

MARLENE SOARES

Centro Federal de Educação Tecnológica do Paraná
Unidade de Ensino de Ponta Grossa

**BIOSSÍNTESE DE METABÓLITOS VOLÁTEIS FRUTAIS POR
Pachyolen tannophilus E *Ceratocystis fimbriata*
PELA FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO
DA CASCA DE CAFÉ.**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em tecnologia Química, área de concentração Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal do Paraná.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Carlos Ricardo SOCCOL,
Laboratório de Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná.

CO-ORIENTADOR: Dr. Pierre CHRISTEN, Institut de Recherche pour le Développement-Université de Provence — Marseille, França.

CURITIBA
1998

MARLENE SOARES

METABOLITOS FRUTAIS PRODUZIDOS POR *PACHYSOLEN TANNOPHYLUS* E *CERATOCYSTIS FIMBRIATA* EM FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO SOBRE CASCA DE CAFÉ.

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Tecnologia Química - com concentração em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

Orientador: Prof. CARLOS RICARDO SOCCOL
Setor de Tecnologia, UFPR

Prof. ASHOK PANDEY
Regional Research Laboratory, India
Prof. SEVASTIANOS ROUSSOS
Université Marseille, França

Curitiba, 09 de Dezembro de 1998

Esta dissertação foi parcialmente financiada pela União Européia,
através de recursos oriundos do projeto BIOPULCA.

AGRADECIMENTOS

Algumas pessoas me ajudaram, incentivaram e suportaram durante a apreensão e o prazer da concretização deste trabalho; outras partilharam comigo seus conhecimentos. A todas estendo meus sinceros agradecimentos.

Sou muito grata à dedicação e ao apoio dispensados pela minha família, ao amor que partilhamos e às situações assumidas durante meu completo envolvimento nesta pesquisa. Agradeço, com muito amor, à minha **mãe**.

A Adriane P. Medeiros, meu reconhecimento por tudo aquilo que partilhamos durante o decorrer dos trabalhos... foram bons momentos, mas também difíceis. Sua amizade foi muito importante.

O agradecimento sincero à ajuda da amiga Angelita Mara de Souza, Doutora em Bioquímica, pelos pertinentes conselhos, críticas e sugestões, por seu paciente apoio durante os momentos mais difíceis e por sempre estar ao meu lado quando precisei.

Minha lembrança a Pierre Christen por sua sábia e oportuna ajuda, orientação, paciência e encorajamento à concretização desta pesquisa.

Minha admiração e respeito ao meu Orientador, Carlos R. Soccol, por sua paciência, integridade e pelas oportunidades oferecidas. Sinto-me grata por ter sido orientada por alguém cujos méritos e qualidades são reconhecidos e invejados em todo o mundo.

Mais uma pessoa merece menção especial...**meu pai**. Palavras não conseguiram expressar meus sentimentos. Sua orientação no direcionamento da minha carreira profissional incentivou-me a trabalhar em pesquisas; o suporte financeiro que me deixou possibilitou minha manutenção durante a realização da parte prática deste trabalho na França. Aos poucos, pai, vou concretizando nossos sonhos...

SUMÁRIO

	Página
Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas	xi
Lista de Quadros e Abreviaturas.....	xii
Resumo	xiv
Abstract	xv
1- Introdução	1
2- Revisão Bibliográfica	
2.1- Aromas	
2.1.1- Definição	3
2.1.2- Mercado mundial e legislação brasileira	5
2.2- A Biotecnologia na produção de aromas	
2.2.1- Diferentes metodologias	6
2.2.1.1- Biosíntese	6
2.2.1.2- Biotransformação	6
2.2.1.3- Enzimas	7
2.2.2- Desenvolvimento da Biotecnologia na produção de aromas.....	8
2.2.3- Exemplos de aplicações industriais	9
2.2.4- Grupos de compostos aromáticos produzidos Biotecnologicamente	11
2.2.4.1-Cetonas	11
2.2.4.2- Álcoois	12
2.2.4.3- Ésteres	14
2.2.4.4- Lactonas	18
2.2.4.5- Diacetil	19
2.2.4.6-Terpenos	19
2.2.4.7-Pirazinas	20
2.3- Fermentação no estado sólido	
2.4- Definição	20
2.4-1. Utilizações	21
2.4-2. Comparação entre a Fermentação no Estado Sólido e a Fermentação Submersa	22
2.4-3. Fatores que afetam a Fermentação no Estado Sólido	

	Página
2.3.4.1- Microorganismos	23
2.3.4.2- Substrato e suporte	24
2.3.4.3- Atividade de água e umidade	24
2.3.4.4- Aeração	25
2.3.4.5- Temperatura	25
2.3.4.6- pH	25
2.5- Café	
2.6- 2.4.1- Mercado brasileiro	26
2.4.2- Estruturas gerais do grão	27
2.4.3- Composição química da casca do café	27
2.4.4- Beneficiamento dos grãos: via seca e via úmida	28
2.7- Microorganismos estudados	
2.5.1- <i>Ceratocystis fimbriata</i>	29
2.5.2- <i>Pachysolen tannophilus</i>	32
3- Material e Métodos	
3.1- Primeira etapa: seleção de dois microorganismos e um meio de cultivo para continuidade do trabalho	
3.1.1- Microorganismos	
3.1.1.1- Seleção das cepas	33
3.1.1.2- Manutenção da cepas	33
3.1.1.3- Obtenção dos inóculos	33
3.1.2. Substratos	
3.1.2.1- Preparo dos meios de cultivo.....	34
3.1.2.2- Caracterização dos substratos	35
3.1.3. Condições de fermentações	36
3.1.4 Análises das amostras fermentadas	37
3.2- Segunda etapa: produção de voláteis por <i>Pachysolen tannophilus</i> Através da FES do resíduo sólido da hidrólise da casca de café em Erlenmeyer	
3.2.1- Preparo do inóculo	38
3.2.2- Esterilização do meio de cultivo.....	38
3.2.3- Condições de fermentação	38
3.2.4- Otimização das condições para produção de voláteis em Erlenmeyer	

Página

3.2.4.1- Primeiro estudo: otimização das condições de cultivo	38
3.2.4.2- Segundo estudo: efeito da adição de óleo de soja e de leucina na produção de voláteis	39
3.2.4.3- Terceiro estudo: otimização da adição de glicose..	40
3.3- Terceira etapa: produção de voláteis por <i>Ceratocystis fimbriata</i> através da FES do resíduo em Erlenmeyer	
3.3.1- Preparo do inóculo	40
3.3.2- Otimização das condições de cultivo	41
3.4- Análises meios fermentados	42
3.4.1- Análises de aromas:	
3.4.1.1- Isolamento dos compostos aromáticos	42
3.4.1.2- Identificação e quantificação dos compostos:	
Cromatografia Gasosa	44
3.4.1.3- Cálculo da produção de voláteis.....	47
3.4.2 - Coeficientes de impacto	48
4- Resultados e Discussões	
4.1- Primeira etapa: seleção de microorganismos/meio de cultivo.....	50
4.2- <i>Pachysolen tannophylus</i>: otimização das ondições de cultivo para produção de voláteis em Erlenmeyer	
4.2.1- Primeiro estudo: otimização das condições de cultivo	55
4.2.2- Segundo estudo: efeito da adição de óleo e de leucina na produção de voláteis	59
4.2.3- Terceiro estudo: efeito da adição de glicose/xilose na produção de voláteis	65
4.3- <i>Ceratocystis fimbriata</i>: produção de voláteis em Erlenmeyer	
4.3.1- Primeira comparação: efeito da adição de diferentes concentrações de glicose na produção de voláteis	72
4.3.2- Segunda comparação: influênciia da adição de leucina, óleo de soja e solução salina na produção de voláteis	75
5- Conclusões	81
6- Referências bibliográficas	86

LISTA DE FIGURAS

	Página	
Figura 01	Via de obtenção de álcoois superiores.....	12
Figura 02	Derivações de alguns dos maiores produtos da fermentação de açúcares por bactérias, a partir do ácido pirúvico.....	13
Figura 03	Transformação enzimática da leucina em voláteis, mostrando compostos formados nas frutas maduras.....	15
Figura 04	Síntese do isoamil acetato através das enzimas álcool acetil transferase e esterase.....	16
Figura 05	Corte longitudinal de uma semente de café.....	27
Figura 06	Fluxograma das diferentes vias de obtenção do café de qualidade comercial (via seca e via úmida)	28
Figura 07	Fotografia dos esporos de <i>Ceratocystis fimbriata</i>	30
Figura 08	Aspecto final dos meios de cultivo usados na seleção de cepas.....	35
Figura 09	Curvas de calibração para etanol e de etil acetato	47
Figura 10	Evolução dos voláteis totais e porcentagem dos mesmo no headspace dos cultivos de <i>P. tannophilus</i> , durante a FES do resíduo da casca de café.....	54
Figura 11	Evolução dos voláteis totais e porcentagem dos mesmos no headspace dos cultivos de <i>C. fimbriata</i> , durante a FES do resíduo da casca de café.....	54
Figura 12	Gráfico da evolução dos voláteis totais nos experimentos do estudo fatorial feito com a levedura <i>P. tannophilus</i>	56
Figura 13	Gráficos da proporção dos voláteis encontrados no headspace dos cultivos do primeiro estudo com <i>P. tannophilus</i>	57
Figura 14	Gráficos indicando o impacto dos diferentes parâmetros na Produção de ésteres (etyl acetato e isoamil acetato) e voláteis totais.....	58
Figura 15	Gráfico da evolução dos voláteis totais nos meios com 26% de glicose, adicionados de óleo de soja, leucina e meio esterilizado integralmente.....	60
Figura 16	Gráficos da proporção dos voláteis medidos no headspace dos cultivos do segundo estudo feito com <i>P. tannophilus</i>	61
Figura 17	Gráfico da evolução dos voláteis individuais no headspace do cultivo de <i>P. tannophilus</i> com 26% de glicose, adicionado de leucina.....	63

Página

Figura 18	Gráfico da evolução dos voláteis individuais no headspace do Cultivo de <i>P. tannophilus</i> com 26% de glicose, adicionado de óleo de soja.....	64
Figura 19	Gráfico da evolução dos voláteis individuais no headspace do Cultivo de <i>P. tannophilus</i> no meio com 26% de glicose	65
Figura 20	Evolução dos voláteis totais nos meios de cultivo adicionados com diferentes concentrações de glicose (14, 20, 26 e 35%) e no meio sem adição desta fonte de carbono	66
Figura 21	Curva de integração dos valores da produção de voláteis totais no resíduo adicionado de diferentes concentrações de glicose (14, 20, 26 e 35%) e no meio sem adição deste açúcar.	67
Figura 22	Gráfico da proporção de cada composto identificado no headspace dos cultivos de <i>P. tannophilus</i> com adição de 35% de glicose.....	68
Figura 23	Gráfico da evolução individual dos compostos no headspace do Cultivo de <i>P. tannophilus</i> adicionado de 35% de glicose.....	69
Figura 24	Gráfico da evolução dos voláteis totais produzidos por <i>C. fimbriata</i> em resíduo de café com diferentes adições de glicose (20, 35 e 46%).....	72
Figura 25	Gráfico da integração dos valores dos voláteis produzidos durante A fermentação de resíduo de café por <i>C. fimbriata</i> , com diferentes concentrações de glicose (20, 35 e 46%)	73
Figura 26	Gráficos da proporção dos voláteis Identificados no headspace dos cultivos de <i>C. fimbriata</i> com 20 e 35% de glicose.....	74
Figura 27	Gráficos da evolução individual dos principais compostos Identificados no headspace dos cultivos de <i>C. fimbriata</i> (20 e 35% glicose)	75
Figura 28	Gráfico da evolução da produção de voláteis totais nos meios com 35% de glicose, adicionado de leucina (35.L), óleo de soja (35.O) ou solução salina (35.SS).....	76
Figura 29	Gráfico da integração da produção de voláteis totais no resíduo com 35% de glicose, adicionado de leucina (35.L), óleo de soja (35.O) ou solução salina (35.SS).....	77

	Página
Figura 30	Gráficos da proporção individual dos voláteis medidos no Headspace dos meios de cultivo com 35% de glicose, adicionados de leucina (30.a) e óleo de soja (30.b).....78
Figura 31	Evolução dos compostos individuais medidos no headspace dos cultivos com 35% de glicose, adicionados de leucina (31.a) ou óleo de soja (31.b).....79

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	<i>Threshold</i> de reconhecimento de algumas substâncias aromáticas em água a 20°C.....4
Tabela 02	Principais aplicações da FES em diferentes setores econômicos.22
Tabela 03	Comparação entre FES e fermentação submersa23
Tabela 04	Café beneficiado: produção mundial dos principais países Produtores 1991/92 a 1996/97.26
Tabela 05	Composição química da casca de café28
Tabela 06	Composição físico-química da casca de café, do resíduo e do extrato36
Tabela 07	Tempos de retenção de padrões puros que não estavam presentes no headspace dos cultivos microbianos.45
Tabela 08	Tempo de retenção dos padrões puros presentes no cromatograma do headspace dos cultivos de <i>C. fimbriata</i> e <i>P. tannophilu</i>46
Tabela 09	Valores de pH final , açúcar total residual (%) e umidade final (%) observados na etapa de seleção de microorganismos/ substrato..50
Tabela 10	Resultado da análise sensorial feita na etapa de seleção de microorganismos/ meios de cultivo.51
Tabela 11	Resultados da seleção de um meio de cultivo sólido53
Tabela 12	Resultados das análises pós-fermentativas do estudo fatorial feito com <i>P. tannophilus</i>55
Tabela 13	Resultado na análise sensorial do primeiro estudo feito com <i>P. tannophilus</i> . (otimização das condições).....58
Tabela 14	Resultados das análises pós-fermentativas do segundo estudo com <i>P. tannophilus</i>59
Tabela 15	Resultado da avaliação sensorial do segundo estudo feito com a levedura <i>P. tannophilus</i>62

	Página
Tabela 16	Constantes cinéticas da produção total de voláteis segundo o Modelo de GOMPERTZ 67
Tabela 17	Resultado das análises feitas no estudo do efeito da adição de glicose 69
Tabela 18	Compostos voláteis identificados no headspace dos cultivos de <i>P. tannophilus</i> , valores totais de dados integrados.....70
Tabela 19	Resultado das análises dos experimentos feitos com <i>C. fimbriata</i> . 71
Tabela 20	Quantidade total dos compostos produzidos em diferentes por <i>C. fimbriata</i>80

LISTA DE QUADROS

Quadro 01	Nível de variação dos parâmetros nos experimentos do estudo fatorial feito com a levedura <i>P. tannophilus</i>39
Quadro 02	Condições do segundo experimento feito com <i>P. tannophilus</i> e códigos adotados.40
Quadro 03	Condições da otimização da produção de compostos voláteis por <i>C. fimbriata</i> em resíduo.....41
Quadro 04	Matriz empregada nos cálculos dos coeficientes de impacto do plano fatorial no estudo da otimização das condições de cultivo de <i>P. tannophilus</i> para a produção de voláteis totais e ésteres.....49

LISTA DE ABREVIATURAS

CNNPA	Comissão Nacional de Normas de Produtos Alimentícios
CPG	Cromatografia em Fase Gasosa
FDA	Food and Drug Administration
FEMA	Flavor and Extracts Manufacturing Association
FES	Fermentação no Estado Sólido
GRAS	Generally Recognized As Safe
LPB	Laboratório de Processos Biotecnológicos
MS	Matéria Seca
UFPR	Universidade Federal do Paraná
USDA	United States Department of Agriculture

RESUMO

O principal objetivo deste trabalho é mostrar a viabilidade da utilização de resíduos da Agroindústria do café na biosíntese de aromas por *Ceratocystis fimbriata* e *Pachysolen tannophilus*. Uma prévia seleção do meio de cultivo foi feita e o resíduo sólido do tratamento da casca de café com vapor fluente foi escolhido (no lugar da casca e do resíduo líquido) para a produção de aromas, em cultivos estáticos em Erlenmeyers.

A otimização das condições de cultivo para *Pachysolen tannophilus* foi obtida com um experimento fatorial (2^{7-4}). Os melhores resultados foram conseguidos com adição de 26% de glicose ao meio, umidecido inicialmente a 70% e cujo inóculo foi de 10^8 células/g matéria seca (MS). Neste caso, um forte aroma foi reportado (alcoólico com notas frutais-banana) e o total de voláteis acumulados foi de 4,0 mmol eq. etanol /L gMS. Etanol foi o composto mais abundante medido no headspace (85 %), mas acetaldeído, etil acetato, isobutanol, isoamil acetato, etil-3 hexenoato e isobutil acetato também estavam presentes. No caso da adição de 35%, a fermentação foi mais lenta (a máxima produção foi atingida após 9 dias, contra 4 dias para 26%), mas os voláteis acumulados foram de 5,7 mmol eq. ethanol/L gMS. Os compostos produzidos neste caso foram os mesmos mencionados para 26%, mas isobutil acetato e etil-3-hexenoato foram encontrados em concentrações mais elevadas, originando um intenso aroma de abacaxi. A variação da umidade inicial (70% e 60%) e da temperatura (25°C e 30°C) não influenciaram o processo, enquanto que a adição de solução salina e a mudança no pH original do meio (de 4,5 para 6,0) apresentaram efeito negativo. Quando leucina foi adicionada ao cultivo, um intenso aroma de banana foi percebido, como também o aumento nas concentrações de álcool isoamílico e isoamil acetato.

Para *Ceratocystis fimbriata* o estudo foi feito variando as concentrações de glicose adicionadas aos meios (20% a 46%). Na adição de 20% e 35% de glicose, um intenso aroma de abacaxi foi percebido nos meios de cultivo. A fermentação foi mais rápida com 20% de glicose, atingindo a máxima produção de voláteis após 5 dias contra 9 do caso do substrato com 35%. O total de voláteis produzidos foram de 6,6 e 5,2 mmol eq. ethanol /L gMS, respectivamente. Compostos como acetaldeído, etanol, 2-propanol, etil acetato (este representando 80% and 75% do total de voláteis, respectivamente), etil isobutirato, isobutil acetato, etil butirato, isoamil acetato foram identificados por cromatografia em fase gasosa em ambos cultivos. Para 20% de glicose propil acetato e etil-3 hexenoato foram também detectados e no meio com 35% 2-octanona. No caso da adição de 46% de glicose somente um fraco aroma de banana foi identificado e a produção total de voláteis foi pequena. A adição de leucina (10 mmol/L) no substrato com

35% de glicose aumentou a produção total de voláteis (8,3 mmol eq. ethanol /L.g MS) e o aroma era de banana ficou mais intenso. Enquanto que a adição de óleo de soja não aumentou a produção de voláteis a adição de uma solução salina diminuiu-a drasticamente.

ABSTRACT

The main purpose of this work is to show the feasibility of using solid coffee wastes for aroma production by *Ceratocystis fimbriata* and *Pachysolen tannophilus*. A previous selection step was made and steam treated coffee husk was chosen (against husk and liquid extract) for aroma production by both microorganisms, in static cultures in Erlenmeyer flasks.

An optimization of culture conditions for *Pachysolen tannophilus* was achieved with an experimental factorial design (2^{7-4}). Best results were obtained for an addiction of 26% of glucose, initial moisture content of 70% and inoculum size of 10^8 cells/g dry matter (DM). In this case, a strong alcoholic aroma with a fruity note (banana) was reported and accumulated volatile compounds attained values of 4,0 mmol eq. ethanol /L g DM. Ethanol was the most abundant compound in the headspace (85 %), but acetaldehyde, ethyl acetate, isobutanol, isoamyl acetate, ethyl-3 hexenoate and isobutyl acetate were also present. For an addiction of 35%, the fermentation was slower (maxima reached after 9 days against 4 days for 26% of glucose) but the accumulated volatile attained 5,7 mmol eq. ethanol/L gDM. The molecules produced were the same already mentioned, but isobutyl acetate and ethyl-3-hexanoate were found more concentrated in the headspace, giving a strong pineapple aroma. Initial moisture (70% and 60%) and temperature (25°C and 30°C) were not found to have an influence on the process while the addition of a salt solution and the change of the natural pH (4,5 to 6,0) displayed a negative effect. When leucine was added to the medium, a strong banana odor was found with increased amounts of isoamyl alcohol and isoamyl acetate.

For *Ceratocystis fimbriata* static cultures were achieved, supplemented with different glucose concentrations (20% to 46%) to obtain different C/N ratios. For the addiction of 20% end 35% of glucose, a strong pineapple aroma was detected in the headspace of the cultures. Fermentation was more rapid with 20% of glucose, showing maximum volatile concentration after 5 days against 9 in case of substrate with 35%. Accumulated total volatiles produced were 6,6 and 5,2 mmol eq. ethanol /L gDM, respectively. Compounds such as acetaldehyde, ethanol, 2-propanol, ethyl acetate (this

representing 80% and 75% of total volatiles, respectively), ethyl isobutyrate, isobutyl acetate, ethyl butirate, isoamyl acetate were identified by GC analysis in both cultures. For 20% of glucose propil acetate and ethyl-3 hexenoate were also found and for 35% 2-octanone. In the case with the addiction of 46% of glucose only a weak odor of banana was detected, and total volatile production was poor. Addition of leucine (10 mmol/l) to the substrate with 35% of glucose, increased the total volatile production (8,3 mmol eq. ethanol /l.g DM) and a strong banana odour was detected. While the addition of soybean oil did not improve the volatile production, addition of mineral salts drastically decreased their production.

