

PRODUÇÃO DE AROMA FRUTAL POR *Ceratocystis fimbriata* EM RESÍDUO SÓLIDO DE AGROINDÚSTRIAS DE CAFÉ

M. Soares^{1,2}; P. Christen³; A. Pandey¹; M. Rimbault⁴; C.R. Soccol¹

¹ Laboratório de Processos Biotecnológicos, UFPR, Brasil; ² CEFET-PR UNED PG, Brasil; ³ Laboratoire de Microbiologie, IRD, Université de Provence, Marseille, França; ⁴ Laboratoire de Biotechnologie, IRD, Montpellier, França. Corresponding author.

INTRODUÇÃO

Apesar da maioria dos aromatizantes serem atualmente obtidos por síntese química (84%), pesquisas mostram a crescente preferência dos consumidores por alimentos naturais ou que contenham aditivos naturais (4). Plantas continuam sendo importantes fontes de óleos essenciais e aromas, mas há grande dependência em fatores de difícil controle, como clima e doenças. Uma alternativa à síntese de aromas naturais baseia-se nos processos microbiológicos, como fermentações (biosíntese) e bioconversões. O custo de produção de tais aromas pode ser questionado; contudo, o preço de mercado pago por aromas naturais é compensador. Por exemplo, a 4-decalactona sintética (aroma de impacto em pêssegos) custa 150 dólares/Kg, enquanto seu similar natural custa 6000 dólares/Kg (4). Fungos do gênero *Ceratocystis* sintetizam diferentes aromas frutais/florais (pêssego, abacaxi, banana, cítricos e rosa), dependendo da cepa e das condições de cultivo, sendo que *C. fimbriata* é interessante devido ao seu rápido crescimento, habilidade na produção de esporos e à variedade de aromas sintetizados (5). Neste trabalho, procedeu-se a fermentação no estado sólido da casca de café com o intuito de avaliar a produção de aromas por *C. fimbriata*, comparando os resultados com outros mencionados para diferentes resíduos agroindustriais. A influência da adição de glicose e o uso de substâncias precursoras de aromas foram estudados. Os compostos biosintetizados presentes no headspace dos cultivos foram caracterizados e quantificados.

MATERIAL E MÉTODOS

Microorganismo

O microorganismo estudado foi *C. fimbriata* CBS 374-83. A manutenção da cepa e a coleta dos esporos transcorreram conforme descrito em literatura (1).

Preparo do substrato sólido

Duzentos gramas de casca de café, previamente seca (8% de umidade) e reduzida em partículas de

diâmetro entre 0,4-0,8 mm, foram misturados a um litro de água destilada e tratados em vapor fluente por 45 min. Após simples filtração as frações líquida e sólida foram separadas, sendo que estudos preliminares demonstraram que esta mostrou-se mais apropriada à produção de aromas do que a casca e do que a fração líquida, provavelmente devido à eliminação de sais e/ou outras substâncias.

Procedimentos de fermentação

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

Procedimentos analíticos

Cada experimento foi realizado em triplicata. O acompanhamento da evolução da produção dos voláteis foi realizada através de avaliações sensoriais paralelamente à análise por Cromatografia de Gases (CG). Os compostos foram identificados no headspace dos cultivos comparando seu tempo de retenção com padrões. Voláteis totais e álcoois foram expressos em equivalente de etanol μmol por Litro de headspace por grama de matéria seca ($\mu\text{mol/L gMS}$) e ésteres, da mesma forma, como equivalente de etil acetato, ambos a partir de curvas padrões (3).

Análise dos dados

Os dados obtidos por cromatografia foram integrados com o objetivo de calcular os voláteis totais acumulados durante a fermentação. O modelo logístico de Gompertz foi utilizado para proceder esta integração e calcular o tempo de máxima produção e a velocidade de produção dos voláteis (3).

RESULTADOS E CONSIDERAÇÕES

Produção de voláteis: efeito da adição de glicose.

