabolite of interest ( $GA_3$ ), the main advantage from this process is the exploitation of different agroindustrial residues as substrate in the fermentation, therefore, this solve several problems of environmental pollution (Castro and Sato, 2013; Cheirsilp and Kitcha, 2015).

Brazil is an agro-industrial country, which has a large amount of waste from this activity (Werle et al., 2013). In the southern region of the country, two widely-generated residues are crude rice bran (CRB) and malt residue (MR). Crude rice bran represents 10% by weight of the total products of the rice in shell processing (EMBRAPA, 2004). In the brewing industry, the malt residue is the residue of the beer production process obtained in large quantities, being generated from 14 - 20 kg/100 liters of beer produced (Santos and Ribeiro, 2005). These residues only were already studied in the SSF process for the production of enzymes, biomass and citric acid production, however, no study was carried out using these residues to production of the gibberellic acid ( $GA_3$ ) (Heck et al., 2006; Rajesh et al., 2012; Sumantha et al., 2006)

Furthermore, the novelty of this work was a production of  $GA_3$  using agroindustrial residues, since there are no studies using mixture of rice bran and malt residue as a substrate of the SSF using *Gibberella fujikuroi* for  $GA_3$  production. The main aim of the study was optimizing the production of  $GA_3$ , in the fermentation process the moisture, proportion (crude rice bran/ malt residue) and amount of inorganic nitrogen were evaluated.

## **2 Materials and Method**

### **2.1 Microorganism**

*Gibberella fujikuroi* was purchased from the Department of Agriculture Agricultural Research Service (Peoria, IL, USA).

### **2.2 Substrate**

Malt residue (MR) and crude rice bran (CRB) are provided by Brewery and Rice beneficiary both located in Santa Maria (Brazil). The substrates were dried with air recirculation for 5 days at a temperature of 50 °C until the mass remained constant. The characterization of substrates, in relation to moisture, proteins, lipids, starch and total sugar was performed using the methodology described by Helrich (1990).

### 2.3 Inoculum preparation

Stock cultures of *G. fujikuroi* were propagated on potato dextrose agar (PDA) using Petri plates at 28 °C for 10 days. For pre-inoculum preparation, 2 mycelial discs (12 mm of diameter) were placed in 250 ml Erlenmeyer flasks, containing 100 ml of fermentation medium composed by (g/L): (200) potato, (20) dextrose, (20) peptone, (7.5) yeast extract, (2) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (1) FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, (1) MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, (0.5) MgSO<sub>4</sub> and pH 5 – 5.5. In the sequence, the inoculum was incubated in an orbital shaker (Tecnal, TE-240, Brazil) for 2 days at 28°C and 120 rpm.

### 2.4 Solid State Fermentation (SSF)

Fermentations were carried out in beakers (600 ml) containing 20 g of solid substrate (mixing of rice bran and malt residue). The proportions were according with experimental design. Before fermentations, the solid substrate was supplemented with nutrients with composition (g/kg of substrate): (40) glucose, (1.0) FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, (0.5) MgSO<sub>4</sub>, (1.0) MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, (0.2) ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, and (0.2) CuSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Machado et al., 2002; Rodrigues et al., 2009; Shukla et al., 2005). Beakers were autoclaved at 121°C for 30 min. After cooling, each beaker was adding with 15% of inoculum (Rodrigues et al., 2009). The fermentations were carried out for 7 days in a chamber (POL-EKO, model KK 350) with temperature (28 ± 2 ° C) and humidity control adjusted by 90%.

### 2.5 Central composite rotational design (CCRD)

Central composite rotational design 2<sup>3</sup> totaling 17 experiments, with 3 replications for the central point was performed to investigate the influence of initial moisture content (50 to 70%), proportion of the rice bran (0 to 50 wt.%) and inorganic nitrogen content (0 to 2 g/kg of substrate). The experimental design variables were defined through preliminary trials.

### 2.6 Kinetics for production of GA<sub>3</sub>

Analyzing the results of the experimental design, a kinetic analysis of the metabolite production was performed in the best condition of DCCR for production of the gibberellic acid (GA<sub>3</sub>). Samples were collected in triplicate during 12 days every 48 hours for the determination of the production of the metabolite. During the experiment the moisture of the substrate were determined.

## **2.7 Analytical procedure**

### **2.7.1 Sample preparation**

The gibberellic acid was extracted by the method developed by (Escamilla et al., 2000). Initially, extraction of the GA<sub>3</sub> from the solid medium was carried out with phosphate buffer (pH = 7.4) in a ratio 3/1 (v/wt.), under agitation of 120 rpm for 20 minutes. After, the solution was filtered and the solid material was extracted with buffer in the same ratio. The filtrate was subjected to a liquid / liquid extraction process using ethyl acetate (solvent) in the ratio of 1/1 (v/v) for two times. Finally, the organic phase containing the metabolite was evaporated at 48 °C, 8 rpm and the crystals obtained were dissolved in 10 ml of ethanol 95% (Rangaswamy, 2012; Rodrigues et al., 2009).

### **2.7.2 GA<sub>3</sub> determination**

The GA<sub>3</sub> quantification was performed using method of Holbrook et al. (1961). Firstly, 1 mL of the sample of GA<sub>3</sub> dissolved in ethanol 95% was added in 9 mL of a 3.5 M solution of HCl and allowed to react for 60 min at 20°C. After the reaction time, the absorbance of the standards was measured at a wavelength of 254 nm.

### **2.7.3 Moisture determination**

The moisture content of the substrate during the solid state fermentation kinetics was determined at 105 °C in an infrared moisture analyzer (GEHAKA, IV2000) following the methodology of Pitarelo et al. (2012). The determination of moisture was performed in triplicate.

## **2.8 Statistical analysis**

All the results were analyzed using the software Statistica® 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA), considering a significance level of 90%.