1- INTRODUÇÃO

A indústria de alimentos vem sendo influenciada pela preocupação do consumidor em relação às características nutricionais de sua dieta. Isto é percebido pelo crescente número de produtos reduzidos em gordura, com baixa quantidade de cafeína, sódio e colesterol, pela substituição da dupla sacarina/ciclamato pelo aspartame e através da procura de aditivos naturais (CHRISTEN & LOPEZ-MUNGUIA, 1994).

O significado do termo natural varia entre países. Nos Estados Unidos o termo “aroma natural” inclui, não somente os derivados de plantas e animais, mas também aqueles obtidos por processos fermentativos e enzimáticos. Segundo a **Food and Drug Administration** (FDA) o aroma natural deve ser produzido a partir de matérias-primas naturais e o produto final deve ser idêntico àquele encontrado na natureza (ARMSTRONG et alii, 1989).

O aumento na utilização de aromatizantes direciona as empresas de alimentos à procura de fontes alternativas. As rotas convencionais de síntese química e o isolamento de plantas continuam sendo viáveis, mas a produção Biotecnológica se desenvolve como opção atrativa, pelo fato dos aromas serem considerados naturais nas legislações dos Estados Unidos e Comunidade Européia. Além disto, a Biotecnologia oferece vantagens em relação à extração tradicional de materiais botânicos: alta especificidade dos produtos finais, garantia de suprimento durante todo o ano e a possibilidade de utilização de matérias-primas alternativas, como por exemplo resíduos industriais.

O Brasil é o primeiro produtor mundial de café: 39 milhões de sacas de 60 quilos na safra de 96/97. O Estado do Paraná é responsável por 5% do total, ou seja, cerca de dois milhões de sacas. A safra de 97/98 apresentou o mesmo volume de produção (SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO DO PARANÁ, maio 98). Como no caso de outras atividades industriais, a transformação tecnológica dos grãos de café gera quantidade considerável de resíduos. Segundo dados fornecidos por indústrias beneficiadoras de café, a cada 40 Kg de café não beneficiado originam-se 19 Kg de casca, confirmando dados apresentados por MASSON et alii (1984 ^a), especificando que 50% do peso do café é resíduo (casca) gerado no processamento dos grãos de café por via seca, processo adotado no Brasil. A riqueza em matérias orgânicas deste resíduo e seu potencial poluente são razões que justificam pesquisas Biotecnológicas.

O objetivo geral do trabalho foi utilizar a casca de café (*Coffea arabica*) como substrato sólido na biosíntese de aromas frutais naturais por microorganismos.

A idéia da produção de aromas por microorganismos remonta da observação da produção de odores agradáveis ou não nos meios de cultivo. Desta forma também originou-se esta pesquisa: da observação de que no meio de cultivo sólido a levedura *Pachysolen tannophilus* produziu aromas frutais, enquanto que quando cultivada em meio líquido os mesmos não foram percebidos, neste caso predominando aroma de cerveja.

Após pesquisa em diferentes fontes, não foi encontrada referência a respeito do crescimento deste microorganismo em meio sólido e, tampouco, aos aromas frutais. Este foi um dos objetivos específicos deste trabalho: a caracterização dos metabólitos voláteis que constituem este aroma frutal e a quantificação dos mesmos.

O segundo objetivo específico do trabalho foi avaliar o potencial da casca de café como meio de cultivo para biosíntese de aromas. Procedeu-se a comparação da produção total de aromas pelo fungo filamentoso *Ceratocystis fimbriata* cultivado na casca de café com os valores obtidos em outros resíduos agroindustriais sólidos citados em literatura. Este microorganismo é conhecido como produtor de aromas frutais (SENEMAUD, 1988; CHRISTEN & RAIMBAULT, 1991; CHRISTEN et alli, 1997, BRAMORSKI, 1997; BRAMORSKI et alli, 1998).

Para atingir os objetivos propostos, o trabalho foi desenvolvido segundo as etapas apresentadas a seguir:

- 1- Selecionar entre dez microorganismos e três meios de cultivos (casca de café e dois derivados), um fungo filamentoso, uma levedura e um só meio de cultivo, no qual houvesse produção de aromas frutais;
- 2- Após a primeira etapa escolheu-se a levedura *Pachysolen tannophilus*, cultivada no resíduo sólido da extração da casca de café com vapor fluente. Procedeu-se a otimização das condições de cultivo para produção de aromas frutais (ésteres), avaliou-se o efeito da adição de óleo e de leucina na produção destes compostos e otimizou-se a adição de glicose (fonte de carbono) no meio de cultivo.
- 3- Escolhido o fungo filamentoso *Ceratocystis fimbriata*, também cultivado no resíduo de casca de café, avaliou-se a influência da adição de glicose ao meio na produção de voláteis frutais e o efeito da adição de óleo de soja, leucina e de solução salina na produção total de voláteis e o efeito na produção de compostos individuais.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Aromas

2.1.1- Definição

Os compostos odoríferos, designados por aromas, são moléculas orgânicas de baixo peso molecular (inferior a 400 daltons), cuja tensão de vapor à pressão atmosférica e à temperatura ambiente é suficientemente alta para que estas moléculas encontrem-se na atmosfera parcialmente no estado de vapor e possam, através do contato com a mucosa olfativa, provocar um estímulo (RICHARD & MULTON, 1992).

Dentro da boca os alimentos são apenas doces, salgados, ácidos ou amargos; isto ocorre porque os compostos responsáveis pelo sabor não são voláteis à temperatura ambiente e somente se interrelacionam com as papilas gustativas. Quando um alimento é consumido, a interação das sensações de sabor, odor e textura produzem uma impressão global que é melhor definida pela palavra inglesa **flavor**. Os aromas podem ser considerados como os constituintes voláteis do flavor.

Aromas e fragrâncias são muito importantes às indústrias. A diferença entre as definições sugere que fragrância é o termo reservado a compostos voláteis com aplicações nas indústrias de perfumes e cosméticos, enquanto que aromas são aplicados exclusivamente em alimentos (JANSSENS et alli, 1988).

Um componente aromático dificilmente encontra-se puro num alimento, normalmente faz parte de uma mistura complexa de moléculas voláteis que interagem entre si; apesar disto, em certos casos a impressão é de que existe uma substância predominante, como por exemplo a vanilina (baunilha) e o benzaldeído (amêndoas) (OHLOFF, 1977). TRESSL & JENNINGS (1972) identificaram os principais constituintes do aroma de banana: etil acetato, etanol, propil acetato, isobutil acetato, etil butirato, isobutil butirato, 3-metil-butil acetato (isoamil acetato), entre outros.

A intensidade e a qualidade de um aroma não são necessariamente determinados pelos componentes presentes nas maiores concentrações. O olfato humano é bastante sensível e determinados compostos podem ser detectados em concentrações molares de 10^{-18} . Um provador treinado distingue cerca de dez mil aromas e diferencia até 20 níveis de intensidade dos mesmos (MONTEIRO, 1984).

O limite mínimo de percepção absoluta de uma substância é denominado **Threshold**, sendo chamado de **absoluto**, quando o provador percebe algum sabor ou odor mas não consegue identificá-lo (diferente da água, por exemplo), ou de **reconhecimento**, quando a diferença percebida é descrita. Somente pode ser considerada como substância aromática aquela cuja concentração no alimento é superior ao seu **Threshold absoluto**.

Na Tabela 1 estão indicados os valores do **Threshold de reconhecimento** de algumas substâncias voláteis diluídas em água, em microgramas de composto por litro.

Tabela 1: Threshold de reconhecimento de algumas substâncias aromáticas em água a 20°C.

Compostos	µg/L ou ppb
Etanol	53.000
Hidroxicitronelol	5.000
Timol	1.700
Limoneno	210
β-pineno	140
z- hexen-3 ol	70
Etil butanoato	59
Octanona-3	50
Etil acetato	8,5
Eugenol	6
Etil propionato	5
Linalol	3,8-6
1- octen-3 ol	1,4-10
α-ionona	0,4
β-ionona	0,007
sec butil-2-metoxi pirazina	0,002
1-p-menten-tiol 8	0,0001

(RICHARD & MULTON, 1992)

Não é correto afirmar que um composto quimicamente puro possui lugar privilegiado numa mistura de constituintes aromáticos unicamente porque seu **Threshold** em solução aquosa a 20°C é mais baixo do que o dos demais constituintes da mistura. Este valor mínimo de percepção absoluta nos alimentos depende de diversos fatores: da pressão de vapor dos compostos voláteis, da temperatura do alimento, de sua composição e das interações dos aromas com lipídios, proteínas e carboidratos, os quais afetam diretamente a dispersão destes na fase gasosa. Portanto, o **Threshold** deve ser analisado com bastante prudência, percebendo-se nestes dados indicações de ordem de grandeza (RICHARD & MULTON, 1992).

2.1.2- Mercado Mundial e Legislação Brasileira

Aromatizantes são substâncias, puras ou em misturas, adicionadas intencionalmente ao alimento e que possuem capacidade odorífera e/ou sápida, capaz de conferir ou intensificar o aroma dos alimentos. Excluem-se desta definição compostos capazes apenas de conferir os quatro sabores básicos (ácido, doce, salgado, amargo).

O mercado mundial de aromas estava estimado em seis bilhões de dólares em 1993, representando aproximadamente um quarto do valor total do mercado de aditivos, e os aromas alimentares incorporavam 25% deste total, com crescimento anual de 5% (CHRISTEN & LOPEZ-MUNGUIA, 1994).

O uso de aromatizantes em alimentos torna-se cada dia mais relevante, porque a aceitabilidade do produto está associada ao seu aspecto, sabor e aroma. De todos os compostos aromáticos disponíveis 84% são produzidos por síntese química (JANSSENS et alli, 1992).

A utilização de aromas está sob regulamentação restrita de cada país. No final da década de 60 foi criada a Organização Internacional da Indústria de Aromas (IOFI), com o objetivo de estabelecer um conjunto de normas e padrões internacionalmente aceito para elaboração da legislação sobre aromatizantes. Com o intuito de avaliar os diferentes efeitos das substâncias aromatizantes em nível tecnológico, orgânico e ambiental, esta organização apóia o trabalho de entidades idôneas, tais como a FDA e a **Flavor and Extracts Manufacturing Association (FEMA)**.

No Brasil os aromas são analisados em laboratórios credenciados ao Governo Federal e estão sob responsabilidade do Ministério da Saúde e do Ministério da Agricultura (Secretaria de Inspeção de Produtos Animais).

As condições gerais de elaboração, classificação e designação de aromatizantes foram regulamentadas pela Resolução 22/76 da Comissão Nacional de Normas de Produtos Alimentícios (CNNPA).

O significado do termo natural varia entre os países. Nos Estados Unidos no Código de Regulamentações Federais (CFR 101.22.0.3) o termo “aroma natural” inclui, além de derivados de plantas e animais, aqueles obtidos por processos fermentativos e enzimáticos. Segundo instruções da FDA, 1958, o “aroma natural” deve ser produzido a partir de matérias-primas naturais e o produto final deve ser idêntico àquele já encontrado e identificado na natureza. Quando o aroma for produzido por microorganismos estes devem estar reconhecidos na FDA como seguros ao consumo ou **GRAS (Generally**

Recognized As Safe). Em 1989 dentre os microorganismos reconhecidos como GRAS a bactéria *Candida utilis* que produz aromas frutais pela conversão de etanol em etil acetato e acetaldeído (ARMSTRONG et alli, 1989).

2.2- A BIOTECNOLOGIA NA PRODUÇÃO DE AROMAS

2.2.1- Diferentes Metodologias

Os processos Biotecnológicos envolvidos na síntese de compostos aromáticos podem ser divididos em dois métodos: microbiológico e enzimático. Os métodos microbiológicos são subdivididos em biosíntese e biotransformação; a primeira refere-se à produção de compostos químicos através de células (fermentação ou metabolismo secundário), enquanto que a segunda refere-se ao uso de células microbianas na execução de modificações específicas ou interconversões de estruturas químicas (WELSH et alli, 1989).

2.2.1.1- Biosíntese

A biosíntese de aromas também é conhecida como síntese *de novo*, e significa produção de aromas pela fermentação de nutrientes simples, como açúcares e aminoácidos. Microorganismos são produtores potenciais de substâncias aromáticas e a pergunta a ser esclarecida é: **o que os leva à formação destes compostos ?** (GROSS & ASTHER, 1989).

- determinados compostos odoríferos apresentam ação anti-fúngica, favorecendo a competição do microorganismo frente a outros;
- em certos casos os compostos aromáticos são indutores de germinação, crescimento micelial ou frutificação.
- a síntese destes metabólitos pode ser feita a partir de substâncias nocivas ao próprio microorganismo, com a função de detoxificação do meio.

2.2.1.2- Biotransformação

A partir de substratos específicos, diferentes reações são executadas por microorganismos na produção de aromas, tais como: oxidação, redução, reações hidrolíticas, formação de novas ligações C-C e reações de degradação. Terpenos são os principais substratos nos quais se estudam as bioconversões.

A biotransformação de compostos pode ter duas finalidades (ARMSTRONG et alii, 1989):

- a transformação de determinadas substâncias de baixo valor comercial em aromas. Por exemplo, a habilidade do fungo *Aspergillus niger* em converter a naringina, componente encontrado no suco de frutas cítricas responsável pelo sabor amargo, em naringenina, sua forma sem amargor;
- o aumento nos rendimentos resultando produtos finais opticamente ativos, como na produção de L-mentol. Em 1989 o mercado deste terpeno era de aproximadamente 3 mil toneladas por ano e dependia da extração tradicional de tecidos vegetais, os quais apresentam rendimento de 40% na conversão de L-mentona a L-mentol. Como alternativa vem sendo proposta a extração da L-mentona da planta que seria posteriormente convertida, através da atividade de desidrogenases de diferentes microorganismos (como a bactéria *Pseudomonas putida* e a levedura *Rhodotorula minuta*). Este sistema apresenta resultados de conversão de 100% de L-mentol opticamente ativo (ARMSTRONG et alii, 1989; JANSSENS et alii, 1992).

Ésteres de cadeia curta também podem ser produzidos pela bioconversão de um precursor apropriado, como etanol por exemplo. O óleo de fúsel, composto basicamente de 3-metilbutanol, 2-metilbutanol e isobutanol, pode ser transformado pela levedura *Hansenula mrakii* nos acetatos correspondentes com rendimentos elevados, por exemplo 90% para o 3-metilbutil acetato (JANSSENS et alii, 1992).

2.2.1.3- Enzimas

Este processo envolve, não somente a hidrólise de determinados compostos, mas todos os processos enzimáticos sem o desenvolvimento microbiológico.

A maturação forçada de queijos com a adição de enzimas bacterianas faz um queijo, que normalmente demoraria um ano para desenvolver seu aroma, maduro em seis semanas.

Os fungos filamentosos são capazes de produzir enzimas usadas para hidrolisar a parede celular das plantas e liberar o conteúdo desta. Esta extração enzimática elimina a necessidade do processamento térmico, o qual destrói ou altera os componentes aromáticos. Pectinase, celulase e hemicelulase de espécies de *Aspergillus*, *Penicillium*,

Rhizopus e *Trichoderma* são as enzimas mais comumente utilizadas para aumentar a eficiência da extração durante o processamento da fruta, do vegetal, do cereal ou do suco (ARMSTRONG et alii, 1989).

Faz-se necessária a distinção entre as pesquisas que visam obter produtos complexos, com características próximas às naturais, daquelas que procuram obter moléculas isoladas. A primeira tendência consiste na tentativa de imitar a natureza e desenvolver um novo sistema industrial, composto de um ou mais microorganismos/enzimas, de maneira a recriar *in vitro* um aroma complexo detectado num fruto ou numa planta. A segunda tendência busca obter o maior rendimento possível de um ou dois compostos característicos importantes que podem ser utilizados para reforçar os extratos de plantas superiores empregados usualmente. A escolha destes dois conceitos determina essencialmente a metodologia que será utilizada: *in vivo*, na qual um microorganismo geneticamente modificado é usado no próprio alimento que se deseja aromatizar, ou *in vitro*, obtidos através de biosíntese e bioconversões.

2.2.2- Desenvolvimento da Biotecnologia na produção de aromas

Há muito tempo microorganismos são conhecidos por produzirem aromas particulares, agradáveis ou não, fato que pode ser observado em denominações como: *odorata*, *odoratissimum*, *suaveolens*, *fragrans*, *pelargonium*, *mellioiens*, *alliaceus*, *hyacinthinus* e *putrefaciens* (GROSS & ASTHER, 1989).

A produção de aromas por via Biotecnológica remonta certamente à antiguidade, sobretudo no que se refere aos costumes de países do extremo Oriente. A fermentação desempenha importante papel na indústria alimentícia, tanto para melhorar a qualidade sensorial e digestiva de um produto quanto para aumentar seu prazo de validade. Exemplos típicos de alimentos fermentados incluem: iogurte, queijos (Roquefort, Brie e Gorgonzola), shoyu, tempeh, beiju, pães, cerveja, vinho, entre outros. Em todos estes, além dos compostos majoritários metabolizados pelos microorganismos (etanol, ácidos, por exemplo), um variado número de substâncias minoritárias desempenham papel fundamental nas características organoléticas do produto final.

A idéia da produção de aromas via microbiologia remonta da observação da produção de odores agradáveis nos meios de cultivo. O primeiro artigo a ser publicado abrangendo este assunto foi escrito por OMELIANSKI (1923). Este autor percebeu que a

qualidade aromática de um meio de cultivo evoluía com o tempo, pela acumulação de um metabólito ou pela degradação de metabólitos iniciais, como por exemplo a esterificação dos ácidos acético e butírico. O mesmo artigo agrupa os microorganismos como fazendo parte do que o autor especificou “grupo dos produtores de aromas”, citando diferentes pesquisadores que descreveram cultivos produtores de aromas entre 1889 e 1914.

Os microorganismos capazes de produzir aromas geralmente sintetizam uma variedade muito complexa de meios de cultivo e entre os compostos químicos formados podem ser citados: álcoois, ésteres, lactonas, terpenos, carbonilas, ácidos, aldeídos e cetonas.

2.2.3- Exemplos de aplicações Industriais

A Biotecnologia oferece muitas vantagens em relação à extração tradicional de materiais botânicos para a produção de aromas:

- os produtos podem ser legalmente reconhecidos como naturais;
- os produtos finais apresentam alta especificidade;
- o suprimento é garantido, porque o processo não fica submetido às safras, às variações no tempo (que influenciam de maneira significativa a qualidade do aroma e seu rendimento) e aos problemas econômicos/políticos do país;
- permite trabalhar com matérias-primas alternativas, como resíduos de indústrias alimentícias.

Apesar de existirem diferentes processos microbiológicos capazes de produzirem aromas o número de aplicações comerciais continua limitado, pois os baixos rendimentos inviabilizam sua aplicação. O fato de um determinado meio de cultivo apresentar forte e agradável aroma não implica necessariamente que aquele microorganismo é capaz de produção em alta escala e a recuperação dos compostos representa outra etapa delicada. Isto é, contudo, compensado pelo preço dos compostos aromáticos naturais que é de 10 a 100 vezes mais alto do que os aromas sintéticos. Atualmente a produção industrial de uma substância aromática por microorganismos só é economicamente viável se o valor de mercado estiver entre 200 e 500 dólares/Kg. (WELSH et alli, 1989).

A obtenção de aromas naturais também possui problemas de custo e de produção. Determinados óleos e compostos aromáticos puros, isolados de plantas, estão disponíveis a preços acima de cinco mil dólares o quilo. Por exemplo a 4-decalactona sintética, aroma de impacto em pêssegos, custa aproximadamente 150 dólares/Kg, enquanto que a mesma substância extraída de fonte natural custa seis mil dólares/Kg. Outra desvantagem da utilização de plantas como fontes naturais de aromas é a forte dependência de fatores dificilmente controláveis, como a influência do tempo e o risco de doenças. Certos países apresentam restrições a importação de plantas e materiais provenientes de regiões tropicais ou subtropicais, devido à instabilidade política destas regiões e pelo risco da transmissão de pragas/doenças (JANSSENS et alli, 1992).

Um inconveniente envolvendo a aplicação comercial da Biotecnologia é a volatilidade e baixa polaridade de alguns compostos aromáticos, o que dificulta a separação do meio de cultivo. Além disto, pelas características inibitória e tóxica que certas substâncias possuem aos microorganismos, é importante manter a concentração das mesmas níveis baixos no meio de cultivoém disto, novos produtos devem ser analisados por entidades governamentais ou pela FDA antes de serem reconhecidos como naturais e este procedimento pode ser demorado, encarecendo-os.