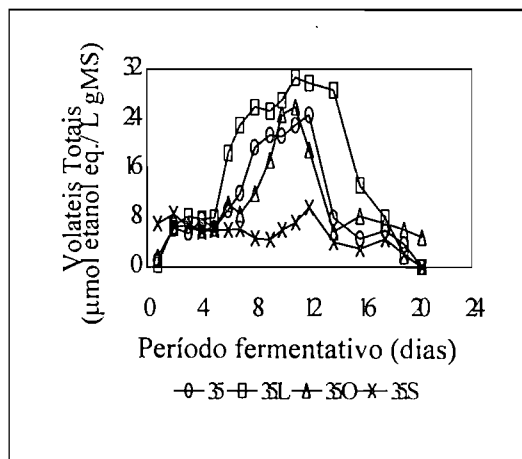
Para as adições de 20% e 35%, um forte aroma de abacaxi foi percebido (Tabela 1). O aroma detectado depende da concentração de glicose adicionada ao meio de cultivo, indicando que possivelmente este fator orienta o metabolismo do fungo na síntese de diferentes compostos. Em concentrações mais elevadas de glicose a intensidade do aroma foi comprometida (Figura 1). Isto tanto pode ocorrer devido à concentração de glicose, à disponibilidade de nitrogênio ou à diminuição da atividade de água que provavelmente ocorre nestas condições.

Tabela 1: Avaliação sensorial do headspace dos cultivos com diferentes adições de glicose para *C. fimbriata* cultivado em casca de café.

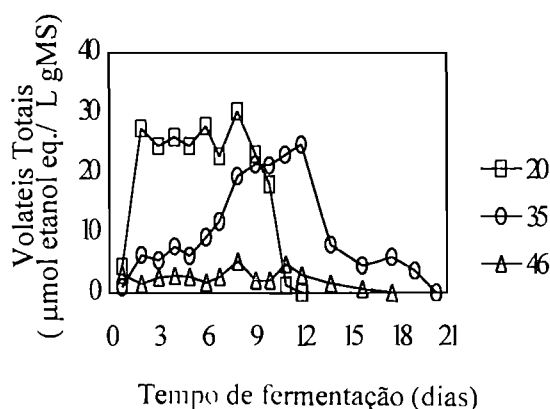
Glicose(%)	tmax*(dias)	Intensidade
20	6	+++abacaxi
35	10	+++ frutal-abacaxi
46	8	+ banana passa

Intensidade do aroma: fraca (+), forte (+++)

* tmax: tempo de máxima percepção do aroma.



A Figura 1a mostra a evolução dos voláteis totais durante o período fermentativo. Parece mais interessante a adição de menores concentrações de glicose ao substrato; contudo, percebe-se que o fungo suporta concentrações de glicose na ordem de 46%.



A Figura 1b mostra a evolução dos voláteis totais medidos no headspace dos cultivos suplementados com diferentes concentrações de glicose.

Este estudo não é conclusivo, mas demonstra que a intensidade de produção dos aromas e a velocidade de produção dos mesmos varia com a adição de glicose. Comparando o tempo fermentativo deste microorganismo na casca de café (Figura 1) com outros substratos mencionados na literatura (3), por exemplo bagaço de mandioca e de maçã – 5 e 4 dias respectivamente, percebe-se que o fungo está melhor adaptado à casca de café. Apesar da produção no meio com 35% ser mais longa, aquela do meio com 20% foi mais rápida.

Na Tabela 2, os parâmetros calculados a partir da integração dos voláteis estão apresentados. O modelo mostra-se adequado, visto que todos os coeficientes R^2 são superiores a 0,994. Mesmo sem ter sido completamente otimizado os resultados da produção de voláteis totais em casca de café foi superior aos valores mencionados na literatura para outros resíduos (farelo de trigo e bagaço de mandioca 93 e 421 µmol/L gMS, respectivamente)(3).

Tabela 2: Adição de glicose: constantes cinéticas (modelo de Gompertz)

Glicose (%)	VTacum.*	K (h ⁻¹)	tmax (dias)	R ²
20	6,58	0,0123	5,2	0,997
35	5,39	0,0093	8,9	0,994
46	1,20	0,0045	7,1	0,997

*Voláteis totais acumulados durante a fermentação (mmol etanol eq./L gMS)

tmax: dias de máxima produção do aroma

K: velocidade de produção

Produção de voláteis: efeito da adição de leucina, óleo de soja e solução salina.