## **3 Results and Discussion**

### **3.1 Substrate characterization**

Composition of crude rice bran (wet basis) and malt residue are presented in Table 1. Starch is the major component in both residues with values close to 30 wt%. On the other hand, other parameters such as moisture, proteins and lipids presented differences for the two types of residues. The experimental data for the moisture of CRB, protein and lipids are in agreement with the literature (Amissah et al., 2003; Sunphorka et al., 2012). Similar results

with the literature also was observed for moisture, protein and lipid in the malt residue (Adeniran et al., 2008; Khidizer et al, 2010; Mussato et al, 2008). The amount of total sugar for both substrates is low, practically insignificant. Also, it is important to emphasize that the composition could be affected by factors such as crop variety, soil characteristics and grain processing. The composition of the residues shows that both are interesting to be used as substrate for the production of GA<sub>3</sub> by SSF, due large amount of carbon and a high C/N ratio, around 80-100, ideal for the maximum production of GA<sub>3</sub> (Rodrigues et al., 2012; Shukla et al., 2005).

**Table 1** - Composition of crude rice bran and malt residue.

<b>Analysis</b>	<b>g/100 g CRB</b>	<b>g/100 g MR</b>
Moisture	10.29 ± 1.44	6.37± 1.67
Proteins	11.24 ± 0.98	18.32± 1.21
Lipids	14.23 ± 0.36	5.02± 0.54
Starch	31.11 ± 1.73	29.47± 2.04
Total sugar	< LOD*	3.40± 0.25

\*limit of detection

CRB: crude rice bran

MR: malt residue

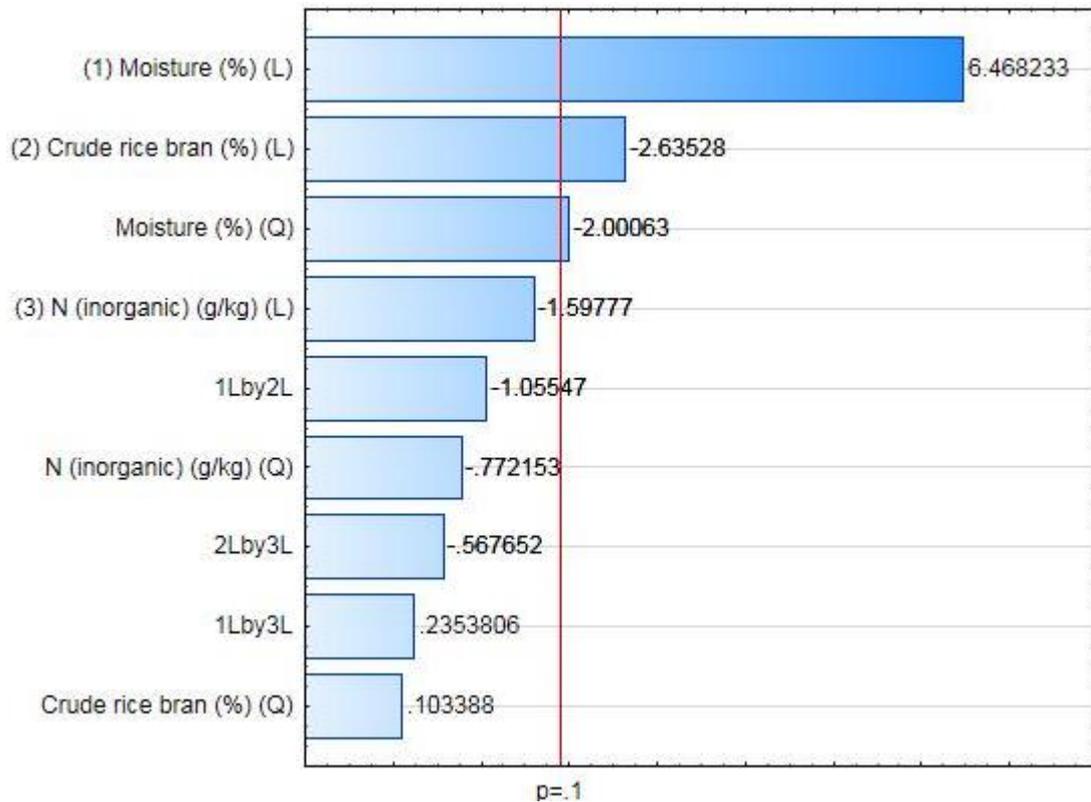
### 3.2 Solid state fermentation

Table 2 shown the results of the production of GA<sub>3</sub> (mg/kg) by the solid state fermentation, which ranged from 357.76 mg/kg of substrate (run 9) to 934.41 mg/kg of substrate (run 6). These values were better than results obtained by (Machado et al., 2002) using as substrate cassava husk (492 mg of GA<sub>3</sub>/kg of substrate). On the other hand, these values are lower than obtained by Corona et al. (2005) which produced 4,500-5,000 mg of GA<sub>3</sub>/kg of substrate, using as substrate wheat bran and starch. Analyzing the assays 5 and 6 is possible observe the importance of moisture in the production of GA<sub>3</sub>, this effect was also verified by Machado et al. (2002) and Rodrigues et al. (2009).

**Table 2** - Matrix of the CCRD to evaluate the influence of moisture (%), crude rice bran % and N (inorganic)(g/kg) in GA<sub>3</sub> production by solid state fermentation.

Assay	Moisture (%)	Crude Rice Bran( %)	N (inorganic)(g/kg)	Yield of GA <sub>3</sub> (mg/kg)
1	54.05 (-1)	10.12 (-1)	0.40 (-1)	495.43
2	65.95 (+1)	10.12 (-1)	0.40 (-1)	826.13
3	54.05 (-1)	39.88 (+1)	0.40 (-1)	415.92
4	65.95 (+1)	39.88 (+1)	0.40 (-1)	710.71
5	54.05 (-1)	10.12 (-1)	1.60 (+1)	478.86
6	65.95 (+1)	10.12 (-1)	1.60 (+1)	934.41
7	54.05 (-1)	39.88 (+1)	1.60 (+1)	424.21
8	65.95 (+1)	39.88 (+1)	1.60 (+1)	652.77
9	50.00 (-1.68)	25.00 (0)	1.00 (0)	357.76
10	70.00 (+1.68)	25.00 (0)	1.00 (0)	830.63
11	60.00 (0)	0.00 (-1.68)	1.00 (0)	847.18
12	60.00 (0)	50.00 (+1.68)	1.00 (0)	653.14
13	60.00 (0)	25.00 (0)	0.00 (-1.68)	852.47
14	60.00 (0)	25.00 (0)	2.00 (+1.68)	518.06
15	60.00 (0)	25.00 (0)	1.00 (0)	725.74
16	60.00 (0)	25.00 (0)	1.00 (0)	683.06
17	60.00 (0)	25.00 (0)	1.00 (0)	710.34