JANSSENS et alli, 1992, citam processos biotecnológicos industriais já utilizados na produção de aromas:

- Recentemente a empresa BASF (Alemanha) começou a produção industrial de 4-decalactona. O processo envolve a bioconversão do óleo de castor, composto por 80% de ácido ricinoléico , pela levedura *Yarrowia lipolytica*, com rendimento de 6 g/L.
- Na Inglaterra a Unilever já utiliza fermentadores de 30 mil litros na produção de (R)-δ- dodecanolida, aroma de manteiga, e é empregada na fabricação de margarinas.
- Ácido butírico e etil butirato são produzidos microbiologicamente pela companhia Hercules Inc. (EUA). *Clostridium butyricum* converte glicose em condições anaeróbicas a ácido butírico, em concentrações que atingem 1 a 2 % do meio de cultivo. Este ácido encontra-se naturalmente presente em manteiga e alguns queijos. A esterificação com etanol dá origem ao etil butirato, um importante aroma frutal de baixo **Threshold**. O custo da produção biotecnológica é de 180 dólares/Kg, enquanto que o isolamento deste

composto a partir do suco de frutas tem o custo de 5 mil dólares/Kg. O etil butirato produzido sinteticamente custa somente 4 dólares/Kg.

2.2.4- Grupos de Compostos Aromáticos Produzidos Biotecnologicamente

A maioria dos compostos organolépticos derivados de microorganismos são metabólitos produzidos em pequenas concentrações. Estes compostos possuem baixo **Threshold** e são detectados cromatograficamente em partes por milhão (ppm – $\mu\text{L/L}$).

Qualitativamente e quantitativamente os compostos secretados pelos microorganismos são influenciados diretamente pela cepa, pela presença de atividades enzimáticas específicas, pela composição química do meio de cultivo e pelo controle do pH, da temperatura, da idade do inóculo e da atividade de água do substrato.

O aroma percebido em determinado meio de cultivo pode ser produzido durante a fase de crescimento ou na fase de esporulação, como no caso das cepas de *Trichoderma viride*, *Penicillium roqueforti* e *Penicillium decumbens*, sendo que esta última só é possível nas fermentações em estado sólido (LATRASSE et alli, 1985).

Além do interesse pelos aromas frutais, há um crescente estudo na produção de aromas naturais relacionados com o sabor “tostado” ou de “carne cozida” para aplicação em microondas (ARMSTRONG et alli, 1989).

2.2.4.1- Cetonas

O aroma característico de queijos azuis, tipo **Roquefort**, está ligado à presença de metilcetonas, como 2-heptanona, 2-pentanona, entre outras. Estas cetonas são formadas pela β -oxidação dos ácidos graxos liberados pela ação de lipases à partir da matéria graxa do leite, seguida de uma descarboxilação dos cetoácidos intermediários (GATFIELD, 1988).

Alguns microorganismos envolvidos na produção destes compostos são: *Penicillium roquefortii*, *Candida lypolitica*, *Geotrichum candidum* e *Aspergillus niger*.

Em 1973, Dwivedi já chamava a atenção ao fato de que as enzimas lipolíticas do fungo *Penicillium roqueforti* produziam ácidos graxos livres que são tóxicos ao próprio fungo, dependendo do pH do meio, da concentração e do tamanho das cadeias. Contudo, o microorganismo desenvolveu um mecanismo de detoxificação do meio convertendo os ácidos graxos livres em metil-cetonas.

2.2.4.2- Álcoois

Álcoois desempenham papel modesto e muitas vezes indireto na composição dos aromas, mas também podem atuar como precursores de compostos, por exemplo aldeídos ou ésteres.

Diferentes álcoois são encontrados nos cultivos de leveduras, predominantemente: etanol, álcoois de óleo fúsel (propanol, isobutanol, amil e isoamil álcool) e fenil etil álcool. Nos cultivos de fungos filamentosos são encontrados predominantemente: metil-3-butanol, butanol, isobutanol, pentanol, hexanol, octanol-3, octen-3-ol, octen-2-ol e fenil etanol, sendo que uma parte tem origem no metabolismo de aminoácidos, como leucina, valina, isoleucina, fenilalanina (WELSH et alli, 1989).

Quando determinados aminoácidos são adicionados nos meios de cultivos de leveduras sofrem uma transaminação seguida de descarboxilação, resultando no ceto ácido e correspondente aldeído. O aldeído, por sua vez, é reduzido pela enzima álcool desidrogenase em álcool contendo um carbono a menos do que o aminoácido, sendo o propanol uma exceção (WELSH et alli, 1989).

A Figura 1 representa uma das vias metabólicas de obtenção de álcoois superiores e seu papel no mecanismo celular a partir de aminoácidos.

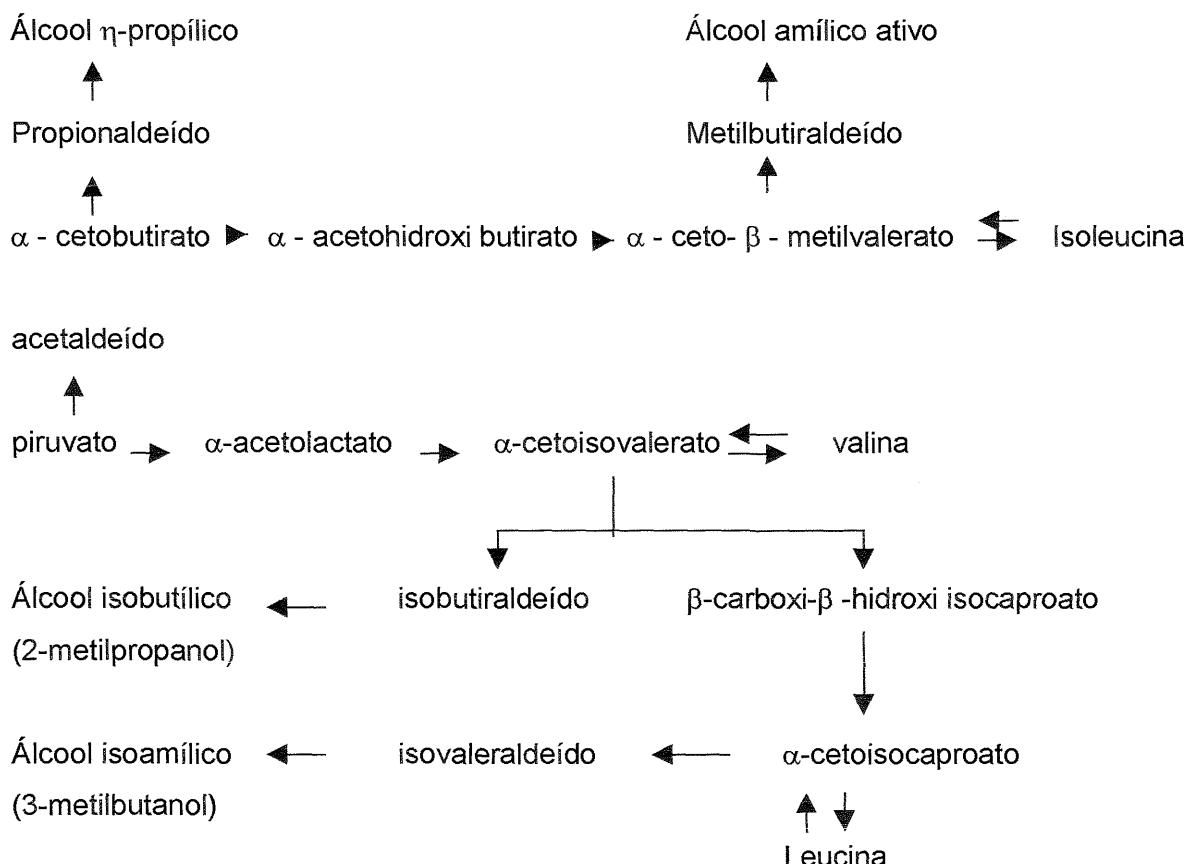


Figura 1: Via de obtenção de álcoois superiores (DEGORGE-DUMAS et alli, 1984).

A Figura 2 resume rotas metabólicas da fermentação de açúcares por bactérias, sendo que o piruvato é uma chave metabólica. Na maioria dos casos este composto é formado a partir da glicólise; contudo, rotas alternativas existem. A mais comum destas rotas é a *Entner-Doudoroff*, importante na fermentação da glicose pela bactéria *Zymomonas*. Nesta caso, a bactéria produz um Mol de Adenosina Trifosfato (ATP) por Mol de glicose; este baixo rendimento energético força mais glicose a ser convertida em etanol e menos à produção de biomassa, como leveduras as quais utilizam-se da glicólise para produzir piruvato, que fornece o rendimento de 2 Mol ATP por mol de glicose (SHULLER & KARGI, 1992).

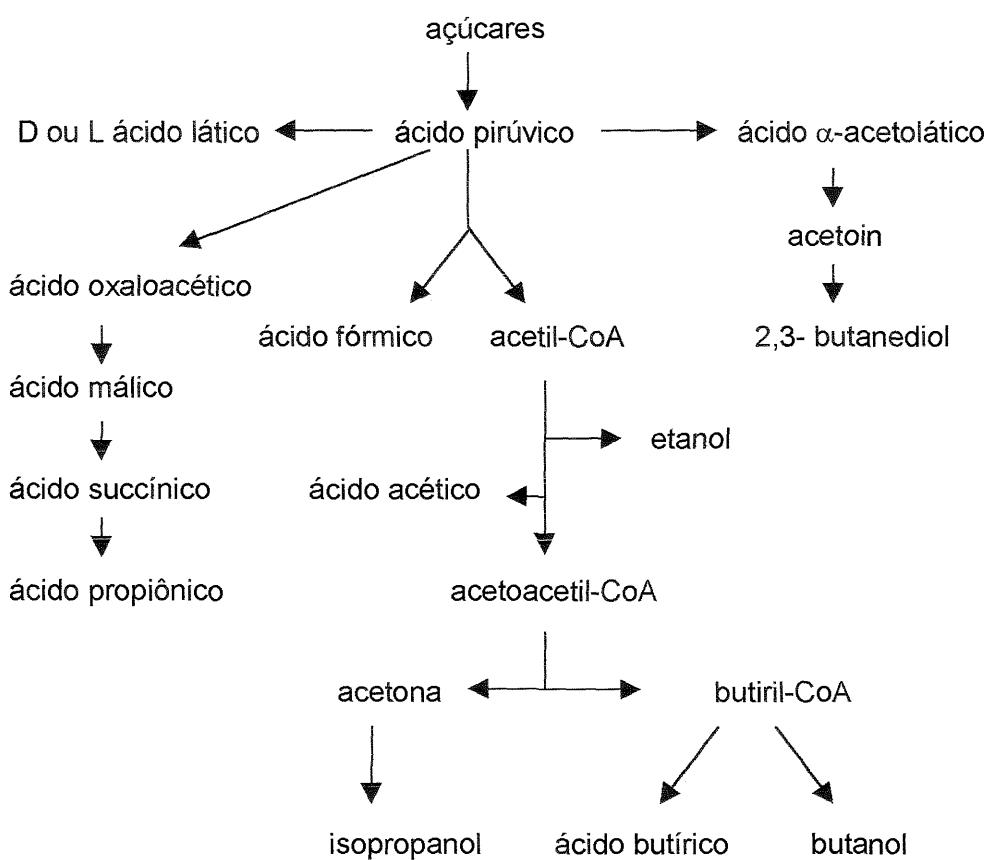


Figura 2: Derivações de alguns dos maiores produtos da fermentação de açúcares por bactérias, a partir do ácido pirúvico (SHULLER & KARGI, 1992).

Nenhum microorganismo produz todos os componentes indicados na Figura 2, cada qual apresenta rotas metabólicas específicas.

O acetaldeído é um álcool de baixo peso molecular que desempenha papel importante no aroma de iogurtes e de algumas frutas.

O álcool 1-octen-3-ol é o composto volátil encontrado em maior quantidade em cogumelos e foi identificado no Cogumelo de Paris (*Agaricus bisporus*). Contudo, o odor de cogumelos cozidos está relacionado à presença de 1-octen-3-onal. Apesar deste ser o composto mais significativo, outros também foram identificados e parecem estar relacionados à presença de compostos alifáticos com 8 carbonos: octanol, 3-octanol, 2-octen-1-ol, 3-octanona, 1-octen-3-onal, juntamente com benzil álcool, benzaldeído, hexanol e 3-metil-butanol e ésteres dos ácidos fórmico, acético e propiônico (LATRASSE et alli, 1985).

2.2.4.3- Ésteres

Ésteres representam um importante grupo de aromas tipicamente encontrados em frutas em concentrações entre 1 e 100 ppm (JANSSENS et alli, 1992).

Dentre os ésteres de ácidos graxos, os de baixo peso molecular representam uma importante classe de aromas. Muitos deles são responsáveis por odores de frutas e são constituídos principalmente por ácidos e seus derivados de cadeia curta, como acetatos, propionatos e butiratos. Pode-se citar como exemplos o etil butirato e o isoamil acetato, que são encontrados nos aromas de morango e de banana (MACEDO & PASTORE, 1997).

A presença de ésteres, como etil acetato e butil acetato, em meios de cultivo tem sua formação admitida como tradutora de um metabolismo de detoxificação, através do qual o microorganismo impede a acumulação de compostos tóxicos, como ácidos graxos de cadeia curta e álcoois de fusel. A produção de acetatos acontece como uma forma de detoxificação do meio através da conversão de ácido acético e de álcoois superiores (LATRASSE et alli, 1987).

Duas rotas metabólicas podem ser seguidas na formação de ésteres: alcoólise de compostos de Acyl-CoA e esterificação direta de um ácido orgânico. A primeira rota é percebida predominantemente em leveduras e a segunda em fungos filamentosos e bactérias. (WELSH et alli, 1989).

Os aminoácidos de cadeia ramificada são importantes precursores da biosíntese de compostos aromáticos relacionados à maturação de algumas frutas. A reação inicial que se processa é conhecida como degradação enzimática de Strecker, porque ocorrem transaminações e descarboxilações semelhantes àquelas que acontecem durante o

escurecimento não enzimático. Diversos microorganismos, entre eles leveduras e cepas de *Streptococcus lactis*, podem modificar a maioria dos aminoácidos de maneira similar à indicada na Figura 3. Mesmo que álcoois, aldeídos e ácidos formados nestas reações estejam diretamente relacionados ao amadurecimento das frutas, os ésteres são os compostos de impacto dominante. O etil acetato é importante no aroma de bananas, apesar de serem necessários outros compostos para compor a percepção final. O 2-metil-eti-butirato possui impacto característico a maçã (FENNEMA, 1993).

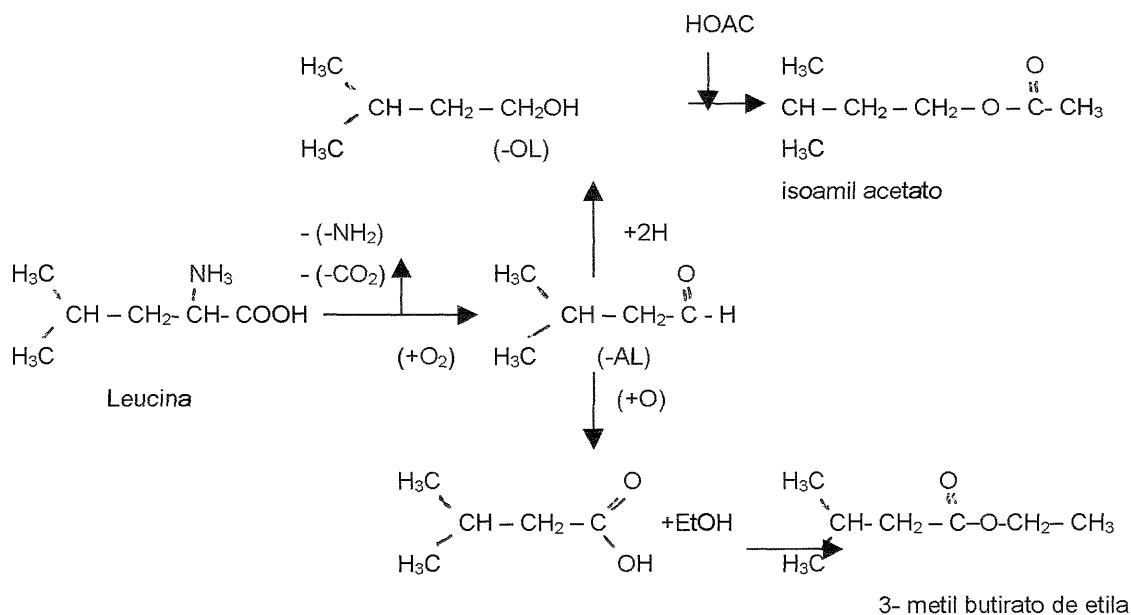


Figura 3: Transformação enzimática da leucina em voláteis, mostrando os compostos formados nas frutas maduras (FENNEMA, 1993).

JANSSENS et alli (1987), identificaram e quantificaram o aroma frutal de banana produzido pela levedura *Hansenula mrakii* e pelo fungo *Geotrichum penicilliatum* em fermentação líquida de um meio sintético. No estudo desenvolvido com a levedura concluiu-se que o aroma frutal ocorria devido à biosíntese de ésteres e álcoois. Num total de 17 compostos identificados, aqueles detectados em concentrações superiores a 50 µL/L foram: etanol, etil acetato, isobutanol, etil propionato, isobutil acetato e isopentil acetato. O nível de álcoois atingiu seu máximo no final da fase de crescimento exponencial enquanto que os ésteres foram formados na fase estacionária, sendo o etil acetato o composto produzido em maior quantidade (4283,9 µL/L). Em ambos estudos foram adicionados aminoácidos precursores de ésteres frutais: valina, leucina, isoleucina e fenilalanina. Quando isoleucina foi adicionada ao meio da levedura ocorreu o aumento da produção de 2-metil butanol e 2-metil butil acetato. No cultivo do fungo filamentoso foram identificados 33 compostos, sendo encontrados em quantidades superiores a 50 µL/L: etanol, etil acetato, isobutanol, etil propionato, propil acetato, isopentanol, etil

isobutirato, isobutil acetato, etil butirato, etil isovalerato, isopentil acetato e etil hexanoato. O componente produzido em maior concentração foi etil acetato (9924,1 µL/L).

Outro estudo efetuado com a mesma levedura por INOUE et alli (1994) cita a tolerância deste microorganismo ao etil acetato, que pode inclusive ser utilizado como única fonte de carbono. Neste estudo promove-se a comparação dos ésteres formados na produção de saquê comparando duas leveduras: *Saccharomyces cerevisiae* e *Hansenula mrakii*, sendo a primeira usada industrialmente. Os ésteres formados na produção desta bebida são predominantemente etil acetato, isobutil acetato, isoamil acetato e etil caproato e determinam a sua qualidade. A formação destes compostos pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* parece ser catalisada pela enzima álcool acetil transferase a partir de álcool e acetil CoA e as esterases não parecem contribuir na formação do éster, mas na sua hidrólise, conforme a Figura 4. No caso da levedura *Hansenula mrakii* isoamil acetato foi sintetizado tanto a partir do álcool isoamílico e acetil CoA, pela enzima acetil transferase, quanto a partir do álcool isoamílico e do ácido acético pela reação reversa da esterase.

Etil acetato, etanol, ácido acético e acetaldeído foram compostos produzidos em fermentação submersa e identificados a quase 40 anos no metabolismo de glicose pela levedura *Hansenula anomala*, sendo que neste caso a produção de etil acetato mostrou ser um processo aeróbico (DAVIS et alli, 1951).

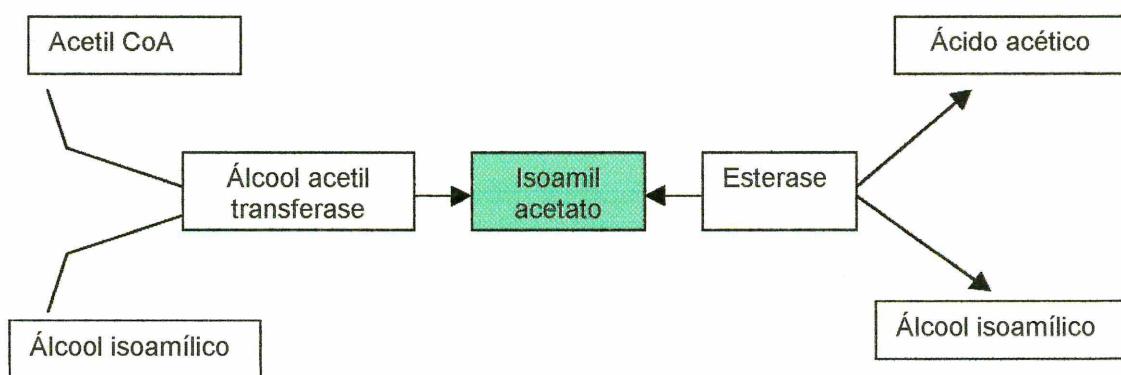


Figura 4: Síntese de isoamil acetato através das enzimas álcool acetil transferase e esterase (INOUE et alli, 1994).