Este estudo foi feito com adição de glicose de 35%. Os aromas detectados por olfatométrie estão presentes na Tabela 3.

Tabela 3: Avaliação sensorial do headspace dos cultivos de *C. fimbriata* em casca de café (35% glicose) adicionado de determinados compostos.

Substância	tmax*(dias)	Intensidade
SS	10	+ banana
O	10	++ banana
L	10	+++ banana

Intensidade do aroma: fraco (+), médio (++), forte (+++) tmax: tempo de máxima percepção do aroma
SS : solução salina(2); O :10% de óleo de soja(1); L :10 mMol de leucina(2).

Em todos os casos um agradável aroma de banana foi notado, mais intenso quando o meio foi adicionado de leucina. Os parâmetros calculados pelo modelo de Gompertz (Tabela 4) indicam que a adição de óleo de soja ao meio não melhorou a produção total de voláteis, que foi similar ao meio controle, indicando que o fungo não assimila este substrato para metabolismo primário, tampouco o utiliza como precursor do metabolismo de metilcetonas como outros fungos (*Penicillium roquefortii*, por exemplo). A adição de solução salina diminuiu drasticamente a produção dos voláteis, mas leucina atuou inversamente (Figura 2). Isto indica que o substrato já possui suficiente concentração de sais e que o fungo degrada a leucina segundo a rota de Erlich a isoamil álcool, o qual é então esterificado em isoamil acetato, o qual é o maior componente de aromas de banana.

Tabela 4: Adição de leucina, solução salina e óleo de soja: constante cinéticas segundo o modelo de Gompertz.

Substância	VTacum.*	K (h ⁻¹)	tmax (dias)	R ²
-	5.39	0.0093	8,9	0,994
O	5,7	0,0085	9,5	0,996
L	8,81	0,0098	9,4	0,997
SS	2,8	0,0067	12	0,996

O, L e SS como para Tabela 3.

*Voláteis Totais acumulados durante a fermentação (µmol etanol eq./L gMS)

tmax: tempo de máxima produção do aroma

K: velocidade de produção

Após o tratamento da casca com vapor fluente ocorreu uma diminuição na quantidade de sais na ordem de 30% e, conforme observado previamente, este tratamento aumenta a produção de VT. Da mesma forma, a adição de uma solução

salina ao resíduo afetou a produção de VT. Este estudo não permite concluir se este efeito é negativo em relação ao crescimento ou diretamente à produção de voláteis.

Figura 2: Evolução dos VT medidos no headspace dos cultivos com 35% de glicose (-, controle) e suplementado com leucina (L), solução salina (SS) e óleo de soja (O).

A análise por Cromatografia de Gases permitiu a identificação de diversos compostos, como indicado na Tabela 5, que apresenta os dados integrados para cada composto presente no headspace dos cultivos. A adição de leucina aumenta a produção de ésteres derivados do metabolismo deste aminoácido. Todos os compostos já foram mencionados previamente por outros autores (1,2,3).

Tabela 5: Total individual dos voláteis medidos no headspace dos cultivos de *C. fimbriata* (dados integrados).

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

20: 20% glicose; 35: 35% glicose (controle); 35.L: com leucina;

35.O: com óleo de soja.

* expresso em equivalente de etanol µmol / L gMS :

** expresso em equivalente de etil acetato µmol / L gMS.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1-BRAMORSKI,A. et al. *Biotechnology Letters*, 20 (4): 359-362, 1998.
- 2-CHRISTEN,P et al. *Biotechnology Letters*; 13 (7): 521-526, 1991.
- 3-CHRISTEN,P et al. *Mycological Research*. 101 (8):911-919, 1997.
- 4-JANSSENS,L et al. *Process Biochemistry*. 27:195-215. 1992.
- 5-SENEAUD,C. Ph.D. Thesis, France. 1988.

Soares M., Christen Pierre, Pandey A., Raimbault Maurice, Soccol C.R. (2000).

Producao de aroma frutal por *Ceratocystis fimbriata* em residuo solido de agroindustrias de cafe.

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

Londrina, PR (BRA) ; Montpellier : IAPAR ; IRD, p. 385-388.

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