Table 2 were used to evaluate the effects of independent variables considering a significance level of 90 % ( $p < 0.1$ ) (Fig. 1). Moisture and CRB presented significant effects ( $p < 0.1$ ). Moisture presents a positive linear effect, which means that the response will be higher as the moisture increase, and a negative quadratic effect, the negative signs of the quadratic term indicate the presence of a maximum point for moisture in the evaluated range. The CRB in the substrate presented only a negative linear effect on the production of GA<sub>3</sub>, which means that the response will be higher as the CRB decrease.



**Figure 1** - Pareto chart for moisture (%), crude rice bran % and N (inorganic)(g/kg) in the production of GA<sub>3</sub> by solid state fermentation.

Inorganic nitrogen did not presented significant effect ( $p < 0.1$ ), it could be explain for the faster consume of nitrogen in the first days of the fermentation. Therefore, exhausted from the medium, the inorganic nitrogen had no effect on the production of GA<sub>3</sub>, the same was also verified by Machado et al. (2002).

The Pareto chart shows that variable of larger influence on the production of GA<sub>3</sub> was the moisture, followed by the crude rice bran concentration. The interaction between them was not statistically significant in the range studied. Still the quadratic effects for moisture content were significant for GA<sub>3</sub> yield.

In order to optimize the experimental condition to obtain maximum production of GA<sub>3</sub>, an empirical model is presented in Eq. 1 that presents the significant terms ( $p < 0.1$ ) concerning to production of GA<sub>3</sub> in solid state fermentation.

$$GA_3 = 692.89 + 308.39.M - 97.098.M^2 - 125.64.CRB \quad (1)$$

Where GA<sub>3</sub> is the production of GA<sub>3</sub> (mg/kg) and M and CRB are the coded variables for moisture content and crude rice bran, respectively. This model was validated by analysis

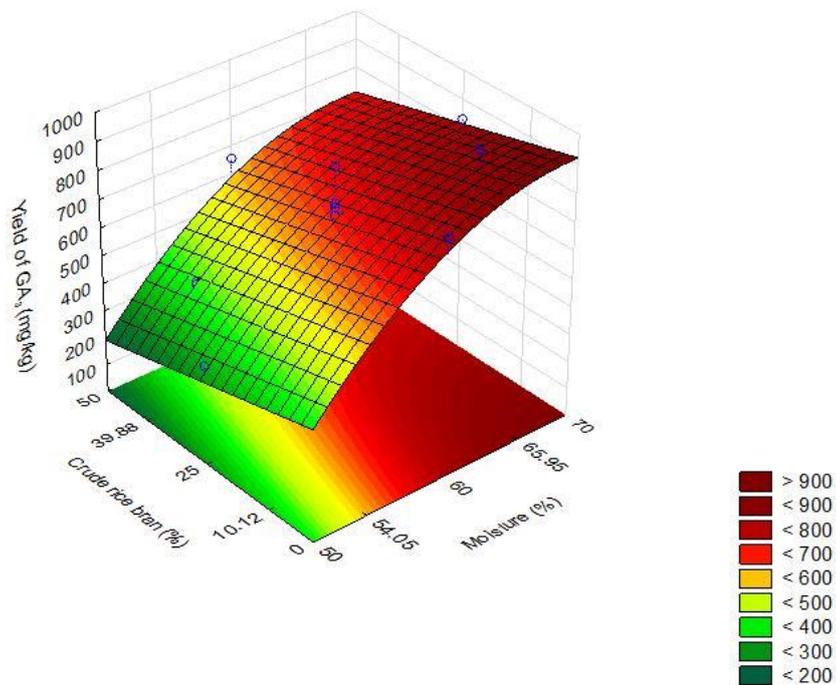
of variance (ANOVA), the calculated F test was about 7.6 times greater than the tabulated ones for significance at  $p=0.1$  (Table 3), and the determination coefficient ( $R^2$ ) was 0.8176.

**Table 3** - ANOVA for GA<sub>3</sub> production.

Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean Square	F
Regression	408883.2	3	136294.4	19.43
Residue	91197.4	13	7015.2	
Total	500080.6	16		

$$F_{3,13,10} = 2.560$$

The high value for the determination coefficient indicates good fitting of experimental data, allowing the use of the model to predict process performance as well as to use them as tool for process optimization. The Fig. 2 presents the influence of moisture and crude rice bran concentration on the production of GA<sub>3</sub>.



**Figure 2** - Response surface showing the influence of moisture content and CRB on production of GA<sub>3</sub> by solid state fermentation.