As cepas de *Ceratocystis* são conhecidas pela produção de ésteres. LANZA et alli, 1976, testaram a produção de acetato de: etila, butila, propila, isobutila, amila e isoamila, variando as fontes de carbono (glicose, galactose e glicerol) e de nitrogênio (uréia, leucina) e chegou à conclusão de que o tipo de aroma percebido dependia das

duas fontes, diferentemente de outros microorganismos, como por exemplo *Trichoderma viride*.

COLLINS & MORGAN (1961) identificaram os ésteres sintetizados por diferentes espécies de *Ceratocystis*: *moniliformis*, *C. major*, *C. coerulescens* e *C. fimbriata*, em fermentação submersa do meio batata dextrose, concluindo que etil acetato e etanol foram os constituintes encontrados em maior quantidade nos destilados, exceto para a cepa de *C. fimbriata*, na qual isobutanol foi o principal constituinte. Nos cultivos com dextrose-uréia predominou um forte aroma de banana, principalmente devido à presença de isoamil acetato, também verificado naqueles contendo leucina ou isoleucina, enquanto que na combinação galactose-uréia o aroma verificado foi cítrico, devido à formação de terpenos como geranal e citronelol.

Dentre o gênero *Ceratocystis* a espécie *fimbriata* parece particularmente interessante devido seu ao rápido crescimento. Informações complementares sobre este microorganismo são apresentados no ítem 2.7.1.

Um aroma frutal a banana também foi percebido e identificado em plantas da família das chicórias (*Erwinia caratovora* subspécie *atroseptica*), quando infectadas por microorganismos. SPINNLER & DIJIAN (1991) identificaram os voláteis formados em um meio sintético similar à planta infectada. No total foram 13 os microorganismos isolados que tinham a capacidade de produzir ésteres e álcoois e os compostos identificados foram: etil acetato, 2-metil-1-propanol, acetoin, propil acetato, 2- metil-1-butanol, isobutil acetato, 2-3-butanediol, isoamil acetato e 2- metil butil acetato, sendo que em 11 cepas a produção de ésteres ficou entre 70 e 90%. Neste estudo foram testados diferentes meios de cultivo, variando as fontes de carbono e de nitrogênio, sendo que os melhores resultados foram obtidos com meios contendo glicose, frutose ou sacarose e asparagina. A adição de leucina produziu isoamil acetato, correspondendo à degradação do aminoácido, seguindo a rota de Erlich.

O beiju é uma massa de mandioca naturalmente fermentada, com características frutais, usada pelos índios e caboclos no Maranhão, Norte do Brasil, para a produção de uma bebida alcoólica típica: a tiquira. A população microbiológica identificada por PARK et alli (1982) varia entre 6×10^5 e $1,9 \times 10^6$ unidades formadoras de colônias englobando predominantemente *Aspergillus niger* e *Paecylomyces* sp, em quantidades moderadas *Rhizopus delemar* e em menor número *Neurospora* sp.

YOSHIZAWA et alli (1988) identificou os voláteis produzidos pela cepa de *Neurospora*, isolada por PARK et alli (1982), em fermentação submersa: etanol, etil

acetato, isoamil acetato, etil hexanoato (etyl caproato) e acetoin. YAMAUCHI et alli (1989, 1991) avaliou os efeitos das fontes de carbono, nitrogênio e da adição de solução salina no tipo de aroma e concluiu que os compostos produzidos não mudaram significativamente, mas foi identificado 1-octen-3-ol nos cultivos, aroma típico de cogumelos, sendo isto também reportado por PASTORE & PARK (1994), atingindo os seguinte valores: etil acetato 0,9 ppm, etanol 111 ppm, isoamil acetato 117 ppm, etil hexanoato 16 ppm e 1-octen-3-ol 50 ppm.

2.2.4.4- Lactonas

A referência à presença de lactonas em alimentos remonta de 1950, sendo por exemplo encontradas em: damasco, côco, café, mel, produtos lácteos, laranja, pêssego e pipoca (MAGA, 1976). Estes compostos são particularmente interessantes por possuírem propriedades sensoriais marcantes e agradáveis e por terem a síntese microbiológica relativamente bem conhecida.

Alguns microorganismos, como: *Ceratocystis moniliformis*, *Trichoderma viride*, *Sporobolomyces odorus* e certas espécies de *Candida*, têm sido reportados como produtoras de lactonas; contudo, os rendimentos ainda são baixos (mg/L) sendo exceção a produção *in situ* de lactonas em produtos lácteos.

Trichoderma viride é um fungo comumente encontrado no solo e conhecido pelo antagonismo em relação a outros fungos. Nos meios de cultivo, líquidos ou sólidos, produz uma lactona com intenso aroma de côco. COLLINS & HALIM (1972), cultivando-o em meio batata dextrose líquido, identificaram o composto como sendo 6-pentil- α -pirona, produzido durante a fase de esporulação.

Diferentes estudos foram efetuados no sentido de aprofundar os conhecimentos referentes a este microorganismo. A variação da fonte de carbono, de nitrogênio e do tipo de fermentação foram reconhecidos por afetar a quantidade mas não o tipo do composto aromático produzido, sendo que a fermentação sólida apresentou rendimentos superiores (YONG et alli 1985; YONG & LIM, 1986; ZEPPA et alli, 1990).

Em fermentação líquida após atingida a concentração de 90 e 110 ppm (1 g/L), em 120 horas, seguiu-se o efeito inibitório causado pela própria lactona, que direcionou o estudo para a utilização de resinas capazes de retirá-la do meio de cultivo (PRAPULLA et alli, 1992). SERRANO-CARREON et alli (1993) estudaram a rota metabólica desta

lactona em diferentes espécies de *Trichoderma* e os resultados sugerem que a beta oxidação do ácido linoléico é o principal passo na biosíntese deste composto.

GERVAIS et alli (1988) estudaram a influência da atividade de água na produção de 2-heptanona, aroma de queijo, por este mesmo microorganismo e concluíram que a atividade ótima de crescimento radial é entre 0,96 e 0,98 e a ótima para esporulação (e consequente produção de aromas) é 0,98.

Sporobolomyces odorus é uma levedura que produz γ -decalactona, substância com aroma característico de pêssego. LEE & CHOU (1994) verificaram que a adição de 3% de óleo de castor no meio de cultivo aumentou a produção desta lactona em seis vezes, atingindo o rendimento de 8,62 mg/L (ppm).

2.2.4.5- Diacetil

Este composto é caracterizado por seu odor de manteiga, sendo por isso muito usado em produtos que buscam esta nota aromática. A indústria já utiliza *Streptococcus lactis* para a sua produção.

2.2.4.6- Terpenos

Monoterpenos são produtos predominantemente derivados do metabolismo secundário de plantas, de alguns animais e microorganismos. Terpenos tais como: linalol, geraniol, nerol, citronelol, geranal e neral foram identificados em cultivos de *Ceratocystis variospora*, *C. moniliformis* e *Trametes odorata*.

Com freqüência possuem propriedades de impacto e podem ser identificados facilmente por uma pessoa treinada. Os monoterpenos citral e limoneno apresentam aromas de limão e laranja lima, respectivamente.

Iononas e damasconas são compostos terpênicos cílicos. α -ionona pode ser encontrada em óleos naturais de frutas, como framboesa, e em perfumes de rosa. α e β - damascona possuem estruturas parecidas a iononas; contudo as primeiras possuem aroma mais frutal, enquanto que as segundas floral (WELSH et alli, 1989).

LANZA et alli, 1976, esclareceram que a síntese de monoterpenos por *Ceratocystis moniliformis* segue a rota metabólica do mevalonato, como em plantas superiores. A qualidade e a intensidade dos aromas estão relacionadas com a fonte inorgânica de nitrogênio, variando quando glicina ou metionina são adicionadas.

Ceratocystis variospora foi estudado por Collins e Halim e os seguintes monoterpenos foram identificados: linalol, citronelol, geranal, neral, geraniol, nerol e alfa-terpinol. (HUBBALL & COLLINS, 1978).

A levedura *Kluyveromyces lactis* é capaz de produzir monoterpenos como citronelol e linalol, em concentrações na ordem de 50 µg/L, usando a asparagina como fonte de nitrogênio (DRAWERT & BARTON, 1978). Fungos filamentosos como *Ceratocystis moniliformis* atingem concentrações de 30 mg/L (nerol), 130 mg/L(geraniol) e 200 mg/L (citronelol) (WELSH et alli, 1989).

O baixo rendimento dos terpenos produzidos microbiologicamente e a abundância de fontes botânicas fazem com que o desenvolvimento de processos fermentativos seja, do ponto de vista econômico, desnecessário; contudo, o verdadeiro valor destas pesquisas está no conhecimento das etapas do catabolismo terpênico, que permitirá a biotransformação de precursores sem valor em terpenos de maior valor comercial, como no caso do mentol.

2.2.4.7- Pirazinas

Estes compostos são típicos de alimentos aquecidos/cozidos, normalmente formados pela reação de Maillard, tipicamente em café, assados e produtos cárneos. Alguns microorganismos são capazes de sintetizar estes elementos. Um exemplo é *Corynebacterium glutamicum* que produz quantidades relevantes de tetrametilpirazinas: três gramas por litro em cinco dias de fermentação (JANSSENS et alli, 1992).

Pirazinas podem ser adicionadas nos alimentos para gerar notas aromáticas especialmente em produtos específicos para microondas.

2.3- FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO

2.3.1- Definição

A Fermentação no Estado Sólido (FES), tradução do inglês **Solid State Fermentation**, é um processo no qual microorganismos se desenvolvem na superfície de materiais sólidos, que têm a propriedade de absorver água com ou sem nutrientes solúveis.

Pode ser definida em relação às propriedades do substrato a ser transformado: matriz porosa e sólida, a qual pode ser biodegradável ou não e que possui grande área por unidade de volume, com a finalidade de propiciar o crescimento microbiológico na interface sólido/gás (RAIMBAULT, 1998).

O material sólido utilizado na FES é geralmente fragmentado e de natureza granular ou fibrosa, o que permite a retenção de água por higroscopia ou capilaridade, conferindo porosidade conveniente ao desenvolvimento microbiano. A quantidade de água presente varia em função do material utilizado. Os substratos amiláceos são geralmente fermentados com umidade inicial entre 25 e 65%, enquanto que os substratos lignocelulósicos permitem trabalhar com teores mais elevados, entre 60 e 80% (SOCCOL, 1994).

Segundo RAIMBAULT (1998) para ser considerado adequado o suporte deve apresentar as seguintes características:

- a) Matriz porosa com área entre 10^3 e 10^6 m²/L;
- b) O ar, mistura de oxigênio com outros gases, deve fluir sob relativa baixa pressão e misturar-se uniformemente ao suporte;
- c) A matriz deve absorver uma ou muitas vezes o seu peso seco em água, além de apresentar alta atividade de água na interface sólido / gás, com o objetivo de permitir rápidas velocidades de processos bioquímicos;
- d) A interface sólido/gás deve ser adequada ao rápido desenvolvimento de microorganismos, isoladamente ou em co-cultivo;
- e) As propriedades mecânicas da matriz sólida devem suportar compressão ou gentil agitação, como partículas granulares ou fibrosas as quais não tendem a quebrar ou aderir-se;
- f) A matriz sólida não deve estar contaminada com inibidores de atividade microbiana e deve ser capaz de absorver ou conter nutrientes para o crescimento do microorganismo, como carboidratos (celulose, amido ou açúcares), fontes de nitrogênio (amônia, uréia, peptídios) e sais minerais.

2.3.2- Utilizações

No Ocidente é empregada na fabricação de alimentos fermentados, como o queijo Roqueffort. Em países Asiáticos estas fermentações envolvem essencialmente os

produtos à base de proteínas vegetais, como a soja. Neste caso, o objetivo de tornar as proteínas desta leguminosa em proteínas mais facilmente assimiláveis pelo homem.

A FES é um método extensivamente utilizado por fungos filamentosos os quais adaptam-se melhor a este tipo de cultivo, sendo uma alternativa interessante de resíduos agroindustriais.

Tabela 2: Principais aplicações da FES em diferentes setores econômicos.

Setor Econômico	Aplicação	Exemplos
Indústrias agro-alimentares	Fermentação de alimentos tradicionais	Koji, Tempeh, Ragi, queijos fermentados
	Produção de cogumelos e ““spawn””	Agaricus, Pleurotus, Shiitake
	Bioconversões	Bagaço de cana, polpa de café, silagem, compostagem, detoxificação.
	Aditivos alimentares	Aromas, óleos essenciais, ácidos orgânicos.
Agricultura	Biocontrole, Bioinseticidas	<i>Beauveria</i> , <i>Metarrhizium</i> , <i>Trichoderma</i>
	Crescimento de plantas hormônios	<i>Gibberellins</i> , <i>m</i> <i>Rhizobium</i> , <i>Trichoderma</i>
Fermentação Industrial	Produção de enzimas	Amilases, celulases, proteases, pectinases, xilanases, entre outras
	Produção de antibióticos	Penicilina e probióticos
	Produção de ácidos orgânicos	Ácidos: cítrico, fumárico, lático
	Produção de etanol Metabólitos fúngicos	Hormônios e alcalóides

Fonte: RAIMBAULT, 1998

2.3.3- Comparação entre a FES e a Fermentação Submersa

As vantagens da FES em relação à fermentação submersa são: a aeração é facilitada pelas características da matriz, a ausência de fase líquida permite reduções no volume do fermentador e nos efluentes líquidos do processo, menor risco de contaminação bacteriana, em determinados casos não há necessidade da esterilização do material, o meio de cultivo é simples e muitas vezes composto de resíduos agroindustriais. As principais desvantagens são: remoção do calor gerado na fermentação, dificuldade de medição de parâmetros (como pH e biomassa) e perda de umidade nas fermentações de longa duração.

Tabela 3: Comparação entre fermentação em estado sólido e fermentação submersa.

Fator	Fermentação Submersa	Fermentação Estado Sólido
Substrato	Solúveis (açúcares)	Polímero insolúvel (amido, celulose, pectinas e lignina)
Condições assépticas	Esterilização com calor e controle asséptico	Tratamento com vapor, condições não estéreis.
Água	Elevados volumes de água consumida e efluentes sem efluentes descartados.	Consumo de água limitado,
Aquecimento metabólico	Fácil controle da temperatura	Baixa capacidade de transferência de calor.
Aeração (oxigênio)	Limitação de oxigênio solúvel e requerimento de elevadas quantidades de ar.	Aeração fácil e grande superfície de contato ar/substrato.
Controle do pH	Fácil	Dificultado
Agitação mecânica	Boa homogeneização	Preferencialmente condições estáticas
Escalonamento	Equipamentos industriais disponíveis.	Necessidade de projetos
Inoculação	Fácil, processo contínuo	Inoculação de esporos, batelada.
Contaminação	Riscos de contaminação por bactérias.	Risco de contaminação pela baixa taxa de crescimento fúngico.
Considerações energéticas	Elevado consumo de energia	Baixo consumo de energia.
Volume do equipamento	Elevados volumes e tecnologia de alto custo	Pequenos volumes e equipamentos de baixo custo.
Efluentes e poluição	Grande volume de efluentes poluentes	Sem efluentes, menor poluição
Concentração S/Produtos	30 – 80 g/L	100 – 300 g/L

Fonte: RAIMBAULT, 1998

2.3.4- Fatores que afetam a FES

2.3.4.1- Microorganismos

Bactérias, leveduras e fungos filamentosos podem crescer em substratos sólidos, apesar destes últimos estarem melhores adaptados. Isto porque a colonização acontece apicalmente e por ramificações das hifas, permitindo rápida exploração do meio de cultivo e seus nutrientes, além das características fisiológicas, enzimológicas e bioquímicas destes microorganismos (RAIMBAULT, 1998). Naturalmente os fungos se desenvolvem em materiais sólidos. Eles são capazes de invadir a superfície e penetrar nos espaços

intracelulares e intercelulares na procura de substratos necessários ao seu desenvolvimento.

Trabalhos que relacionam o cultivo de leveduras em FES são escassos, sendo que alguns descrevem a produção de etanol e o enriquecimento protéico de substratos; contudo, as leveduras fornecem modelos de controle do metabolismo, além de possuírem a vantagem de serem facilmente separadas do suporte, o que permite a utilização de métodos de medição de biomassa similares aos usados nas fermentações submersas (SAUCEDO-CASTAÑEDA, 1992).

2.3.4.2- Substratos e Suportes

Na FES os substratos utilizados podem ser do tipo amiláceo ou lignocelulósico. No primeiro caso grãos de cereais, fontes de açúcares diretamente assimiladas e degradadas pelos microorganismos; no segundo, os substratos são mais complexos e compostos de celulose, hemicelulose e lignina.

O preparo e pré-tratamento do substrato são passos importantes e envolvem, entre outros procedimentos: a diminuição do tamanho das partículas, a hidrólise de polímeros, a suplementação com nutrientes e o cozimento com vapor, para degradação da estrutura macromolecular e para eliminação dos maiores contaminantes.

2.3.4.3- Atividade de água e umidade

Na FES a quantidade de água presente no meio é função da capacidade de retenção da matriz sólida, sendo que esta quantidade deve cobrir as necessidades de crescimento do microorganismo sem destruir a estrutura sólida ou reduzir a porosidade do substrato. Sua medida está relacionada com a concentração do soluto, forças capilares e propriedades de absorção do substrato sólido (GERVAIS, 1990).

A água neste tipo de fermentação desempenha diferentes papéis: influencia diretamente no microorganismo, serve de veículo de enzimas, nutrientes, metabólitos e intervém na solubilização do oxigênio. O efeito da atividade de água sobre os microorganismos é bastante conhecido: não existe transporte de água na célula e a água se move como uma função do gradiente entre os meios intra e extra-celulares (GERVAIS, 1990). Durante a fermentação ocorrem mudanças na atividade de água do substrato, devido à perda de umidade do meio com o calor gerado durante a fermentação e decorrente da liberação de água do metabolismo microbiano.

Geralmente as bactérias se desenvolvem em atividades de água elevadas entre 0,85 – 0,99, leveduras em atividades de água de 0,75 a 0,9 e fungos filamentosos entre 0,6 e 0,9.

A influência da atividade de água na produção de aromas extracelulares foi abordada por GERVAIS (1990), avaliando o desenvolvimento de dois microorganismos *Trichoderma viride* e *Sporodiobolus salmonicolor*, respectivamente um fungo filamentoso e uma levedura. Nos dois casos a produção variou drasticamente com a alteração da atividade de água. A lactona produzida pela levedura em meio líquido, gama-decalactona, foi sintetizada em maiores quantidades com valores de atividade de água entre 0,99 e 0,97, enquanto que para 2-heptanona produzida pelo fungo filamentoso em meio sólido a melhor condição foi aquela com 0,96. O autor levanta a possibilidade de que o aumento da produção de voláteis conseguida com a diminuição da atividade de água é função da pressão osmótica: quando a pressão externa aumenta as células têm que equilibrar seu interior para prevenir o estresse osmótico causado pela perda passiva de água; contudo o estudo cita como hipótese mais provável que o acúmulo da lactona seja função da variação da permeabilidade celular, até um valor que iniba os sistemas enzimáticos.

2.3.4.4- Aeração

Na FES a aeração desempenha quatro finalidades: manutenção das condições aeróbicas, promoção da dessorção do dióxido de carbono, reguladora da temperatura do substrato e reguladora dos níveis de umidade (RAIMBAULT, 1998).

O controle da fase gasosa e do fluxo de ar é simples e geralmente não são observadas limitações de oxigênio neste tipo de fermentação.

2.3.4.5- Temperatura

Na FES a liberação do calor produzido no decorrer da fermentação, devido às atividades metabólicas microbianas, provoca a elevação da temperatura no meio do fermentador, o que acarreta um problema devido à limitada capacidade de transferência de calor dos substratos sólidos (RAIMBAULT, 1998).

A retirada deste calor gerado é um fator crucial em processos de larga escala e a aeração auxilia neste processo e também no controle da perda de umidade do meio.

2.3.4.6- pH

O pH inicial de um cultivo é ajustado ao ótimo no início do processo, por uma solução que impregna o suporte e o controle só poderá ser efetuado novamente no final da fermentação. O valor deste parâmetro tende a variar em resposta às atividades metabólicas microbianas, seja através da produção de ácidos, do consumo destes ou da degradação de compostos como uréia, que tendem a aumentar o pH.

2.4- CAFÉ

2.4.1- Mercado Brasileiro

Segundo a USDA - Departamento de Agricultura dos Estados Unidos - a produção mundial de café beneficiado para a safra de 96/97 estava estimada em 99,1 milhões de sacas de 60 Kg de café beneficiado, cerca de 14% superior à safra de 95/96 (SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO DO PARANÁ, JUN/JUL 96).

Tabela 4: Café beneficiado - produção mundial dos principais países produtores 1991/92 a 1996/97 (em mil sacas de 60 Kg).