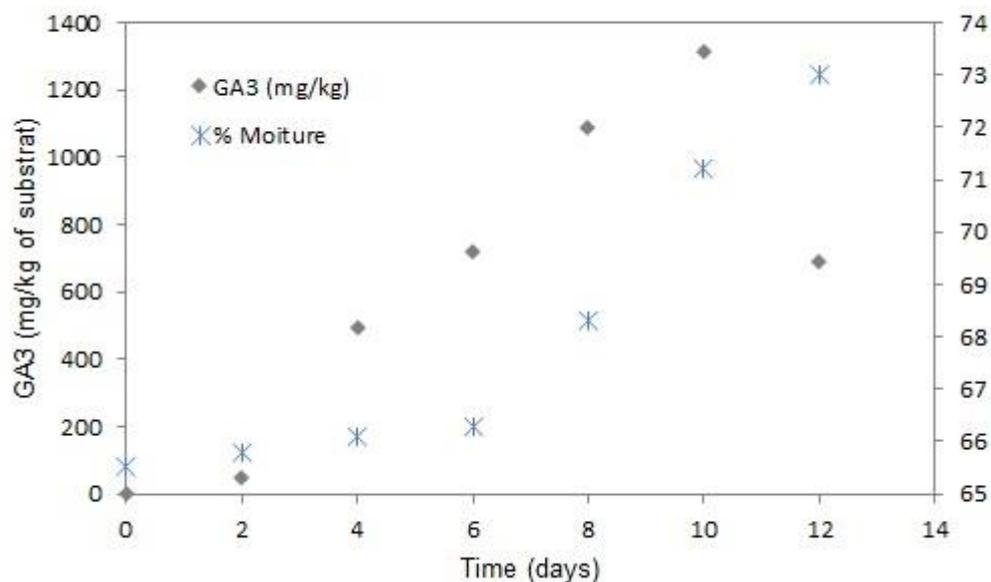
The best GA<sub>3</sub> yield (934.41 mg/kg) was found in assay 6, where, was used 65.95%, 10.12 % and 1.60 g/kg of moisture, CRB and inorganic nitrogen, respectively. In the Fig. 2 is observed a positive effect of the moisture content, and the negative effect of the variable CRB. Machado et al. (2002) and Rodrigues et al. (2009) observed a significant positive effect for moisture, in the GA<sub>3</sub> production in SSF, the optimum moisture content was 75% and 70%, respectively. On the other hand, low yield of GA<sub>3</sub> was verified in the assay 9 with low moisture content and high CRB. The negative effect of the addition of rice bran is probably due to the compaction of the medium, causing damages in the transference of heat and mass (Machado et al., 2004).

### **3.3 Kinetic profile of GA<sub>3</sub> production**

The kinetic of GA<sub>3</sub> production was evaluated in better experimental condition of the DCCR (run 6). Fig. 3 demonstrate that in the first days of fermentation the production of the metabolite was low, increasing gradually until on the 10th day it reached approximately 1.3 g GA<sub>3</sub>/kg substrate. This behavior is characteristic of the kinetics of secondary metabolites such as gibberellic acid (Machado et al., 2002).

The concentration of the GA<sub>3</sub> decreased after the 10th day, this phenomenon also was verified by Bandelier et al. (1996). It probably occurred by the decomposition of the product of interest in other compounds due to its instability under certain conditions of the environment in which it is found (Gelmi et al., 2002).

The moisture content in the substrate changed from an initial value (65.5%) to 72% during 12 days of the fermentation. The increased in moisture content could be explain for the air saturated injected inside incubator, however, a significant mass transfer occurred in the system. This hypothesis was confirmed by Machado et al. (2002) where without aeration and humidity control of the air, the moisture of the fermentation medium gradually decreased.



**Figure 3** - Kinetic of the GA<sub>3</sub> production and moisture content during SSF.

#### 4 Conclusion

Moisture and proportion of crude rice bran and malt residue had a significant effect ( $p < 0.1$ ) on the production of GA<sub>3</sub> by SSF. The maximum GA<sub>3</sub> production was 934.41 mg/kg of substrate, in the condition, 65.95%, 10.12 % and 1.60 g/kg for moisture, CRB and inorganic N, respectively. A production of approximately 1300 mg/kg of substrate was reached on the 10th day of fermentation in the kinetic. This work demonstrated that the mixture of rice bran and malt residue is an interesting substrate for the production of GA<sub>3</sub> by SSF.

#### Acknowledgments

The authors thank CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for the financial support of this work as well as CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for scholarships.

#### References

Adeniran, H.A., Abiose, S.H., Ogunsua, A.O., 2008. Production of fungal  $\beta$ -amylase and amyloglucosidase on some nigerian agricultural residues. *Food Bioprocess Technol.* 3, 693-698. doi:10.1007/s11947-008-0141-3

- Amissah, J.G.N., Ellis, W.O., Oduro, I., Manful, J.T., 2003. Nutrient composition of bran from new rice varieties under study in Ghana. *Food Control* 14, 21–24. doi:10.1016/S0956-7135(02)00047-6
- Bandelier, S., Renaud, R., Durand, A., 1996. Production of gibberellic acid by fed-batch solid state fermentation in an aseptic pilot-scale reactor. *Process Biochem.* 32, 141–145.
- Castro, R.J.S., Sato, H.H., 2013. Synergistic effects of agroindustrial wastes on simultaneous production of protease and  $\alpha$ -amylase under solid state fermentation using a simplex centroid mixture design. *Ind. Crops Prod.* 49, 813–821. doi:10.1016/j.indcrop.2013.07.002
- Cheirsilp, B., Kitcha, S., 2015. Solid state fermentation by cellulolytic oleaginous fungi for direct conversion of lignocellulosic biomass into lipids: Fed-batch and repeated-batch fermentations. *Ind. Crops Prod.* 66, 73–80. doi:10.1016/j.indcrop.2014.12.035
- Corona, A., Sáez, D., Agosin, E., 2005. Effect of water activity on gibberellic acid production by *Gibberella fujikuroi* under solid-state fermentation conditions. *Process Biochem.* 40, 2655–2658. doi:10.1016/j.procbio.2004.11.008
- Dissanayake, P., George, D.L., Gupta, M.L., 2010. Effect of light, gibberellic acid and abscisic acid on germination of guayule (*Parthenium argentatum* Gray) seed. *Ind. Crops Prod.* 32, 111–117. doi:10.1016/j.indcrop.2010.03.012
- Escamilla S, E.M., Dendooven, L., Magaña, I.P., Parra S, R., De la Torre, M., 2000. Optimization of gibberellic acid production by immobilized *Gibberella fujikuroi* mycelium in fluidized bioreactors. *J. Biotechnol.* 76, 147–155. doi:10.1016/S0168-1656(99)00182-0
- Gelmi, C., Pérez-Correa, R., Agosin, E., 2002. Modelling *Gibberella fujikuroi* growth and GA 3 production in solid-state fermentation. *Process Biochem.* 37, 1033–1040. doi:10.1016/S0032-9592(01)00314-4
- Heck, J.X., Flôres, S.H., Hertz, P.F., Ayub, M.A.Z., 2006. Statistical optimization of thermo-tolerant xylanase activity from Amazon isolated *Bacillus circulans* on solid-state cultivation. *Bioresour. Technol.* 97, 1902–1906. doi:10.1016/j.biortech.2005.08.013
- Helrich, K., 1990. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists: Agricultural chemicals; contaminants; drugs, 15<sup>th</sup> edition. The Association of Official Analytical Chemists, Inc., Virginia, pp 951-995.
- Holbrook, A., Edge W., Bailey F., 1961. Spectrophotometric method for determination of gibberellic acid. *Adv. Chem. Ser.* 28, 159-167. doi: 10.1021/ba-1961-0028.ch018
- Machado, C.M.M., Oishi, B.O., Pandey, A., Soccol, C.R., 2004. Kinetics of *Gibberella fujikuroi* growth and gibberellic acid production by solid-state fermentation in a packed-

- bed column bioreactor. *Biotechnol. Prog.* 20, 1449–53. doi:10.1021/bp049819x
- Machado, C.M.M., Soccol, C.R., de Oliveira, B.H., Pandey, A., 2002. Gibberellic acid production by solid-state fermentation in coffee husk. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 102–103, 179–191. doi:10.1385/ABAB:102-103:1-6:179
- Meleigy, S.A., Khalaf, M.A., 2009. Biosynthesis of gibberellic acid from milk permeate in repeated batch operation by a mutant *Fusarium moniliforme* cells immobilized on loofa sponge. *Bioresour. Technol.* 100, 374–379. doi:10.1016/j.biortech.2008.06.024
- Molaverdi, M., Karimi, K., Khanahmadi, M., Goshadrou, A., 2013. Enhanced sweet sorghum stalk to ethanol by fungus *Mucor indicus* using solid state fermentation followed by simultaneous saccharification and fermentation. *Ind. Crops Prod.* 49, 580–585. doi:10.1016/j.indcrop.2013.06.024
- Mussatto, S.I., Rocha, G.J.M., Roberto, I.C., 2008. Hydrogen peroxide bleaching of cellulose pulps obtained from brewer's spent grain. *Cellulose* 15, 641–649. doi:10.1007/s10570-008-9198-4
- Pitarelo, A.P., Da Silva, T.A., Peralta-Zamora, P.G., Ramos, L.P., 2012. Efeito do teor de umidade sobre o pré-tratamento a vapor e a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. *Quim. Nova* 35, 1502–1509. doi:10.1590/S0100-40422012000800003
- Rajesh, M.J., Rajesh, L., Abachire, L.W., 2012. Optimization of Solid State Fermentation Conditions for the Production of Cellulase by Using *Trichoderma Reesei*. *Eur. J. Appl. Eng. Sci. Res* 1, 196–200.
- Rangaswamy, V., 2012. Improved Production of Gibberellic Acid by *Fusarium moniliforme*. *J. Microbiol. Res.* 2, 51–55. doi:10.5923/j.microbiology.20120203.02
- Rodrigues, C., Vandenberghe, L.P.S., Teodoro, J., Oss, J.F., Pandey, A., Soccol, C.R., 2009. A new alternative to produce gibberellic acid by solid state fermentation. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 52, 181–188. doi:10.1590/S1516-89132009000700023
- Rodrigues, C., Vandenberghe, L.P.S., Oliveira, J., Soccol, C.R., 2012. New perspectives of gibberellic acid production: a review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 32, 263–273. doi:10.3109/07388551.2011.615297
- Shukla, R., Chand, S., Srivastava, A.K., 2005. Batch kinetics and modeling of gibberellic acid production by *Gibberella fujikuroi*. *Enzyme Microb. Technol.* 36, 492–497. doi:10.1016/j.enzmictec.2004.11.005
- Sumantha, A., Deepa, P., Sandhya, C., Szakacs, G., Soccol, C.R., Pandey, A., 2006. Rice bran as a substrate for proteolytic enzyme production. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 49, 843–851. doi:10.1590/S1516-89132006000600019
- Sunphorka, S., Chavasiri, W., Oshima, Y., Ngamprasertsith, S., 2012. Protein and sugar

extraction from rice bran and de-oiled rice bran using subcritical water in a semi-continuous reactor: Optimization by response surface methodology. *Int. J. Food Eng.* 8. doi:10.1515/1556-3758.2262

Werle, L.B., Garcia, J.C., Kuhn, R.C., Schwaab, M., Foletto, E.L., Cancelier, A., Jahn, S.L., Mazutti, M.A., 2013. Ultrasound-assisted acid hydrolysis of palm leaves (*Roystonea oleracea*) for production of fermentable sugars. *Ind. Crops Prod.* 45, 128–132. doi:10.1016/j.indcrop.2012.12.012

Empresa Brasileira De Pesquisa Agropecuária (Embrapa), 2004. Use of rice bran. <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/82499/1/FL-5429-2005.pdf> (accessed 06.10.16)

Santos, M.S., Ribeiro, F.M., 2005. Beers and Soft Drinks. São Paulo: CETESB. [http://www.crq4.org.br/downloads/cervejas\\_refrigerantes.pdf](http://www.crq4.org.br/downloads/cervejas_refrigerantes.pdf) (accessed 08.10.16)

#### 4 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos é possível verificar que a produção de ácido giberélico por fermentação em estado sólido, em escala de bancada, utilizando o microrganismo *Gibberella fujikuroi* e empregando resíduos de malte e farelo de arroz bruto como substrato é viável tecnicamente. O estudo demonstrou todo seu potencial ao apresentar resultados semelhantes à estudos considerados promissores realizados com outros substratos agroindustriais. Um dos motivos dos bons resultados obtidos está relacionado com as características dos substratos, que a partir da caracterização química apresentaram-se como fontes interessantes de nutrientes por serem ricos em carbono e nitrogênio. A produção máxima de GA<sub>3</sub> obtida no delineamento experimental (DCCR) do tipo 2<sup>3</sup> para 3 variáveis foi de 934,41 mg / kg de substrato, na condição de 65,95%, 10,12% e 1,60 g / kg, para umidade, FAB e N inorgânico, respectivamente. Ao realizar a cinética de produção de ácido giberélico para a melhor condição obtida no planejamento experimental, foi possível verificar um incremento na produção do fitohormônio a partir do 4º dia de fermentação, chegando ao máximo de produção, aproximadamente 1.300 mg/kg de substrato, no 10º dia.

#### SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com o intuito de contribuir para o segmento das pesquisas na produção de GA<sub>3</sub> por processo de fermentação em estado sólido utilizando o Resíduo Úmido de Cervejaria e o Farelo de Arroz Bruto como substratos sugere-se que sejam realizados estudos para:

- Avaliar a qualidade do GA<sub>3</sub> produzido através de ensaios de aplicação do fitormônio em plantas e sementes;
- Avaliar o efeito da aeração na produção de GA<sub>3</sub> por processo de FES utilizando o RCU e o FAB como substratos em reatores de coluna de vidro;
- Avaliar a produção de GA<sub>3</sub> por processo de FES, com substratos de FAB e RCU em biorreatores de escala piloto;
- Avaliar a viabilidade econômica da produção de ácido giberélico por FES utilizando FAB e RCU como substratos em escala piloto;

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANDELIER, S., RENAUD, R., DURAND, A. Production of gibberellic acid by fed-bach solid state fermentation in an aseptic pilot-scale reactor. **J. Process Biochemistry**, v. 32 (2), p. 141-145, 1996.
- BÖMKE, C., TUDZYNSKI, B., Diversity, regulation, and evolution of the gibberellin biosynthetic pathway in fungi compared to plants and bacteria. **Phytochemistry**, v. 70, p. 1876–1893, 2009.
- BORROW, A., BROWN, S., JEFFERYS, E.G., KESSEL, R.J.H., LLOYD, E.C., LLOYD, P.B. The kinetics of metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred culture. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 10, p. 407–44, 1964.
- BRUCKNER, B.; BLECHSCHMIDT, D. The Gibberellin Fermentation. **Critical Reviews in Biotechnology**, vol. 11 (2), pg. 163-192, 1991.
- CASTILHO, L. R.; ALVES, T. L. M., MEDRONHO, R. A. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agro-industrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 71, p. 45-50, 2000.
- CERVBRASIL. Associação Brasileira da Indústria de Cerveja. **Anuário Estatístico 2015**. Disponível em: <[http://www.cervbrasil.org.br/arquivos/ANUARIO\\_CB\\_2015\\_WEB.pdf](http://www.cervbrasil.org.br/arquivos/ANUARIO_CB_2015_WEB.pdf)>. Acessado em: 15.06.2016.
- CORONA, A., SAEZ, D., B, AGOSIN, E.A. Effect of water activity on gibberellic acid production by *Gibberella fujikuroi* under solid-state fermentation conditions. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2655–2658, 2005.
- COUTINHO, L. S., BATISTA, J. E. R., CALIARI, M., SOARES JÚNIOR, M. S. Optimization of extrusion variables for the production of snacks from by-products of rice and soybean. **Food Sci. Technol**, Campinas, 33(4): 705-712, Oct.-Dec, 2013.
- DE LIMA, G.J. M. M., MARTINS, R. R., ZANOTTO, D. L., DE BRUM, PAULO A. R. Composição química e valores de energia de subprodutos do beneficiamento de arroz. CT / 244 / **Embrapa Suínos e Aves**, Fevereiro, p. 1–2, 2000.
- DE MALACH JG, SACHS M, ROTEM R., **Timing and Optimal Concentration of Gibberellic Acid Treatments for Forcing Yield of Globe Artichoke (*Cynara scolymus* L.)**. Edizioni Minerva Medica. Turin, Italy, p. 633–642, 1976.
- DEBIAGI, F., IVANO, P.F.M.L. R., NASCIMENTO, P. H. A., MALI, S. Embalagens biodegradáveis de amido reforçadas com fibras lignocelulósicas provenientes de resíduos agroindustriais- **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v1, n2, p. 57, 2012.
- DEMAIND, A. L., Functions of secondary metabolites. In: **Genetics and Molecular Biology of Industrial Microorganisms**, Eds., American Society for Microbiology, Washington, 1989, p. 155-160.

DISSANAYAKE, P., GEORGE, D.L., GUPTA, M.L. Effect of light, gibberellic acid and abscisic acid on germination of guayule (*Parthenium argentatum* Gray) seed. **Industrial Crops and Products**, v. 32, pp. 111–117, 2010.

DORAN, P.M. **Principios de ingeniería de los bioprocesos**. 1ª Ed., Editora Acribia, S.A, Zaragoza- ES, 1998.

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochem Eng J**, v. 13, p. 113-125, 2003.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (Embrapa). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Utilização do farelo de arroz**. 2004. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/82499/1/FL-5429-2005.pdf>>. Acessado em 06.10.16.

EROGUL, D., SEN, F. Effects of gibberellic acid treatments on fruit thinning and fruit quality in Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.). **Scientia Horticulturae**, v. 186, pp. 137-142, 2015.

ESCAMILLA, E. M.; DENDOOVEN, L.; MAGAÑA, I. P.; PARRA, R.; DE LA TORRE, M. Optimization of gibberellic acid production by immobilized *Gibberella fujikuroi* mycelium in fluidized bioreactors **J Biotechnology**, 76: 147-155, 2000.

ESCHEL D, BEN-ARIE R, DINOOR A, PRUSKY D., Resistance of gibberellin-treated persimmon fruit to *Alternaria alternata* arises from the reduced ability of the fungus to produce endo-1,4- $\beta$ glucanase. **Phytopathology**, v. 90, p.1256–62, 2000.

FUSKA J., KUHR I., PODOJIL M., SEVCIK V. The influence of the nitrogen source on the production of gibberellic acid in submerge cultivation of *Gibberella fujikuroi*. **Folia Microbiol.** v. 6, p. 18, 1961.

GELMI, C., PÉREZ-CORREA, R., GONZÁLEZ, M., AGOSIN, E. Solid substrate cultivation of *Gibberella fujikuroi* on an inert support. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1227–33, 2000.