Países	1991/92	1992/93	1993/94	1994/95	1995/96	1996/97
Brasil	28.500	24.000	28.500	28.000	16.800	27.500
Colômbia	17.980	14.950	11.400	13.000	12.500	13.000
Indonésia	7.100	7.350	7.400	6.000	5.800	6.500
México	4.620	4.180	4.200	4.030	4.500	4.700
Guatemala	3.549	3.584	3.078	3.500	3.511	3.500
Etiópia	3.000	2.800	3.700	3.800	3.800	3.900
Índia	3.200	2.700	3.465	3.060	3.490	3.200
Costa do Marfim	3.967	2.500	2.700	3.733	2.800	3.200
Uganda	2.900	2.800	2.700	3.100	3.400	3.200
Vietnã	1.980	2.250	2.500	3.500	3.400	3.500
Costa Rica	2.530	2.620	2.475	2.492	2.595	2.550
El Salvador	2.357	2.894	2.361	2.314	2.265	2.250
Honduras	2.255	1.981	2.060	2.295	2.290	2.460
Equador	1.700	1.560	2.150	2.550	2.150	2.250
Outros	18.677	16.672	14.618	16.366	17.459	17.200
Total	104.315	92.841	93.307	97.740	86.760	99.110

Fonte: SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO DO PARANÁ JUN/JUL 96.

Da safra 96/97 o Paraná foi responsável pela produção de 1,9 milhões de sacas de 60 Kg, ou seja, 7% do total brasileiro. Para o período de 97/98 estima-se que a produção estadual varie entre 1,9 e 2,1 milhões de sacas de 60Kg de café beneficiado (SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO DO PARANÁ, MAIO 98).

O Brasil é o único país do mundo que tem ao mesmo tempo forte volume de produção e de consumo, Colômbia, países da América Central, África e Ásia destacam-se apenas como produtores. Os principais consumidores são: Brasil (10,1 milhões de sacas/ano), os Estados Unidos (18 milhões de sacas/ano), o Japão e a Europa, sendo

que a Alemanha sozinha consome 12 milhões de sacas/ano. No Brasil estes valores equivalem a 2,98 quilos *per capita* (SILVA, 1996) e o Paraná representa 8% do consumo nacional (FILHO et alli, 1997).

Segundo dados apresentado por MASSON et alli (1984^a), a industrialização do café por via seca, processo adotado no Brasil gera 50% de resíduo em casca. Estes dados foram confirmados pela indústria que forneceu o material para pesquisas.

2.4.2- Estruturas Gerais do Grão

A semente apresenta-se dupla e plana, sendo que cada uma das metades é recoberta por um delicado tecido conhecido como película. A casca está coberta por uma camada de 5 mm de células esponjosas que formam a polpa (BRAHAM & BRESSANI, 1978).

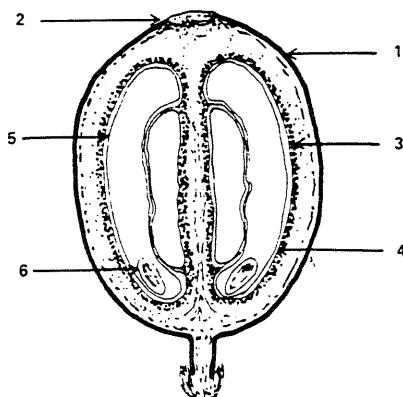


Figura 5: Corte longitudinal de uma semente de café. 1- casca, 2- disco, 3- capa mucilaginosa, 4- endocarpo, 5- película que envolve a semente, 6- embrião (BRAHAM & BRESSANI, 1978).

2.4.3- Composição Química da Casca

Análises efetuadas nos laboratórios da UFPR apresentaram os seguintes resultados em relação à composição química das cascas de café, cedidas por duas fontes: IAPAR e pela empresa Café DAMASCO.

Tabela 5: Composição química da casca de café*

Característica	Damasco	IAPAR
Umidade (%)	13,13	10,98
Lipídios (%)	1,56	1,62
Fibras (%)	28,2	23,73
Proteínas (%)	6,93	5,46
Cinzas (%)	6,21	5,34
Açúcares redutores (mg glicose/g amostra)	8,52	9,33

* Determinada no Laboratório de Análises Químicas da UFPR.

2.4.4- Beneficiamento dos Grãos: Via Seca e Via Úmida

No Brasil o processo de seleção e descasque do café é feito por via seca, conforme o fluxograma apresentado na Figura 6. Após a secagem, quando o grão já possui aproximadamente 11% de umidade, procede-se o descasque. (MASON et al 1984^a; 1984^b; 1985).

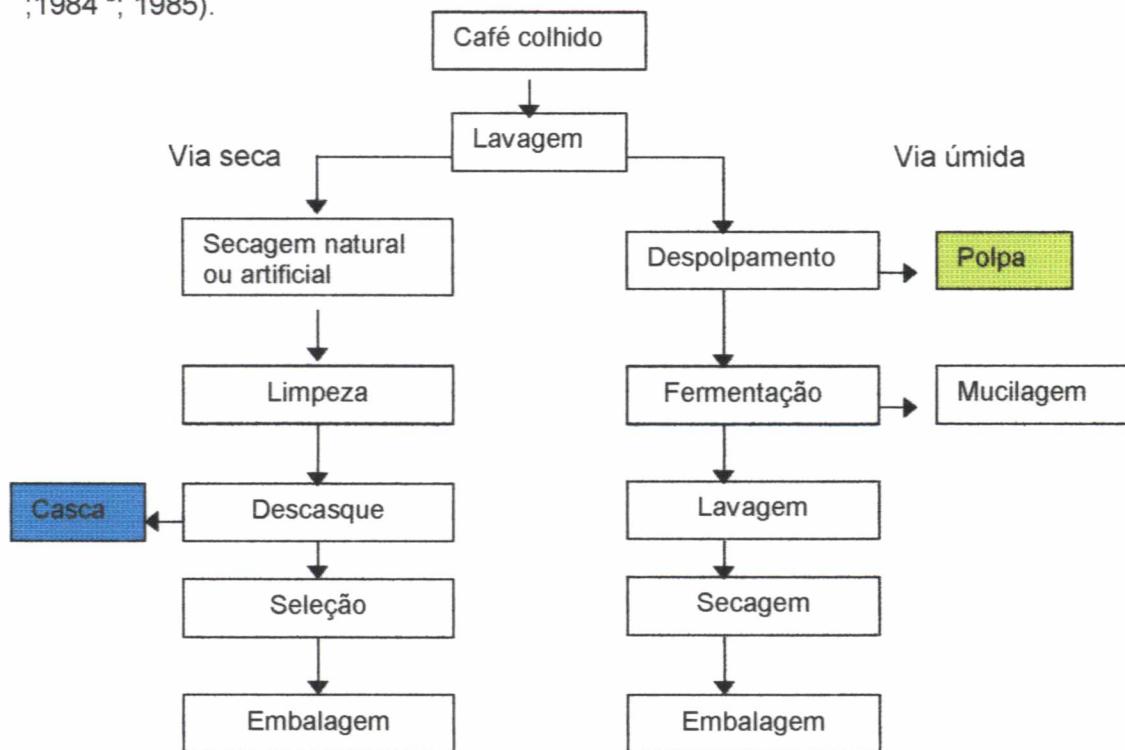


Figura 6: Fluxograma das diferentes vias de obtenção do café de qualidade comercial (via seca e via úmida).

Devido à presença de fatores antinutricionais, como cafeína, taninos e polifenóis, a utilização destes resíduos na alimentação animal é restrita (ROUSSOS et alli, 1995).

A polpa obtida pelo processo de via úmida vem sendo bastante explorada nos últimos dez anos. Como exemplo pode-se citar:

- estudo na produção de cogumelos comestíveis, como por exemplo: *Pleurotus ostreatus* (MARTINEZ- CARRERA et alli, 1988), *Volvariella bombycina* (SALMONES et alli, 1988), entre outros.
- utilização como meio de cultivo de leveduras. TAUK (1986) utilizou o extrato líquido da polpa de café como meio de crescimento de *Candida utilis*, acrescido de açúcar, sulfato de amônia e ácido fosfórico.
- degradação da cafeína por fungos filamentosos, que a utilizam como fonte de nitrogênio. ROUSSOS et alli (1995) selecionaram 242 fungos de regiões cafeeiras que foram capazes de degradar a cafeína, destacando-se entre eles: *Aspergillus sp*, *Penicillium sp*, *Trichoderma sp*, *Fusarium sp*, *Humicola sp*. Cinco cepas do gênero *Aspergillus* e duas de *Penicillium* apresentaram níveis de degradação de cafeína próximos a 100%.

2.5- Micoorganismos estudados

2.5.1- *Ceratocystis fimbriata*

São fungos filamentosos, ascomicetos, pertencentes à família *Ophistomaceae*, classe *Phycomycetozoa*, ordem *Sphaeriales*. As espécies *fimbriata* e *moniliformis* vêm sendo estudadas por serem produtoras de aromas frutais (SENEMAUD, 1988; CHRISTEN & RAIMBAULT, 1991; CHRISTEN et alli, 1997; BRAMORSKI, 1997) e se destacam na produção de terpenos e ésteres, responsáveis por aromas de banana, laranja, gerânio e rosa. Entre os compostos identificados por LANZA et alli, 1976, destacam-se geraniol, nerol, linalol, citronelol, geranal e nerol. Culturas selecionadas quando cultivadas em meios sintéticos produzem aromas frutais, variáveis conforme a fonte de carbono utilizada.

De todas as espécies *Ceratocystis* o gênero *fimbriata* parece ser particularmente interessante devido ao seu crescimento relativamente rápido (coletam-se com 5 dias) e à variedade de aromas produzidos (SENEMAUD, 1988).

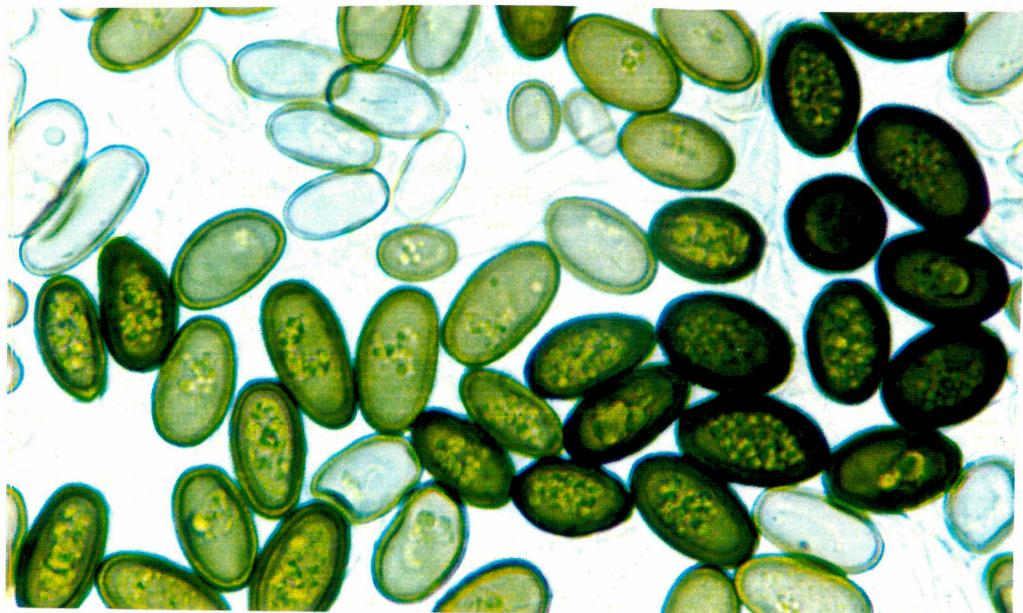


Figura 7: Fotografia dos esporos de *Ceratocystis fimbriata* com aumento de 400 vezes, tirada no Laboratório de Botânica Estrutural da UFPR, pelo professor Yedo Alquini.

Em 1991, CHRISTEN & RAIMBAULT otimizaram um meio de cultivo para a produção de aromas por este fungo, usando um estudo 2^{7-4} fatorial: glicose 50 g/L, uréia 1,9 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4,5 g/L, KH_2PO_4 1g/L, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,75 g/L, solução de oligoelementos $(\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 723,8 mg/L; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ 439,8 mg/L; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 203 mg/L) 2mL, tiamina 150 $\mu\text{g}/\text{L}$, biotina 10 $\mu\text{g}/\text{L}$.

CHRISTEN et alli, 1994, produziram com êxito aromas frutais sobre diferentes substratos, demonstrando a importância da relação carbono e nitrogênio ser mantida entre 18 e 30. Os aromas percebidos foram: abacaxi, banana, maçã, pêra e nozes, variando com o meio de cultivo. Apesar do crescimento em meio sólido ter sido regular, os aromas não eram tão intensos quanto aqueles produzidos em culturas líquidas.

CHRISTEN et alli, 1997, exploraram a capacidade deste microorganismo em meio sólido, estudando a influência do substrato (bagaço de mandioca, farelo de trigo e bagaço de cana adicionado de meio sintético) e da adição de aminoácidos. Quando o microorganismo cresceu nestes meios sem complementação de uma fonte de nitrogênio (uréia, leucina ou valina) somente quatro ou seis compostos chaves foram detectados no *headspace*. Dos meios testados o bagaço de mandioca foi o que apresentou maior produção total de voláteis.

Na fermentação de bagaço de mandioca sem adição de aminoácidos a produção total de voláteis foi de 2265 µmoleq. etanol/L; como foram 7,5 gMS usadas no experimento, produzindo 302 µmol eq. etanol/L gMS de voláteis totais. O tempo total de produção foi de 140h e a velocidade foi de 0,063/h. Foram sintetizados os seguintes compostos: etanol, etil acetato, acetaldeído, etil propionato, 3-metil butanol e 3-metil butil acetato.

Quando este meio foi umidecido com uma solução 167mMol leucina a produção total dos voláteis foi de 2702,7 µmol eq. etanol/L gMS, nove vezes maior do que o meio sem a adição deste aminoácido. A velocidade de produção foi de 0,042/h e o tempo de máxima produção ocorreu em 68,3 h. Além dos voláteis sintetizados no meio básico, que foram produzidos em concentrações maiores, foram detectados: 1- butanol, acetona, 2-heptanona, 2- octanona, etil hexanoato.

Quando o mesmo meio foi adicionado de valina o resultado em relação ao total de voláteis produzidos foi similar, mas outros compostos, além dos seis encontrados no meio básico, foram sintetizados: propanol, isopropanol, 2- heptanona e etil pentanoato.

A adição de uréia ao meio de bagaço de mandioca não promoveu a biosíntese de compostos voláteis.

BRAMORSKI, 1997, estudou a produção e o crescimento deste fungo em diferentes substratos sólidos embebidos de solução salina, em Erlenmeyer e em colunas de fermentação. Em Erlenmeyer comparando o comportamento do meio adicionado de óleo de soja com seu padrão sem adição percebe-se que a produção de compostos voláteis daquele foi uma vez e meia maior, tendo havido incremento porporcional na produção de ésteres e álcoois.

Os compostos voláteis produzidos em todos os meios, variando em concentração: acetaldeído, etanol, 2-propanol, 2- hexanol, etil acetato, etil propionato, etil butirato e isoamil acetato.

Na segunda etapa deste estudo foi avaliado o crescimento do *C. fimbriata* em reatores de colunas, sendo que neste estudo todos os meios foram adicionados de 10 mM de leucina. Nestes meios, além dos voláteis citados anteriormente, foram sintetizados em todos os meios: 1-propanol, álcool isoamílico, 2-hexanona.

Este trabalho ainda conclui que houve redução quantitativa da produção de voláteis nos meios adicionados de leucina, com alteração das proporções entre álcoois e ésteres; enquanto os álcoois reduziram proporcionalmente a produção, os ésteres aumentaram, especialmente isoamil acetato e etil propionato (BRAMORSKI, 1997).

2.5.2- *Pachysolen tannophilus*

Pachysolen tannophilus é uma levedura capaz de fermentar hexoses e pentoses na produção de etanol ou xilitol, sendo que diversos trabalhos vem sendo desenvolvidos neste sentido (ROEBUCK et alli, 1995; FURLAN et alli, 1994; XU & TAYLOR, 1993; PEREGO et alli, 1990; BARBOSA et alli, 1990; KRUSE & SCHUEGERL, 1996). A utilização de xilose é essencial para obter uma conversão eficiente de lignocelulose a etanol, visto que pentoses correspondem a um terço dos açúcares produzidos na hidrólise de madeiras.

Na utilização de hidrolisado de madeira em hemicelulose para produção de etanol PEREGO et alli, 1990, testou três leveduras: *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* e *Pachysolen tannophilus*, sendo esta última aquela que apresentou melhores resultados.

O maior problema na fermentação de pentoses usando substratos lignocelulósicos é a presença de D-glicose, a qual inibe a utilização de D-xilose, pela repressão da atividade da xilose redutase e xilitol desidrogenase. Estudos com *Pachysolen tannophilus* sugerem que D- glicose inibe as enzimas capazes de sintetizar D-xilose, mas que esta inativação poderia ser revertida em baixas concentrações de D-glicose (LEE, 1992). Outros experimentos mostraram que a D-frutose apresenta o mesmo efeito inibitório (BICHO et alli, 1989), fato também observado na presença de D- manose (BICHO et alli, 1988).

Estudos buscando a otimização do crescimento deste microorganismo para produção de etanol em fermentação submersa indicam que seu máximo crescimento ocorre em pH 3,7 e 31,5°C, com concentração inicial de xilose de 50g/L (ROEBUCK et alli, 1995). A tolerância desta levedura ao etanol é de 20 g/L (WANG & WANG, 1990).

KRUSE & SCHUEGERL (1996), pesquisando a produção de etanol em diferentes substratos através de fermentação submersa, cita a produção de etanol, acetaldeído e acetato pela levedura.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Primeira etapa: seleção de dois microorganismos e um meio de cultivo para continuidade do trabalho

3.1.1- Microorganismos

3.1.1-1- Seleção de cepas

Foram selecionados dez microorganismos, segundo levantamento bibliográfico, provenientes de diferentes bancos de cultura. Os seis primeiros são fungos filamentosos e os demais leveduras:

<i>Ceratocystis fimbriata</i>	CBS 374-83 (Cedida por CHRISTEN,P. ORSTOM, França)
<i>Neurospora toroi</i>	CCT 3808 (Centro de Culturas Tropicais André Tosello, Brasil)
<i>Trichoderma viride</i>	LPB 1211
<i>Trichoderma harzianum</i>	LPB 1324
<i>Rhizopus oryzae</i>	NRRL 395 (Northerm Regional Research Laboratory, USA)
<i>Rhizopus oryzae</i>	ATCC 28627 (American Type Culture Collection,USA)
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	IZ- 275 ESALQ (ATCC 10022)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	IZ- 78 ESALQ
<i>Pichia stipitis</i>	Cedida por José Domingos Fontana, Departamento de Bioquímica - UFPR
<i>Pachysolen tannophilus</i>	Cedida por José Domingos Fontana, Departamento de Bioquímica - UFPR

3.1.1-2. Manutenção das Cepas

Os microorganismo foram periodicamente repicados em tubos de ensaio, contendo meio de cultivo inclinado específico e mantidos a 4°C. *Ceratocystis fimbriata*, *Neurospora toroi* e ambas cepas de *Rhizopus oryzae* foram mantidas em ágar batata dextrose, *Trichoderma viride* e *Trichoderma harzianum* em ágar de aveia e as leveduras em meio ágar malte-levedura da Difco.

3.1.1-3. Obtenção dos inóculos

As leveduras foram inoculadas em Erlenmeyer de 250mL contendo 50 mL do meio YM da Difco, cobertos com oito camadas de gaze, sob agitação contínua de 180 rpm. As temperaturas de incubação foram definidas conforme orientação das referências

consultadas ou dos bancos de cultura: *Kluyveromyces marxianus* 23°C, *Kluyveromyces lactis* 23°C, *Pichia stipitis* 28°C e *Pachysolen tannophilus* 28°C. Estas condições foram mantidas até que fosse atingida a concentração celular necessária de cada experimento, verificada em câmara de Neubauer.

Os fungos filamentosos foram inoculados em Erlenmeyers de 250 mL, cobertos com oito camadas de gaze, contendo 50mL do mesmo meio no qual foram mantidos (ítem 3.1.1-2). A temperatura e o tempo de incubação para a coleta de esporos também foram determinados seguindo os dados especificados nas referências consultadas ou a orientação dos bancos de cultura: *Ceratocystis fimbriata* 28°C/ 5 dias, *Neurospora toroi* 28°C/ 5 dias, *Trichoderma viride* 28°C/ 5 dias, *Trichoderma harzianum* 28°C/ 8 dias, *Rhizopus oryzae* 395 32°C/ 8 dias e *Rhizopus oryzae* 28627 32°C/ 8 dias. A coleta dos esporos foi realizada com a adição de 60 mL de água destilada estéril adicionada de 3 gotas de Tween 80 (aproximadamente 0,2 mL) e pérolas de vidro, seguida de agitação magnética a 200 rpm durante 15 min, obtendo-se desta forma uma suspensão de esporos.

A contagem do número de células/esporos foi feita em câmara de Neubauer. Neste estudo os microorganismos foram inoculados no meio de cultivo de maneira que a concentração final de células/esporos fosse de 1×10^7 em cada grama de matéria seca (MS).