GOHLWAR, C.S., SETHI, R.P., MARWAHA, S.S., SEGHAL, V.K., Gibberellic acid biosynthesis from whey and simulation of cultural parameters. **Enzyme Microb. Technol.**, vol. 6, p. 312-316, 1984.

HEDDEN, P., MACMILLAN, J., PHINNEY, B.O., Fungal products. Part XII. Gibberellin A14 aldehyde, an intermediate in gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. **J. Chem. Soc. Perkin Trans. I** 58, 7–592, 1974.

HEDDEN, P., PHILLIPS, A.L., ROJAS, M.C., CARRERA, E., TUDZYNSKY, B. Gibberellin biosynthesis in plants and fungi: a case of convergent evolution? **J. Plant Growth Regul.** v. 20, p. 319–331, 2002.

HESELDTINE, C.W. Solid-state fermentation. **Biotechnol. Bioeng.** v.14, p. 517-532, 1972.

HOLLMANN, D., SWITALSKI, J., GEIPEL, S., ONKEN, U. Extractive fermentation of Gibberellic acid by *Gibberella fujikuroi*. **J Ferm Bioeng**, v. 79, p. 594–600, 1995.

HORI, S. “**Bakanae Disease of Rice: Lectures on Plant Disease**”. 1<sup>a</sup> ed. Seibido, Tokyo, p. 114, 1903.

ITO, S., KIMURA, J., Studies on the “bakanae” disease of the rice plant. **Rep. Hokkaido Nat. Agric. Exp. Stn.** 27, p. 1–99, 1931.

JEFFERYS, E.G., The Gibberellin Fermentation. **Advances in Applied Biology**, Vol. 13, p. 283-316, 1970.

KAHLON, S.S., MALHOTRA, S., Production of gibberellic acid by fungal mycelium immobilized in sodium alginate. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 8, p. 613-616, 1986.

KATO, J., PURVES, W.K., PHINNEY, B.O., Gibberellin-like substances in plants. **Nature** 196, 687–688, 1962.

KUMAR, P.K.R., LONSANE, B.K. Microbial production of Gibberellins: state of the art. **J. Advances in Applied Microbiology**. v. 34, p. 29 – 140, 1989.

KUMAR, P.K.R., LONSANE, B. K.. Solid state fermentation: Physical and nutritional factors influencing gibberellic acid production. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.34, p. 145-148, 1990.

KUROSAWA, E. Experimental studies on the nature of the substance secreted by the ‘bakanae’ fungus. **Nat. Hist. Soc. Formosa** 16, 213–227, 1926.

LESLIE, J.F., SUMMERELL, B.A. **The Fusarium Laboratory Manual**. Ed. Wiley-Blackwell, 2006.

MACHADO, C.M.M. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de hormônio vegetal (ácido giberélico – GA<sub>3</sub>) por fermentação no estado sólido em resíduos agroindustriais brasileiros: relação da produção de GA<sub>3</sub> em biorreator piloto e bioensaios em mudas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*)**. 2002. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2002

MACHADO C.M.M., OLIVEIRA B.H., PANDEY A., SOCCOL C.R. Coffee husk as substrate for the production of gibberellic acid by fermentation. In: Sera, T., Soccol, C.R., Pandey, A. and Roussos, S. **Book on Coffee Biotechnology and Quality**, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht; p 401-8, 2001.

MACHADO, C.M.M., SOCCOL, C.R., PANDEY, A. Gibberellic acid production by solid state fermentation in coffee husk. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 102:179–192, 2002.

MACMILLAN, J., Biosynthesis of the gibberellin plant hormones. **Nat. Prod. Rep.** v. 14, p. 221–244, 1997.

MANDER, L.N., The chemistry of gibberellins: an overview. **Chem Ver**, v. 92, p. 573–612, 1992.

MARWICK, J.D., WRIGHT, P.C., BURGESS, J.G. Bioprocess intensification for production of novel marine bacterial antibiotics through bioreactor operation and design. **Marin Biotechnol**, v. 1, p.495–507, 1999.

MOSS, M. O. The biosynthesis of Fusarium mycotoxins. In: MOSS, M. O. AND SMITH, J. E. **The Applied Mycology of Fusarium**, Eds., Cambridge University Press, New York, Symp. Br. Mycol. SOC. held at Queen Mary College, London, 1982.

MURADO, M.A.; PASTRANA, L.M.; GONZALEZ, M.P.; Production of Gibberellic Acid from Mussel processing wastes in submerged batch culture. **Bioresource Technology**. v. 45, p. 213 - 221, 1993.

NCBI. The NCBI Taxonomy Homepage, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html/>>. Acessado em: 07/10/2016.

NOLETO, F., CORDEIRO, R., CHAVES, R. **Utilização do farelo de arroz**. ACE - Embrapa Arroz e Feijão, 2004.

OLIVEIRA. J. **Produção de Ácido Giberélico por Fermentação Submersa e por Fermentação no Estado Semissólido em Diferentes Modelos de Biorreatores Utilizando Polpa Cítrica**. 2010, 129 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

O'NEIL, M.J., **The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals**, ed 13, Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc., p.785, 2001.

ONUBBR. **População mundial deve atingir 9,6 bilhões em 2050, diz novo relatório da ONU**. 13/06/2013. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/populacao-mundial-deve-atingir-96-bilhoes-em-2050-diz-novo-relatorio-da-onu/>>. Acessado 11/11/2015.

PALMER, G. H., The industrial use of gibberellic acid and its scientific basis - a review, **J. Inst. Brew.**, v. 80, p. 13- 18, 1971.

PANDEY, A., SOCCOL, C. R., LARROCHE, C. **Current Developments in Solid-state Fermentation**. 1ª Ed., Asiatech Publishers, Inc., New Delhi, 2008.

PASTRANA L.M., GONZÁLEZ M.P., TORRADO A., MURADO M.A. A fed-batch culture model for improved production of gibberellic acid from a waste medium. **Biotechnology Letters**. 1995; 17: 263-8.

PHINNEY, B.O. The history of gibberellins. In: Crozier A (ed) **The biochemistry and physiology of gibberellins**. Praeger, New York, 1983.