3.1.2 – Substratos

3.1.2-1. Preparo dos meios de cultivo

Três foram os substratos estudados na primeira fase:

- Casca de café: cedida pela indústria Café Damasco, localizada na região metropolitana de Curitiba. Ao chegar no Laboratório de Processos Biotecnológicos (UFPR) foi desidratada a 55°C, em estufa com fluxo de ar, por 18h até ficar com aproximadamente 6% de umidade. Em seguida, o material foi moído até que suas partículas tivessem aproximadamente 0,8 mm.
- Extrato e resíduo sólido: Objetivando avaliar a produção de aromas em meio líquido e em meio sólido procedeu-se uma extração com vapor fluente de 200g de casca de café/L de água destilada, durante 40 min, seguida de simples filtração.

Desta filtragem restou um resíduo sólido interessante em nutrientes e, possivelmente, menos tóxico aos microorganismos do que a casca, já que determinados compostos, como sais e cafeína, são hidrossolúveis e provavelmente passaram ao extrato. Efetuou-se, então, a desidratação deste resíduo a 55°C, em estufa com fluxo de ar, até que ficasse com aproximadamente 6% de umidade, o que garantiu sua conservação prolongada e possibilitou posteriores estudos da influência da variação da umidade do meio de cultivo na produção dos aromas. Sua granulometria, após desidratação, foi novamente verificada.

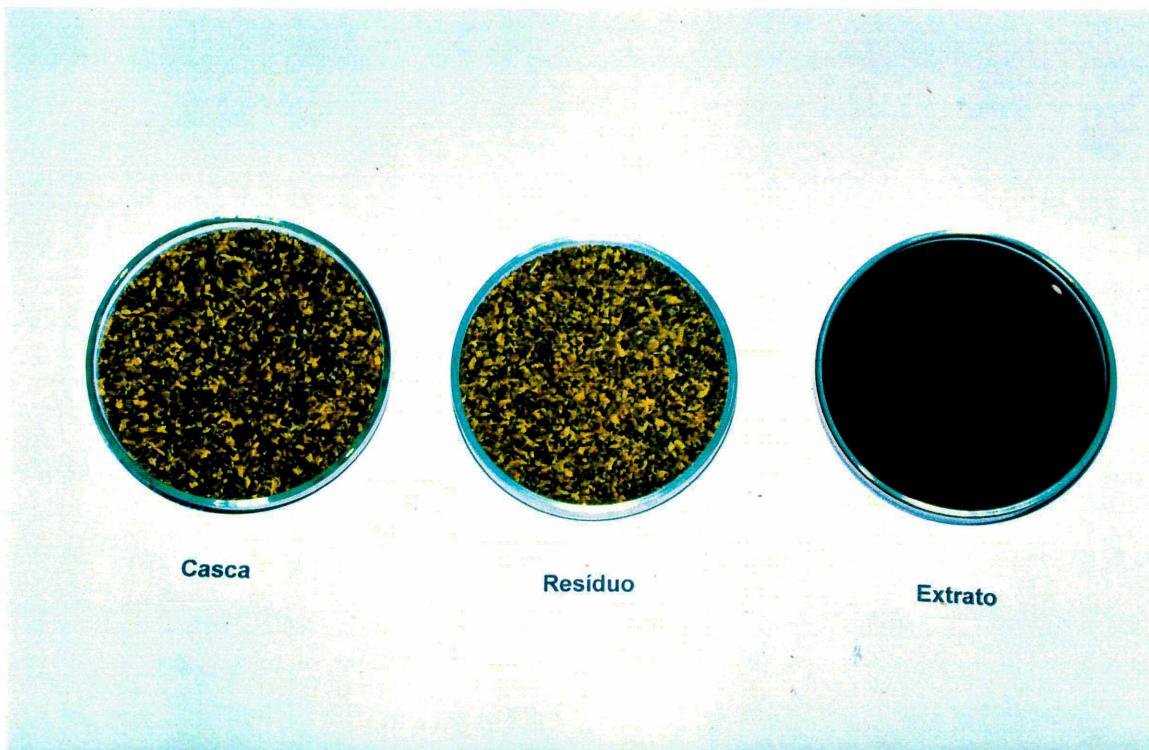


Figura 8: Aspecto final dos meios de cultivo utilizados na seleção de microorganismos.

3.1.2-2. Caracterização dos substratos

Os substratos foram caracterizados segundo Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (PREGNOLATTO & PREGNOLATO, 1985), no Laboratório de Análises Químicas da Universidade Federal do Paraná. Os parâmetros determinados foram:

- A- Umidade
- B- pH
- C- Cinzas
- D- Lipídios

- E- Açúcares, método de Somoghi-Nelson.
- F- Nitrogênio: o nitrogênio protéico foi determinado pelo método de Stutzer (VERVACK, 1973) e o nitrogênio protéico é dosado pelo processo de digestão de Kjeldahl (usada na determinação do nitrogênio total).
- G- Cafeína, com dosagem por espectrofotometria.

Tabela 6 – Composição físico-química da casca de café, do extrato e do resíduo.

	Extrato	Resíduo	Casca
Umidade (%)	-	5,58	5,2
PH	3,8	4,7	5,45
Cinzas (%)	0,66	4,50	6,21
Fibras (%)	-	39,80	38,20
Lipídios (%)	0,02	0,47	1,56
Açúcares redutores (% glicose)	1,08	6,65	8,74
Açúcares não redutores (% sacarose)	0,81	0,46	2,29
Açúcares totais (%)	1,89	7,13	11,15
Nitrogênio total (%)	-	6,5	8,8
Nitrogênio protéico (%)	-	5,2	4,6
Cafeína (%)	0,57	0,96	1,2
Absorção de água (máx)	-	70	70

Determinada no Laboratório de Análises Químicas da UFPR

A diferença percebida entre nitrogênio protéico e total provavelmente deve-se à presença de substâncias não protéicas nitrogenadas, como os sais nitrogenados e cafeína, por exemplo.

3.1.3- Condições de fermentação

Os experimentos foram conduzidos em Erlenmeyers de 250 mL cobertos por oito camadas de gaze, contendo 50 mL do extrato ou 15g MS. Os meios sólidos foram umidecidos até máxima capacidade de absorção do suporte. O pH dos três substratos foi ajustado em seis com adição de uma solução de hidróxido de sódio 0,1N. Para a fermentação submersa empregou-se um shaker com agitação de 180 rpm.

A temperatura de incubação nesta etapa não foi a mesma usada no preparo dos inóculos; isto porque os aromas produzidos durante o crescimento microbiano apresentam volatilidades diferentes nas temperaturas usadas naquela fase do trabalho (3.1.1-3), 23°C e 32°C. Na temperatura de 32°C as substâncias que fazem parte do aroma estariam mais volatilizadas do que em 23°C, dando a impressão de encontrarem-se em

maiores concentrações. Portanto, nesta etapa estipulou-se a temperatura de 28°C para as leveduras e 30°C para os fungos filamentosos.

Buscou-se a seleção de microorganismos que apresentassem produção de aromas frutais. Não procedeu-se a correção dos meios de cultivo com glicose ou outra fonte de carbono nesta etapa.

Para continuidade dos estudos (segunda e terceira etapas) foram escolhidas duas cepas e um meio de cultivo, optando-se então por trabalhar com um fungo filamentoso e uma levedura.

Os experimentos foram conduzidos até que não fosse mais verificada sensorialmente a produção de voláteis. A análise sensorial foi feita diariamente e os resultados indicados na Tabela 10 referem-se àqueles dias de aroma mais intenso percebido pelos provadores. Os resultados das análises de pH, umidade final, açúcares totais e biomassa serviram apenas para avaliar se o crescimento do microorganismo foi satisfatório, enquanto que a análise sensorial determinante.

3.1.4 Análises das amostras fermentadas

Nesta fase os aromas foram avaliados somente sensorialmente, porque não interessava a quantificação exata e tampouco a identificação ou reconhecimento dos compostos. A intenção foi selecionar dois microorganismos para continuidade dos estudos e posterior quantificação e caracterização dos voláteis.

Os odores foram avaliados por um grupo de três pessoas do laboratório, não treinadas, que avaliaram a intensidade do aroma produzido e o descreveram, por vezes genericamente (floral/frutal) ou por associações. Para cada condição (microorganismo/meio) foram preparados três Erlenmeyers, evitando problemas isolados de contaminações ou desenvolvimento inadequado. Primeiramente o aroma foi avaliado individualmente e, em seguida, o grupo discutiu as impressões e chegou a um consenso. O resultado foi expresso através de uma escala em relação à intensidade do aroma observado: nenhum (-); fraco (+), médio (++) e intenso (+++).

Para avaliação do crescimento, no caso das leveduras procedeu-se a contagem de células em câmara de Neubauer, após a suspensão de um grama do fermentado em 20 mL de água destilada estéril, contendo 0,2 mL de Tween 80, em agitação de 200 rpm por 20 min; para os fungos filamentosos fez-se a determinação do nitrogênio protéico pela técnica de Stutzer (3.1.2.2), de modo que os demais compostos que continham nitrogênio não interferissem nos resultados.

3.2- Segunda etapa: produção de voláteis por *Pachysolen tannophilus*, através da FES do resíduo da hidrólise da casca de café em Erlenmeyer

3.2.1 – Preparo do inóculo

O inóculo foi obtido a partir das culturas anteriormente repicadas em tubos de ensaio com meio inclinado, conforme descrito no ítem 3.1.1-2. Em seguida procedeu-se como descrito no ítem 3.1.1-3.

3.2.2 – Esterilização do meio de cultivo

Como o resíduo possui elevada concentração de proteínas sua esterilização juntamente à fonte de carbono promoveria a reação de Maillard e a formação de compostos tóxicos. Por isto, a esterilização da solução de água e glicose e do meio de cultivo foi feita separadamente, a 115°C durante 20 min, condição que evitou a caramelização da glicose que acontece a 120°C.

Como sugestão para trabalhos futuros indica-se a esterilização do meio adicionado pelo menos de parcialmente da água, sendo que a solução de glicose com o restante da água poderia ser esterilizada por simples filtração.

3.2.3- Condições de fermentação

Os experimentos foram feitos em Erlenmeyers de 250 mL, cobertos por oito camadas de gaze, contendo 15g MS de resíduo, sendo que as condições de pH, temperatura e umidade inicial foram específicas para cada estudo.

3.2.4- Otimização das condições para produção de voláteis em Erlenmeyer

3.2.4-1. Primeiro estudo: otimização das condições de cultivo

Neste primeiro estudo avaliou-se o efeito da variação de diferentes parâmetros em relação à composição natural do meio de cultivo, por não existirem referências precisas do crescimento deste microorganismos em meios sólidos. Neste estudo optou-se por um planejamento fatorial 2⁽⁷⁻⁴⁾ a partir de uma matriz tipo Hadanar (CHRISTEN & RAIMBAULT, 1991) que permite o estudo da influência de sete parâmetros somente com oito experimentos. O nível de variação dos sete parâmetros está indicado no Quadro 2.

O cálculo da adição de glicose foi feito em relação à matéria seca do meio de cultivo e está expressa em base seca. Neste experimento o meio foi adicionado de 3,7 g de glicose em 15g MS, equivalendo a uma adição de 20% do açúcar.

Quadro 1 – Nível de variação dos parâmetros em cada experimento do estudo fatorial feito com a levedura *P. tannophilus*

	pH (inicial)	Adição glicose (%)	Taxa de Inoculação. (células/ g MS)	Solução Salina	Temperatura (°C)	Umidade (%)	Previa adição de água
1	4,7	Sem	10^8	Com	30	70	Sem
2	6,0	Sem	10^6	Sem	25	70	Com
3	4,7	20	10^6	Sem	30	60	Com
4	6,0	20	10^6	Com	25	60	Sem
5	4,7	Sem	10^8	Com	25	60	Com
6	6,0	Sem	10^6	Sem	30	60	Sem
7	4,7	20	10^8	Sem	25	70	Sem
8	6,0	20	10^8	Com	30	70	Com

A solução salina tinha a seguinte composição: KH_2PO_4 - 4 g/L; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ – 4g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ – 3 g/L (CHRISTEN et alli, 1997) e substituiu a água nos meios aos quais foi adicionada.

3.2.4-2. Segundo estudo: efeito da adição de óleo de soja e de leucina na produção de voláteis

Baseando-se nos resultados obtidos no primeiro estudo alguns parâmetros puderam ser fixados: pH 4,7 (natural do meio de cultivo), temperatura de crescimento 30°C, sem adição de solução salina, umidade de 70% e taxa de inoculação de 1×10^7 células/g MS.

Nesta etapa fixou-se a quantidade de glicose adicionada, otimizada no terceiro estudo. Baseando-se no resultado positivo obtido pela adição de glicose, neste experimento fixou-se a concentração de glicose em 26%, também calculada em base seca, totalizando 5,14 g de glicose adicionada a cada 15 g de resíduo.

Adicionou-se aos meios, separadamente: solução de leucina 10mMol, substituindo a água na umidificação dos meios (CHRISTEN et alli, 1997; BRAMORSKI, 1997) e óleo de soja 10% em base seca, ou seja, 10g de óleo de soja a cada 100g de resíduo totalizando 1,5 g de óleo de soja em cada Erlenmeyer (BRAMORSKI, 1997). A suplementação dos meios com estes compostos teve como finalidade aumentar a

produção de voláteis totais e a de ésteres, como por exemplo isoamil acetato ou o etil butirato envolvidos na biosíntese da leucina, conforme indicado na Figura 3.

Buscou-se também avaliar a influência da esterilização do meio de maneira conjunta, ou seja, glicose, água e o resíduo juntos, apesar da possibilidade de acontecer a reação de Maillard já mencionada. Este meio está mencionado nos gráficos como meio 26.E.

Quadro 2: condições do segundo experimento feito com *P. tannophilus* e códigos adotados

Compostos adicionados ao meio com 26% de glicose	Código
Nenhum (controle)	26
Óleo	26.O
Leucina	26.L
Esterilizado integralmente	26.E

3.2.4- 3. Terceiro estudo: otimização da adição de glicose

Neste experimento buscou-se uma otimização da adição de glicose ao meio, sendo que todos os demais fatores foram fixados. Além da glicose foi avaliado o efeito da adição de xilose (26%, em base seca), uma vez que esta levedura é reconhecida como produtora de etanol a partir deste açúcar em fermentação submersa.

Foram testadas as seguintes adições de glicose: 14%, 26%, 35%, 44% e 49%, sendo que estes valores também foram usados como códigos na apresentação dos resultados. Fixou-se também que o meio não deveria ser adicionado de óleo de soja ou de leucina e que a umidificação do suporte seria de 70%.

3.3- Terceira etapa: produção de voláteis por *Ceratocystis fimbriata* através da FES do resíduo em Erlenmeyer

3.3.1 – Preparo do inóculo

O inóculo foi obtido a partir das culturas anteriormente repicadas em tubos de ensaio com meio inclinado, conforme descrito no ítem 3.1.1-2. Em seguida procedeu-se como descrito no ítem 3.1.1-3.

3.3.2- Otimização das condições de cultivo

Os experimentos foram realizados em Erlenmeyers de 250 mL, cobertos por oito camadas de gaze, contendo 15g MS de resíduo e a esterilização do meio foi feita conforme indicado no ítem 3.2.2.

Alguns fatores foram fixados, levando em consideração dados encontrados na literatura a respeito do crescimento e da produção de aromas com este microorganismo, em diferentes resíduos sólidos (LANZA & PALMER, 1977; SENEMAUD, 1988; CHRISTEN & RAIMBAULT, 1991; CHRISTEN et alli 1994 e 1997; BRAMOSRKI et alli, 1998): pH inicial 6, taxa de inoculação 10^7 cel/gMS, umidificação até a capacidade máxima do suporte (70%) e temperatura de crescimento de 30°C.

Determinados experimentos foram umidificados com 65% de solução salina (a mesma descrita no ítem 3.2.4.1) e 5% de uma solução de oligoelementos ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 555 mg/L; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 439,8 mg/L; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 203 mg/L) (CHRISTEN & RAIMBAULT, 1991).

Neste estudo buscou-se avaliar o efeito da adição de glicose na produção de aromas, experimentando-se adições de 20%, 35% e 46%.

Com o objetivo de intensificar os aromas produzidos ou ainda promover a biosíntese de novos compostos, experimentou-se a adição de 10% de óleo de soja (em peso) (BRAMORSKI, 1997) e de uma solução 10mMol de leucina que substituiu a água nos meios em que foi adicionada (BRAMORSKI, 1997; CHRISTEN et alli, 1997). Neste estudo, que ocorreu paralelamente àquele que buscava as melhores relações C/N, estipulou-se a adição de 35% de glicose como controle.

As condições dos experimentos bem como os códigos adotados estão especificados no Quadro 3:

Quadro 3: Condições da otimização da produção de compostos voláteis por *C. fimbriata* em resíduo.

Código	Condições dos experimentos
20	Adicionado de 20% de glicose
35	Adicionado de 35% de glicose
46	Adicionado de 46% de glicose
35 L	Adicionado de 35% de glicose e umidecido com solução 10mMol de leucina
35 O	Adicionado de 35% de glicose e 10% de óleo de soja
35 SS	Adicionado de 35% de glicose e umidecido com solução salina.

Como intensa desidratação dos meios de cultivo foi percebida no final do processo, provavelmente causada pelo tempo de fermentação prolongado a 30°C (20 dias), decidiu-se por continuar os estudos de otimização em colunas de fermentação.

3.4- Análises dos meios fermentados

Durante a fermentação foram efetuadas análises de acompanhamento da evolução dos compostos voláteis produzidos pelos microorganismos. Este acompanhamento foi feito através de análise sensorial e cromatografia em fase gasosa (CPG).

A análise sensorial dos meios de cultivo foi feita em paralelo à análise cromatográfica, com Erlenmeyers distintos, por um grupo constante de três pessoas não treinadas, conforme descrito no ítem 3.1.4.

A análise cromatográfica, por ser mais complexa e envolver procedimentos próprios, está descrita a seguir.

3.4.1- Análises de aromas:

3.4.1.1- Isolamento dos compostos aromáticos

A dificuldade na análise de aromas reside no fato dos mesmos, salvo casos particulares, serem constituídos por diversos compostos de classes químicas distintas, com diferentes volatilidades, presentes em quantidades pequenas (ppm). Freqüentemente, estas substâncias estão retidas numa matriz (alimento) complexa que dificulta sua extração; além disto, nem sempre o componente odorífero mais abundante é o mais interessante, como no caso do etanol que é o composto encontrado em maior concentração em determinadas fermentações.

Diferenças existentes entre as propriedades físico-químicas das moléculas voláteis de interesse (pressão de vapor e polaridade, por exemplo) dificulta a definição da uma metodologia ideal de extração do substrato que as retém.

Cada metodologia fornece uma imagem diferente da composição do aroma do produto e, na prática, é difícil obter um método que possua a mesma eficiência para moléculas muito voláteis e pouco polares ou para aquelas pouco voláteis e muito polares.

Os métodos experimentais para o isolamento de metabólitos voláteis incluem: extração direta com auxílio de solventes (como pentano, hexano ou diclorometano), a destilação com vapor ou a vácuo seguida da extração da fase aquosa por solventes,

análise da fase gasosa (*headspace* - espaço de cabeça) com ou não adsorção em polímeros.

A utilização de solventes para proceder a extração dos compostos de sua matriz fermentativa é delicada, devido a problemas como contaminação da amostra com impurezas e especificidade de determinado solvente. Dificilmente um só solvente poderia extrair de maneira satisfatória uma mistura de compostos; além disto, esta metodologia limita-se a meios que não possuem compostos lipídicos ou substâncias com características semelhantes a estas (RICHARD & MULTON, 1992).

A tecnologia mais recente no isolamento de aromas envolve a utilização de fluidos no estado supercrítico. Fluidos supercríticos incluem dióxido de carbono mantido sob elevadas pressões, ficando com seu estado situado entre o de um gás e de um líquido. A habilidade de ajustar continuamente a solubilidade do componente a ser extraído pela modificação da pressão e/ou temperatura fez com que esta tecnologia fosse rapidamente adotada pelas indústrias de aromas. A escolha do dióxido de carbono supercrítico como "solvente" na maioria dos processos aconteceu devido ao composto ser inerte, não inflamável, não explosivo, por não deixar resíduos no produto final, por estar disponível em grandes quantidades, ter elevado grau de pureza e por ser barato. Adicionalmente, a temperatura crítica deste fluido é de 31°C a 74 bar, o que possibilita que compostos termolábeis, como aqueles encontrados no jasmim, possam ser extraídos sem decomposição (ARMSTRONG et alii, 1989).

Para a caracterização dos componentes de um aroma a metodologia mais simples e menos sujeita a críticas, pelo menos em relação a seu princípio, é a análise do **headspace** (espaço de cabeça), que consiste em analisar a fase gasosa de uma amostra que está em equilíbrio com a matriz (sólida ou líquida) colocada num recipiente fechado.

O procedimento desta análise é simples: a amostra é colocada num recipiente que é fechado e aquecido a determinada temperatura, deixando-se posteriormente em descanso para que seja estabelecido o equilíbrio entre os voláteis unidos à matriz e aqueles que encontram-se na fase de vapor. Com uma seringa apropriada pega-se um volume determinado do espaço de cabeça injetando-o em seguida num cromatógrafo de fase gasosa, equipado com coluna de separação adequada.

Outra consideração importante em relação a esta técnica é a atenção que deve-se ter no momento da análise dos resultados. A presença dos componentes no **headspace** do cultivo depende: da concentração dos mesmos, de suas pressões de vapor e a da

difusão do composto no suporte sólido; isto significa que aqueles elementos que têm ponto de ebulição (pressão de vapor) mais baixos (por exemplo o acetaldeído ou o mesmo o etanol) tendem a apresentar-se em quantidades superiores aos demais compostos menos voláteis (como o isoamil acetato), fato que nem sempre significa que estes compostos estejam realmente em maior concentração. Contudo, pode-se assumir que os compostos medidos servem de referência na avaliação dos metabólitos produzidos.

É possível aumentar a sensibilidade desta análise arrastando os aromas com o auxílio de um gás inerte e concentrando-os num adsorvente sólido, constituído de um polímero granulado altamente poroso (Tenax GC, Tenax TA, Chromosorb 105, entre outros) ou ainda passando os voláteis através de um sistema resfriado, de maneira a recuperá-los sob a forma líquida ou sólida, seguida de aquecimento e injeção na coluna do cromatógrafo.

3.4.1.2 – Identificação e quantificação dos compostos: Cromatografia Gasosa

A intenção deste documento não é detalhar e explicar esta técnica em profundidade, mas sim comentar alguns parâmetros envolvidos no desenvolvimento do trabalho. A cromatografia em fase gasosa (CFG ou CPG) é uma metodologia bastante utilizada, através da qual misturas complexas de substâncias voláteis podem ser separadas e identificadas em tempo relativamente curto, de maneira precisa e eficiente. Com a utilização de colunas capilares é possível obter uma reprodução bastante fiel do perfil sensorial de determinados produtos e certos compostos podem ser identificados em nível de nanogramas. Estas substâncias detectadas em concentrações ínfimas muitas vezes são considerados fundamentais no perfil aromático e outras técnicas não são capazes de identificá-los e quantificá-los.

O princípio desta metodologia consiste na separação dos componentes de uma amostra injetada no sistema e arrastada por um gás inerte. A maior ou menor afinidade de cada elemento da amostra com fase estacionária (definida pela polaridade e ponto de ebulição) determina o tempo que cada composto ficará retido na coluna. Isto resulta num determinado tempo de retenção para cada composto da amostra, que é traduzido em sinal pelo detetor localizado na saída da coluna cromatográfica. Os valores passam por um integrador que fornece os diferentes picos e áreas dos mesmos no cromatograma.

O reconhecimento da estrutura química pode ser feito de duas formas: através da espectrofotometria de massa acoplada ao cromatógrafo de gás ou simplesmente através da injeção de determinados padrões aromáticos no cromatógrafo nas mesmas condições de operação da amostra que se deseja analisar. É feita a comparação dos tempos de

retenção destes padrões com aqueles reportados nos cromatogramas. Neste caso é importante a repetibilidade dos resultados das áreas dos picos dos padrões e também dos tempos de retenção, destes e da amostra, afim de garantir a confiabilidade da metodologia.

Neste trabalho a identificação dos compostos foi feita através da comparação do tempo de retenção dos compostos presentes no **headspace** dos cultivos com o tempo de retenção de diferentes padrões puros injetados no cromatógrafo. Cada composto foi injetado em duplicata; os tempos de retenção apresentam variabilidade máxima de 1% e a área dos picos variação máxima de 5%. No total foram verificados os tempos de retenção de 23 padrões, através da injeção de 0,5mL do **headspace**.

Foi utilizado um cromatógrafo de fase gasosa, da marca HP modelo 6890, equipado com uma coluna do tipo HP5 (coluna apolar) de 30 m, com detector do tipo ionização de chama. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 250°C. Foi otimizada uma rampa de temperatura do forno de maneira que se obtivesse a separação total dos compostos, num tempo mínimo de análise. A condição de trabalho adotada foi: temperatura inicial do forno mantida em 40°C durante 6,5 min, seguida do aumento de 25°C por minuto até que fosse atingida a temperatura final de 150°C, mantida por 2 minutos.

São dois os principais fatores que promovem a separação dos compostos por cromatografia de gases:

- a afinidade química do elemento com a fase estacionária da coluna. Em colunas apolares, compostos apolares tendem a permanecer mais tempo em contato com a fase sólida da coluna.
- o ponto de ebulição dos compostos, que varia segundo o peso molecular e a presença de grupos funcionais, entre outros.

Tabela 7- Tempos de retenção de padrões puros que não estavam presentes no **headspace dos cultivos microbianos**

Compostos	Tempo de retenção(min)
2 metil butanol	6,755
2- hexanona	8,000
2- hexanol	8,185
Butil acetato	8,539
2- octanol	11,002
Feniletilisovalerato	15,250

Tabela 8 – Tempo de retenção dos padrões puros presentes no cromatograma do **headspace** dos cultivos de *C. fimbriata* e *P. tannophilus*.

Composto	Tempo de Retenção(min)	Fórmula do Composto	Ponto de Ebulação(°C)
Acetaldeido	2,851	C ₂ H ₄ O	20,8
Etanol	2,994	C ₂ H ₆ O	78
Álcool Isopropílico	3,233	C ₃ H ₈ O	82,4
B	3,305	?	?
Etil Acetato	4,000	C ₄ H ₈ O ₂	77
Isobutanol	4,191	C ₄ H ₁₀ O	108
Etil propionato	5,956	C ₅ H ₁₀ O ₂	99
Propil acetato	6,009	C ₅ H ₁₀ O ₂	101
Álcool isoamílico	6,731	C ₅ H ₁₂ O	131
Etil isobutirato	7,374	C ₆ H ₁₂ O ₂	111
Isobutil acetato	7,725	C ₆ H ₁₂ O ₂	117
Etil butirato	8,294	C ₆ H ₁₂ O ₂	121
Isoamil acetato	9,575	C ₇ H ₁₄ O ₂	142
2- heptanona	9,766	C ₇ H ₁₄ O	157
R	10,710	?	?
2- octanona	10,919	C ₈ H ₁₆ O	173
Etil 3 hexenoato	11,073		

Nas Tabelas 7 e 8 é possível a visualização da afinidade dos compostos com a coluna. Como a coluna é apolar, conforme aumentou a apolaridade das estruturas dos compostos aumentou também seu tempo de retenção, sendo que quando dois ou mais elementos apresentaram a mesma fórmula química o que definiu o diferente tempo de retenção foram os pontos de ebulação.

A análise quantitativa dos voláteis foi feita através da injeção de certa quantidade de um composto padrão (etanol ou etil acetato), estabelecendo uma curva de calibração.

Foram estabelecidas quatro curvas de calibração, uma para altas e outra para baixas concentrações de etanol e de etil acetato. Estes dois compostos servem como referência na apresentação dos resultados. Voláteis totais e álcoois são expressos em equivalente de etanol $\mu\text{mol}/\text{L}$ de **headspace g MS**; ésteres e cetonas são expressos em equivalente de etil acetato $\mu\text{mol}/\text{L}$ de **headspace g MS**.

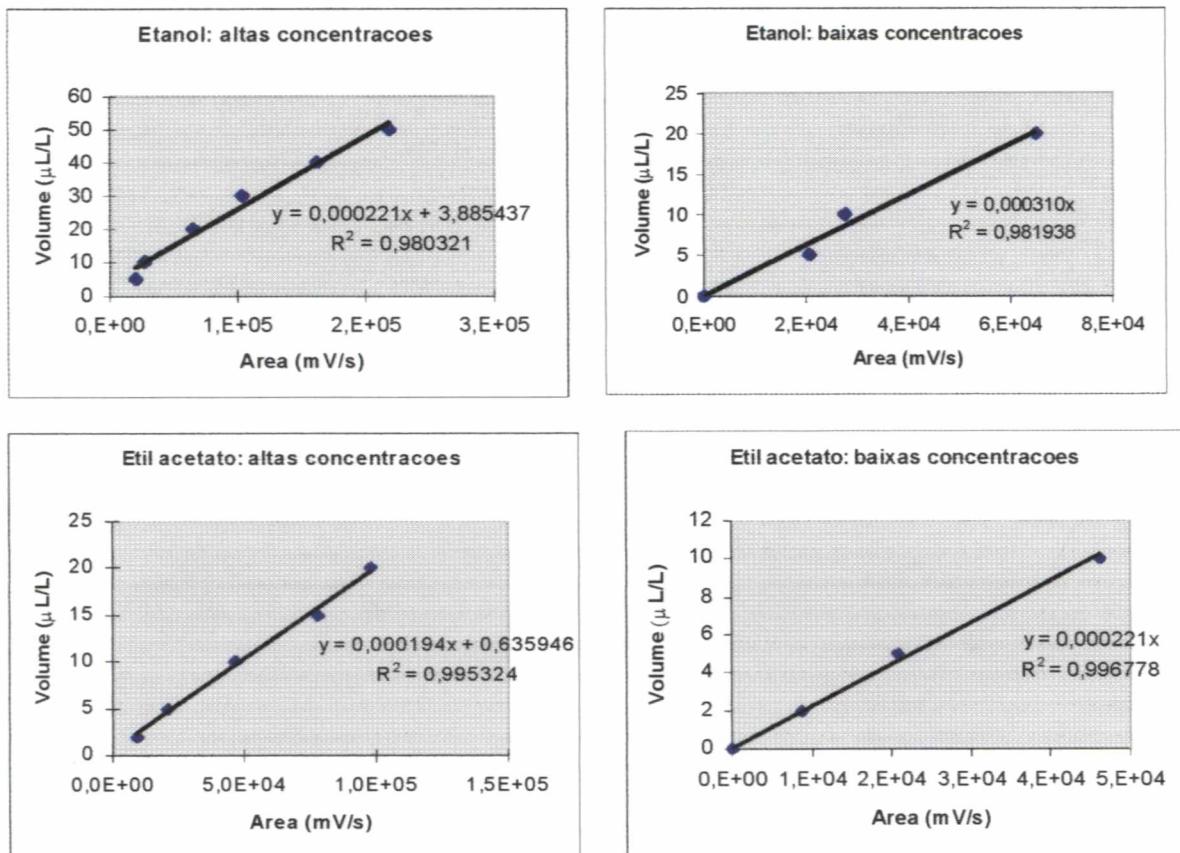


FIGURA 9- Curvas de calibração para etanol e etil acetato.

O valor da área que definia se uma concentração deveria ser considerada alta ou baixa foi calculado igualando as fórmulas e achando o valor de x: 23.500 mV/s para etil acetato e 43.600 mV/s para etanol.

Também foi analisado o **headspace** dos substratos, com o intuito de verificar se haviam substâncias voláteis que pudessem interferir nos cromatogramas dos cultivos, o que não ocorreu.

3.4.1.3- Cálculo da produção de voláteis

Para análise mais precisa dos resultados os valores de voláteis totais e individuais, produzidos no terceiro estudo da levedura e aquele com o fungo filamentoso, foram integrados com o tempo segundo o modelo de GOMPERTZ (MERAZ et alli, 1992; CHRISTEN et alli, 1997).

Este modelo sigmoidal descreve a evolução da produção P , referindo-se a Voláteis Totais ou Voláteis Individuais, com relação ao tempo de fermentação, conforme modelo indicado a seguir:

$$P = P_{\max} \exp [-b \exp (-kt)]$$

Neste modelo P_{\max} é o valor máximo integrado da produção expresso em $\mu\text{mol/Lg MS}$ em equivalente de etanol ou de etil acetato, (quando $t \rightarrow \infty$). K (h^{-1}) representa a taxa de produção de voláteis constante e b pode ser usado para obter o tempo de máxima produção de voláteis através da relação:

$$t_{\max} = (\ln b)/k.$$

A integração dos valores e a regressão não-linear do modelo de GOMPERTZ para obter os valores de P_{\max} , b e k foram feitos com o programa KaleidaGraph (Abelbeck Software, U.S.A.).

3.4.2- Coeficientes de impacto

A análise dos coeficientes de impacto foi efetuada no primeiro estudo de otimização dos meios de cultivo da levedura (CHRISTEN & RAIMABULT, 1991). Para cada experimento foram calculados os coeficientes B_x para produção de etanol e B_m para produção de etil acetato, com a finalidade de determinar o efeito de cada constituinte na produção destes dois metabólitos voláteis. Se X é o volume total de etanol e M é o volume total de etil acetato produzidos durante toda a fermentação, os coeficientes B_x e B_m podem ser expressos por:

$$B_{xj} = \frac{1}{4} [\sum_{i=1}^8 A_j X_i] \quad B_{mj} = \frac{1}{4} [\sum_{i=1}^8 A_j M_i]$$

Onde A_j é o nível do constituinte j (+ ou -), X_i é o volume total de etanol e M_i o volume total de etil acetato, ambos em $\mu\text{mol/L gMS}$.

A matriz usada no cálculos dos coeficientes está apresentada no Quadro 5.

Quadro 4: Matriz usada nos cálculos dos coeficientes de impacto do plano fatorial adotado no estudo de otimização das condições de cultivo de *P. tannophilus* para a produção de voláteis totais e ésteres.

PH	C/N (glicose)	Taxa Inoculo	Sol. Salina	Temperatura	Umidade	Previa adicao de agua
1	-	+	+	+	+	-
2	+	-	-	-	+	+
3	-	+	-	+	-	+
4	+	+	-	-	-	-
5	-	-	+	-	-	+
6	+	-	-	+	-	-
7	-	+	+	-	+	-
8	+	+	+	+	+	+

4- RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1- Primeira etapa: seleção de microorganismos/ meio de cultivo

As condições iniciais deste estudo estão descritas no item 3.1.3. As Tabelas 9 e 10 mostram o resultado dos diferentes parâmetros usados para avaliar o crescimento dos microorganismos nos meios de cultivo: pH final, açúcar total residual (%), umidade final (%) e análise sensorial, que parecem indicar o crescimento das cepas em resíduos de da agroindústria do café café, nas suas mais variadas formas (extrato, casca e resíduo).

Tabela 9: Valores de pH final, açúcar total residual (%) e umidade final (%) observados na etapa de seleção de microorganismos/substrato.

	pH			Açúcar Total (%)			Residual		Final (%)	
	Extrato	Resíduo	Casca	Extrato	Resíduo	Casca	Resíduo	Casca	Resíduo	Casca
Inicial	6,00	6,00	6,00	1,89	7,13	11,15	70	70		
<i>C. fimbriata</i>	6,64	5,15	6,12	0,38	4,03	9,71	72,6	65,6		
<i>N. toroi</i>	7,91	5,50	4,67	0,24	3,45	4,01	69,8	70,2		
<i>T. viride</i>	7,80	5,90	5,50	0,37	2,32	4,96	73,7	68,6		
<i>T. harzianum</i>	6,84	5,19	5,22	0,44	3,67	4,63	68,7	66,2		
<i>R. oryzae 395</i>	5,00	5,05	4,60	0,49	3,98	4,44	73,6	69,4		
<i>R. oryzae28627</i>	3,94	4,25	4,34	0,55	4,24	5,30	67,7	66,4		
<i>K.marxianus</i>	5,10	5,00	4,49	0,41	2,68	5,30	65,9	66,9		
<i>K. lactis</i>	4,88	4,83	4,73	0,31	3,41	5,74	65,6	67,5		
<i>Pichia stipitis</i>	6,19	4,93	4,71	0,69	4,59	7,12	66,8	66,7		
<i>P. tannophilus</i>	5,29	5,31	5,89	0,75	4,38	8,13	67,7	67,3		

O pH inicial dos substratos foi fixado em 6 e as variações deste com o pH final podem ser consideradas normais e indicam que houve desenvolvimento microbiano. O aumento do pH pode ter ocorrido devido a degradação protéica feita pelos fungos filamentosos com produção de amônia. Já a queda do pH normalmente ocorre pela liberação de ácidos orgânicos durante a fermentação.

A diminuição do valor inicial dos açúcares totais parece indicar que a maioria dos microorganismos não encontrou problemas no crescimento. As exceções são *C. fimbriata*, *P. tannophilus* e *P. stipitis* na casca, fato também percebido na análise sensorial (Tabela 10).

A umidade final dos meios de cultivo não demonstrou suficiente variabilidade a ponto de limitar o crescimento fúngico. O pequeno aumento observado em alguns casos pode ser decorrente do próprio metabolismo microbiano e a diminuição também pode ter ocorrido pelo mesmo motivo ou pela temperatura mantida nas câmaras de crescimento.

Tabela 10: Resultado da análise sensorial feita na primeira etapa (screening).

	Sensorial Máxima (h)	Meios de cultivo	Intensidade do aroma	Descrição do aroma
<i>Ceratocystis Fimbriata</i>	96	Extrato	++	Frutal, alcoólico, cerveja
		Resíduo	+++	Frutal, ácido, alcoólico
		Casca	+	Indefinido
<i>Neurospora toroi</i>	96	Extrato	-	-
		Resíduo	++	Mofo
		Casca	+	Doce/ácido
<i>Trichoderma viride</i>	240	Extrato	+	Côco
		Resíduo	++	Côco
		Casca	+	Côco
<i>Rhizopus oryzae 395</i>	96	Extrato	++	Alcoólico/cerveja
		Resíduo	++	Alcoólico/ácido
		Casca	+++	Alcoólico/ácido
<i>Rhizopus oryzae 28627</i>	96	Extrato	-	-
		Resíduo	++	Banana/alcoólico
		Casca	++	Banana podre
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	72	Extrato	+	Cerveja
		Resíduo	-	-
		Casca	++	Frutal/ abacaxi
<i>Kluyveromyces lactis</i>	72	Extrato	++	Cerveja
		Resíduo	++	Alcoólico/doce
		Casca	++	Alcoólico/madeira
<i>Pichia stipitis</i>	72	Extrato	+	Vinho
		Resíduo	++	Frutal/abacaxi
		Casca	+	Frutal/banana podre
<i>Pachysolen tannophilus</i>	72	Extrato	+	Cerveja
		Resíduo	+++	Frutal/alcoólico
		Casca	+	Frutal

Intensidade do aroma observado: nenhum (-), fraco (+), médio (++) e intenso (+++)

O fato da cultura não produzir aroma no meio não significa necessariamente que não houve crescimento, fato ocorrido com *Trichoderma harzianum*.

Entre os dois substratos sólidos a diferença na quantidade de determinados compostos, como cafeína e sais, dos meios sólidos parece ter influenciado o desenvolvimento de certos microorganismos, visto que houve maior produção de aromas

no resíduo do que na casca (*C. fimbriata*, *P. tannophilus* e *T. viride*). Outros microorganismos parecem que não foram afetados, como no caso do *Rhizopus oryzae* 395, uma cepa que vem sendo estudada no Laboratório de Processos Biotecnológicos (LPB) da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

É interessante observar que, de maneira geral, as leveduras quando crescidas no meio líquido (extrato) produziram aromas que lembraram cerveja e vinho. Esta percepção foi completamente diferente nos meios de cultivos sólidos, nos quais aromas frutais passaram a ser descritos (Tabela 10). Duas explicações podem ser exploradas:

- a primeira, abordada por GERVAIS (1990), quando estudou a influência da atividade de água na produção de aromas extracelulares avaliando o desenvolvimento *Trichoderma viride*. O autor levanta a possibilidade de que o aumento na produção de voláteis verificada com a diminuição na atividade de água do meio é função da pressão osmótica: quando a pressão externa aumenta as células têm que equilibrar seu interior para prevenir o estresse causado pela perda passiva de água, o que gera uma variação da permeabilidade celular, até um valor que iniba os sistemas enzimáticos.
- a segunda , existe a possibilidade da cinética em meio líquido ter seguido a rota fermentativa, ocasionada pela pouca difusão do oxigênio nos meios de cultivos líquidos.

Após a avaliação destes resultados decidiu-se pela continuidade do estudo com o fungo filamentoso *Ceratocystis fimbriata* e com a levedura *Pachysolen tannophilus*. Diferentes motivos levaram à escolha de ambos:

Primeiramente, a necessidade da uniformização das técnicas analíticas, como por exemplo o uso de uma só coluna na caracterização/quantificação dos voláteis. As duas cepas produzem aromas parecidos (frutal), possibilitando o uso da mesma coluna cromatográfica e de idêntica programação de temperatura do forno, evitando o desgaste do aparelho causado pela constante mudança de condições das operação.

Em seguida, optou-se pelo estudo com *Ceratocystis fimbriata* pelo fato de ser um microorganismo estudado como produtor de aromas por outros autores (citados em 2.7.1). Isto possibilita estabelecer uma comparação da produção de voláteis conseguida nestes meios de cultivo (bagaço de maçã, bagaço de mandioca, meio sintético, fibra de trigo e bagaço de cana) com aquela obtida em casca de café.