PIEROTTY C.D., OTÁLVARO A.A., ALGECIRA E.N., Producción de ácido giberélico utilizando biocatalizadores soportados en matrices porosas. **Universitas Scientiarum**, v. 11 (2), p. 41-50, 2006.

QIAN, X.M., PREEZ, J.C., KILIAN, S.G. Factors affecting gibberellic acid production by Fusarium moniliforme in solid-state cultivation on starch. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 10, p. 93-99, 1994.

RADLEY, M., Occurrence of substances similar to gibberellic acid in higher plants. **Nature** v. 178, p. 1070–1071, 1956.

RAJESH, M.J., RAJESH, L., ABACHIRE, L.W. Optimization of Solid State Fermentation Conditions for the Production of Cellulase by Using *Trichoderma Reesei*. **European Journal of Applied Engineering and Scientific Research**, ed. 1 (4), pp. 196-200, 2012.

RANGASWAMY, V. Improved Production of Gibberellic Acid by *Fusarium moniliforme*. **Journal of Microbiology Research**, v. 2(3), p. 51-55, 2012.

RANGASWAMY V., MUMBAI N., BALU G. **Process for gibberellic acid production with “Fusarium moniliforme” strains**. United States Patent Application Publication. 2008, Apr. 10, n US 2008/0085543 A1.

RAZEM, F.A., BARON, K., HILL, R.D. Turning on gibberellin and abscisic acid signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, pp. 454–459, 2006.

RELIANCE LIFE SCIENCE PRIVATE LIMITED. Rangaswamy, Vidhya; Guduri, Balu. **Process For Gibberellic Acid Production With Fusarium Moniliforme Strains**. Int. C12P17/04. US 435/126. US n. 20080085543A1. 12 Sept. 2007. 10 Apr. 2008, Washington, DC.

ROBINSON, T., SINGH, D., NIGAM, P. Solid-state fermentation a promising microbial technology for secondary metabolite production. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 55, p. 284-289, 2001.

RODRIGUES, C. **Produção, Extração e Purificação de Hormônio vegetal (Ácido Giberélico) por Fermentação no Estado Sólido em Polpa Cítrica e Utilização do Extrato em Meio de Cultivo de Bromélias *in vitro***. 2010, 180 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2010.

RODRIGUES, C., VANDENBERGHE, L.P.S., OLIVEIRA, J., SOCCOL, C.R. New perspectives of gibberellic acid production: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, p.1–11, 2011.

RODRIGUES, C.; VANDENBERGHE, L. P. S.; TEODORO, J. OSS, J. F.; PANDEY A.; SOCCOL, C. R. A new alternative to produce gibberellic acid by solid state fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 52, p. 181-188, 2009.

SANTOS, J.A.F. **Avaliação dos resíduos dos processamentos de suco de laranja e de cerveja para obtenção de ácido cítrico por fermentação em estado sólido**. 2008. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial). Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, SP, 2008.

SANTOS, M.S.; RIBEIRO, F.M. **Cervejas e Refrigerantes**. São Paulo: CETESB, 2005. Disponível em: <[http://www.crq4.org.br/downloads/cervejas\\_refrigerantes.pdf](http://www.crq4.org.br/downloads/cervejas_refrigerantes.pdf)>. Acessado em 08.10.16.

SHUKLA R., CHAND S., SRIVASTAVA A.K. Batch kinetics and modeling of gibberellic acid production by *Gibberella fujikuroi*. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 36, p. 492-497, 2005a.

SHUKLA R, CHAND S, SRIVASTAVA AK. Improvement of gibberellic acid production using a model based fed-batch cultivation of *Gibberella fujikuroi*. **Process Biochemistry**, v. 40: p. 2045–2050, 2005b.

SHUKLA R., SRIVASTAVA A.K., CHAND S. Bioprocess Strategies and Recovery Processes in Gibberellic Acido Fermentation. **J. Biotechnology and Bioprocess Engineering**. v. 8, p. 269-278, 2003.

SOCCOL, C.R., et al. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4820–4825, 2010.

SPONSEL, V.M.; HEDDEN, P., Gibberellin biosynthesis and inactivation. In: Davies, P.J. (Ed.), **Plant Hormones. Biosynthesis, Signal transduction, Action!** Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pg. 63–94, 2004.

SUMANTHA, A., DEEPA, P., SANDHYA, C., SZAKACS, G., SOCCOL, C.R., PANDEY, A. Rice Bran as a Substrate for Proteolytic Enzyme Production. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Vol.49, n. 5 : pp. 843-851, 2006.

TAKAHASHI, N., KITAMURA, H., KAWARADA, A., SETA, Y., TAKAI, M., TAMURA, S., SUMIKI, Y., Isolation of gibberellins and their properties. **Bull. Agric. Chem. Soc. Japan** v. 19, p. 267–277, 1955.

Transparency Market Research. **Gibberellins Market - Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends and Forecast, 2013 – 2019**. Disponível em: <<http://www.transparencymarketresearch.com/gibberellins-market.html>>. Acessado em 26/12/2016.

TUDZYNSKI, B. Biosynthesis of gibberellin in *Gibberella fujikuroi* biomolecular aspects. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 52, p. 298-310, 1999.

USDA/FAS. **Grain: world markets and trade**. May, 2015. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/grain.pdf>>. Acessado em: 09.06.2015.

VASS R.C., JEFFERYS E.G. Gibberellic Acid, In: **Economic microbiology: secondary products of metabolism**. Vol. 3, AH Rose (ed), Academic Press, p. 421-33, 1979.

YU T., WU P.G., QI J.J., ZHENG X.D., JIANG F., ZHAN X., Improved control of postharvest blue mold rot in pear fruit by a combination of *Cryptococcus laurentii* and gibberellic acid. **Biological Control**, v. 39, p. 128–34, 2006.

ZANUZO, M.R., LERMENN, F., BEZERRA, E.L. Influência do Uso de Ácido Giberélico (GA<sub>3</sub>) no Desenvolvimento e Rendimento de Milho Safrinha. **UNICIÊNCIAS**, v. 16, n. 1, p. 25-31, 2012.