Finalmente, escolheu-se trabalhar com a levedura *Pachysolen tannophilus* por não terem sido encontradas referências mencionando seu crescimento em meio sólido e por não haverem trabalhos que a indiquem como produtora de compostos voláteis com

características frutais. Provavelmente, os estudos anteriores com *P. tannophilus*, basicamente produção de etanol a partir de xilose, não mencionem o aroma frutal percebido durante esta pesquisa nos meios de cultivo sólidos justamente por serem procedidos em fermentação submersa que, conforme observado na Tabela 10, não parece direcionar o microorganismo à produção dos mesmos compostos.

Seleção do meio de cultivo

Com o intuito de melhor avaliar a produção de aromas frutais destes dois microorganismos nos dois resíduos sólidos procedeu-se uma fermentação nas mesmas condições do screening e foi feita a análise cromatográfica do headspace dos cultivos.

Confirmando os dados das tabelas 9 e 10, os dois microorganismos não se desenvolveram adequadamente na casca, sendo que o único volátil detectado foi acetaldeído, numa cinética de 43h para *Ceratocystis fimbriata* e 63h para *Pachysolen tannophilus*, em concentrações de 0,19 µmol/L gMS.

No resíduo houve maior produção, apesar da necessidade de otimização das condições de cultivo.

Com o término da fermentação foram avaliados: pH, umidade e açúcares totais residuais (%), expressos na Tabela 11.

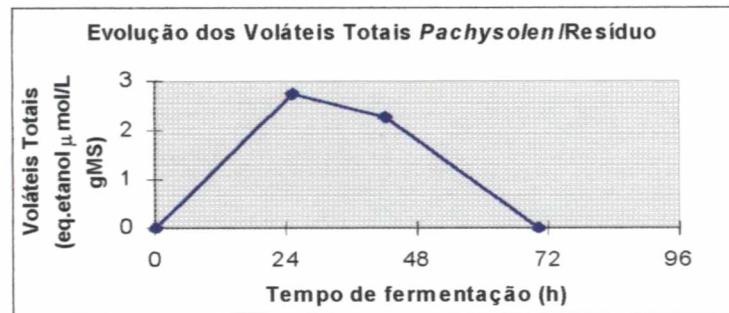
Tabela 11: resultados da seleção de um meio de cultivo sólido.

Microorganismo	Meio de Cultivo	Umidade final (%)	pH final	Açúcar total residual (%)
<i>Pachysolen</i>	Resíduo	67,54	5	1,27
	Casca	67,27	5,5	9,32
<i>Ceratocystis</i>	Resíduo	67,44	4,8	2,38
	Casca	68,51	5,8	8,54

As cinéticas mostradas nas figuras 10 e 11 foram curtas pelo fato do meio de cultivo não ter sido corrigido e a quantidade de açúcares totais disponível ao crescimento microorgânico ser muito baixa, desequilibrando o meio. Com a otimização deste parâmetro novos comportamentos foram observados.

Como esperado, a levedura produziu uma quantidade superior de etanol. O aroma frutal percebido em ambos meios de cultivo deve-se à presença de etil acetato.

10a



10b

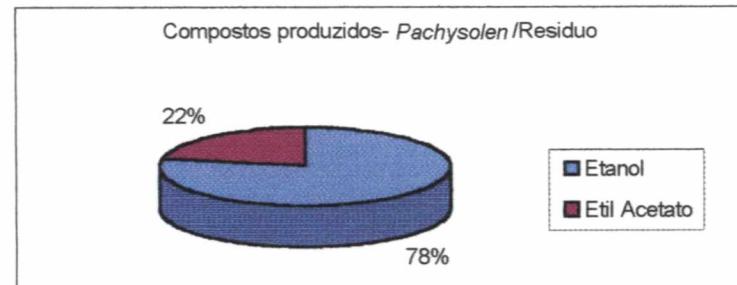
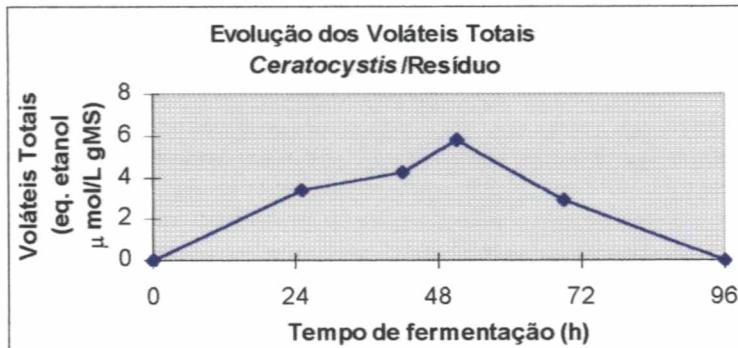


Figura10: Evolução dos voláteis totais (10a) e porcentagem dos mesmos (10b) no **headspace** dos cultivos de *P. tannophilus*, durante a FES do resíduo da casca de café.

11a



11b

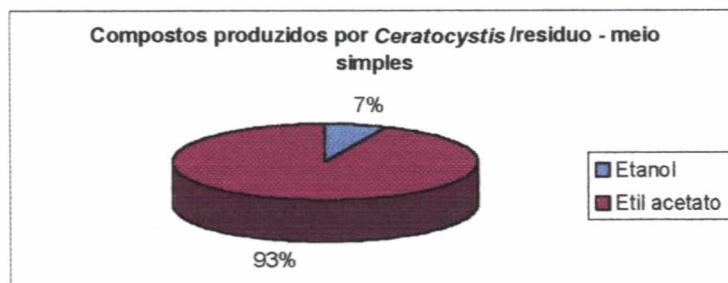


Figura11: Evolução dos voláteis totais (12a) e porcentagem dos mesmos (12b) no **headspace** dos cultivos de *C. fimbriata*, durante a FES do resíduo da casca de café.

4.2- *Pachysolen tannophilus* : otimização das condições de cultivo para produção de voláteis em Erlenmeyer

4.2.1- Primeiro estudo: otimização das condições de cultivo

Para otimização das condições utilizou-se uma matriz Hadanar, seguindo o plano factorial descrito no 3.2.4-1.

Os resultados das análises dos meios após a fermentação estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12: Resultados das análises pós-fermentativas do primeiro estudo factorial feito com *Pachysolen tannophilus*

Código	C/N	pH inicial	pH Final	Perda de Peso (%)	Açúcar total Residual (%)	n.células/ g MS (inicial)	n.células/ g MS (final)
1	3	4,7	3,81	4,02	4,53	10^8	$5,86 \times 10^8$
2	3	6	5,68	1,56	5,47	10^6	$6,12 \times 10^7$
3	15	4,7	4,96	4,62	4,25	10^6	$1,24 \times 10^8$
4	15	6	4,27	3,16	11,04	10^6	$8,18 \times 10^7$
5	3	4,7	4,52	2,81	6,13	10^8	$8,12 \times 10^8$
6	3	6	4,62	2,06	6,7	10^6	$5,8 \times 10^8$
7	15	4,7	5,5	4,27	5,5,1	10^8	$1,89 \times 10^9$
8	15	6	5,7	4,87	4,52	10^8	$1,2 \times 10^9$

Os resultados das análises dos meios 3, 7 e 8 estão em destaque por terem apresentado maior produção de voláteis em relação aos demais, com fermentações que duraram 216h, 295h e 170h respectivamente (Figura 12).

É possível notar pela contagem de células que estes mesmos meios apresentaram maior crescimento..

Em relação à variação do pH percebe-se que quase todos os meios tenderam a valores próximos de 5,5 , com exceção do meio 3. Como este meio apresentou a maior produção de etil acetato (Figura 14) e tendo em vista que o ácido acético está envolvido na biosíntese deste éster, é aceitável que o mesmo apresente-se mais acidificado.

A perda de peso ocorrida foi mais intensa nos meios com tempo de fermentação mais prolongado, provavelmente devido à temperatura nas câmaras de fermentação.

Na Figura 12 percebe-se uma melhora significativa no tempo de fermentação com o aumento na quantidade de glicose adicionada ao meio de cultivo. Na fermentação do estudo anterior, indicado na Figura 10, o tempo de fermentação foi de 72 h e neste estudo os meios 1, 2, 5 e 6 (meios sem adição de glicose) tiveram cinéticas de no máximo 90h.

O gráfico apresentado na Figura 12 mostra a evolução da produção dos voláteis nos diferentes experimentos.

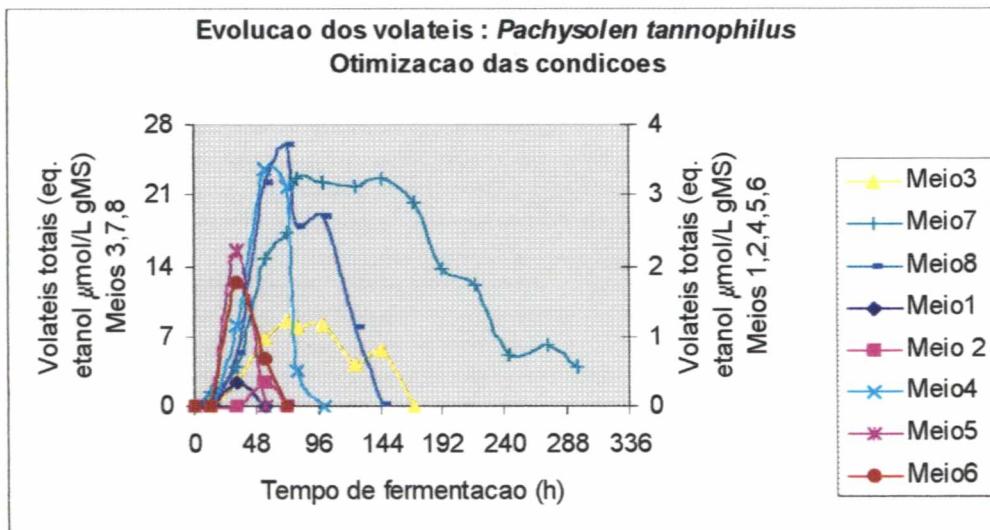
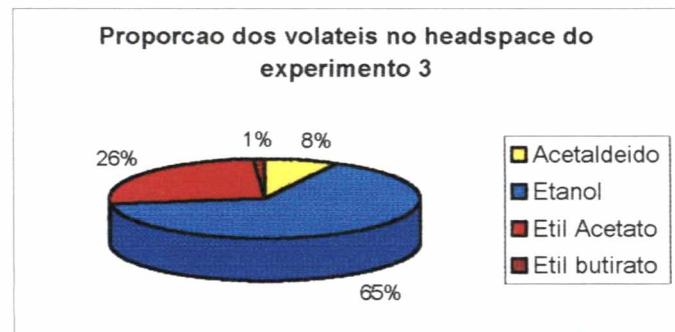


FIGURA 12– Gráfico da evolução dos voláteis totais nos experimentos do estudo factorial feito com a levedura *Pachysolen tannophilus*.

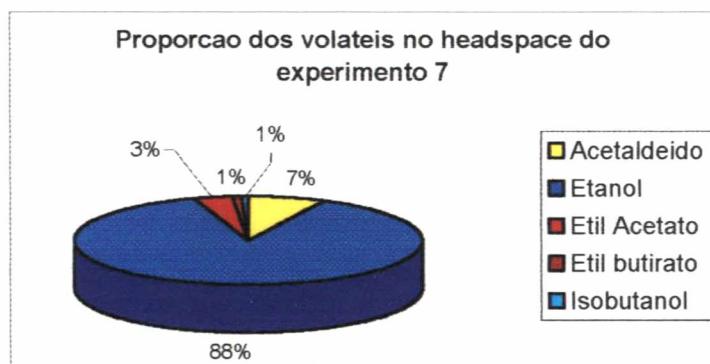
Pela Figura 12 é possível verificar quais meios apresentaram melhor evolução na produção de voláteis: 3,7 e 8. Pelo resultado da análise sensorial (Tabela 13) percebe-se que os aromas nos meios de cultivo 7 e 8 são mais intensos, contudo, mais alcoólicos. Os álcoois apresentam papel importante na composição dos aromas e também atuam como precursores de outros compostos, mas para que predomine o aroma frutal é necessário que os microorganismos produzam maior quantidade de ésteres.

Os gráficos apresentados na Figura 13 mostram a porcentagem dos voláteis encontrados no **headspace** dos experimentos 3, 7 e 8 e permitem uma melhor visualização dos voláteis produzidos, sobretudo álcoois e ésteres.

13a



13b



13c



Figura 13: Gráficos que expressam a proporção dos voláteis encontrados no **headspace** dos cultivos do primeiro estudo feito com *P. tannophilus*, meios: 3 (13a), 7 (13b) e 8 (13c).

No estudo cromatográfico inicialmente feito com o resíduo sem adição de glicose (Figura 10) os voláteis se limitavam a etanol e etil acetato. Com a adição de glicose além destes dois compostos foram identificados: acetaldeído e isoamil acetato.

O experimento 3 apresentou maior proporção de ésteres. Os meios 7 e 8 apresentaram boa produção de voláteis, mas com maior proporção de etanol. Apesar

deste álcool ser importante na composição do aroma, não pode ser considerado como substância com caráter de impacto em aromas frutais. Por isso, a análise dos fatores de impacto foram direcionados à produção de ésteres (etil acetato e isoamil acetato). Do ponto de vista metabólico, admite-se que a formação de ésteres é uma etapa através da qual os microorganismos previnem a acumulação de compostos tóxicos, tais como ácidos graxos de cadeia curta (por exemplo ácido acético) ou álcoois de maior peso molecular (PASTORE & PARK, 1994).

Tabela 13: Resultado da análise sensorial do primeiro estudo feito com a levedura *P. tannophilus* (otimização das condições).

Código	Descrição do aroma	Tempo da análise (h)
1	Muito fraco	30
2	Muito fraco	48
3	Banana/ frutal +++	96
4	Frutal ++, alcoólico +	96
5	Frutal +	30
6	Frutal +	30
7	Alcoólico +++ frutal++	48
8	Alcoólico +++frutal +	96

Intensidade do aroma observado: nenhum (-), fraco (+), médio (++) e intenso (+++)

Para os cálculos dos coeficientes de impacto foram considerados os valores integrados da produção de voláteis totais e de ésteres (etil acetato e isoamil acetato) e os cálculos estão descritos no ítem 3.4.3.

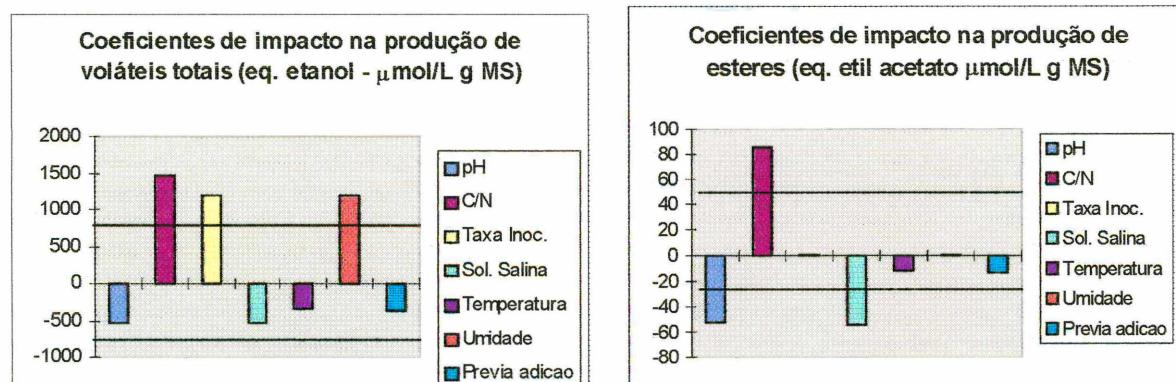


FIGURA 14 – Gráficos indicando o impacto dos diferentes parâmetros na produção de Ésteres (etil acetato e isoamil acetato) e de voláteis totais.

Através destes gráficos pode-se perceber que as variáveis atuam de maneira diferente na produção dos voláteis totais (predominantemente o etanol) e na produção de

ésteres. A consideração apenas da produção dos voláteis totais conduziria a conclusões equivocadas.

A variação do pH, de 4,7 para 6, teve efeito negativo em ambas produções. Analisando os dados da Tabela 12 parece que o valor do pH ideal para o microorganismo fica próximo de 5,3. Como este valor é próximo daquele do meio natural, nos estudos seguintes não foi efetuado o ajuste deste parâmetro.

A adição de glicose (20%) influenciou positivamente a produção de ésteres, indicando a necessidade da otimização deste parâmetro.

A variação da taxa de inoculação, a mudança na temperatura, a alteração da umidade do meio de cultivo e a prévia adição de água ao meio inoculação não apresentaram-se como fatores de impacto na produção de ésteres..

A adição da solução salina teve efeito inibitório em ambas respostas; isto provavelmente ocorreu porque o resíduo de casca de café já possui considerável quantidade de cinzas (4,5%). É interessante perceber que a extração feita na casca para a obtenção do resíduo diminuiu a quantidade de sais deste em 27,5% e proporcionou o crescimento deste microorganismo; contudo, quando efetuou-se novamente a adição de sais no resíduo o microorganismo não adaptou-se bem para a produção de voláteis. Isto pode indicar que um dos fatores inibidores do crescimento de *Pachysolen tannophilus* na casca de café foi a concentração de sais.

O aumento da umidade dos meios influenciou de maneira mais significativa a produção de etanol do que a produção de etil acetato.

4.2.2 - Segundo estudo: efeito da adição de óleo de soja e de leucina na produção de voláteis

Na Tabela 14 estão apresentados os resultados das análises pós-fermentativas.

Tabela 14: resultados das análises pós-fermentativas do segundo estudo com *Pachysolen tannophilus*

Código	pH final	Perda de peso (%)	Açúcar total Residual (%)	n.células/g MS
26	4,83	3,02	2,53	$2,89 \times 10^9$
26.L	4,68	4,66	2,47	$1,52 \times 10^9$
26.O	5,06	1,02	3,25	$1,04 \times 10^9$
26.E	4,47	2,12	6,47	$3,08 \times 10^8$

26- meio com 26% de glicose

26.L- adicionado de leucina

26.O-adicionado de óleo de soja

26.E- esterilizado totalmente.

Pelos resultados conclui-se que todos os meios proporcionaram o desenvolvimento da levedura; contudo, como esperado, a esterilização da fonte de carbono juntamente com o meio de cultivo promoveu a diminuição da produção de voláteis (Figura 15) e do crescimento microbiano (Tabela 14), provavelmente pela formação de compostos tóxicos durante a reação de Maillard, visto que a casca é fonte de nitrogênio (aminoácidos).

A perda de umidade durante a fermentação parece indicar que este fator não contribuiu para o término da fermentação.

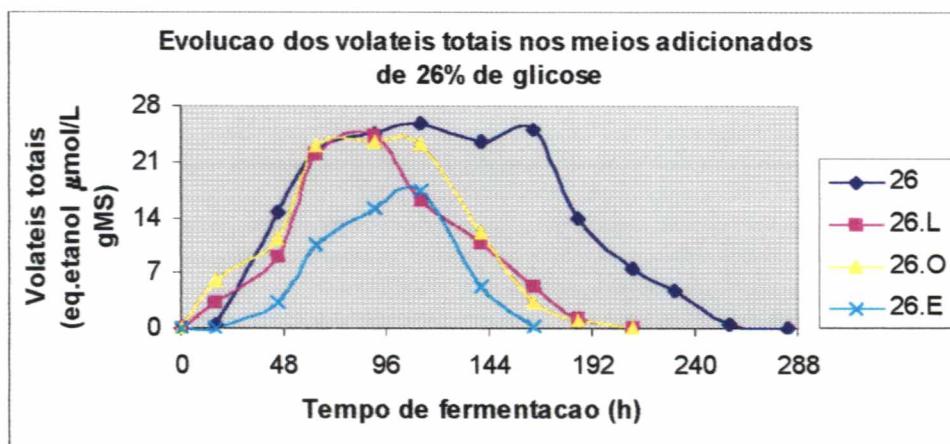


FIGURA 15 – Gráfico da evolução dos voláteis totais nos meios com 26% de glicose, adicionados de óleo de soja (26.O), leucina (26.L) e meio esterilizado integralmente (26.E).

Conforme pode-se observar no gráfico, a adição de óleo de soja e de leucina não aumentou a produção máxima dos voláteis totais.

Naquele meio em que se procedeu a esterilização de maneira integral, além da produção dos voláteis ter demorado para ocorrer foi mais curta, provavelmente devido à formação de furfural, hidroximetilfurfural e melanoidinas pela reação de Maillard, que reduz a solubilidade e o valor nutritivo do substrato levando à formação de compostos tóxicos ao microorganismo.

Neste estudo o meio sem adição de substâncias precursoras de crescimento/aroma foi o que apresentou produção mais longa. Percebe-se que nestes três meios o comportamento da fermentação nas primeiras 100h foi muito parecida, podendo estar relacionado com a presença de glicose no meio, ou seja, quanto menor a quantidade deste açúcar mais rápido é o crescimento inicial.

Para avaliar a composição do **headspace** dos diferentes meios analisemos os gráficos da Figura 16.

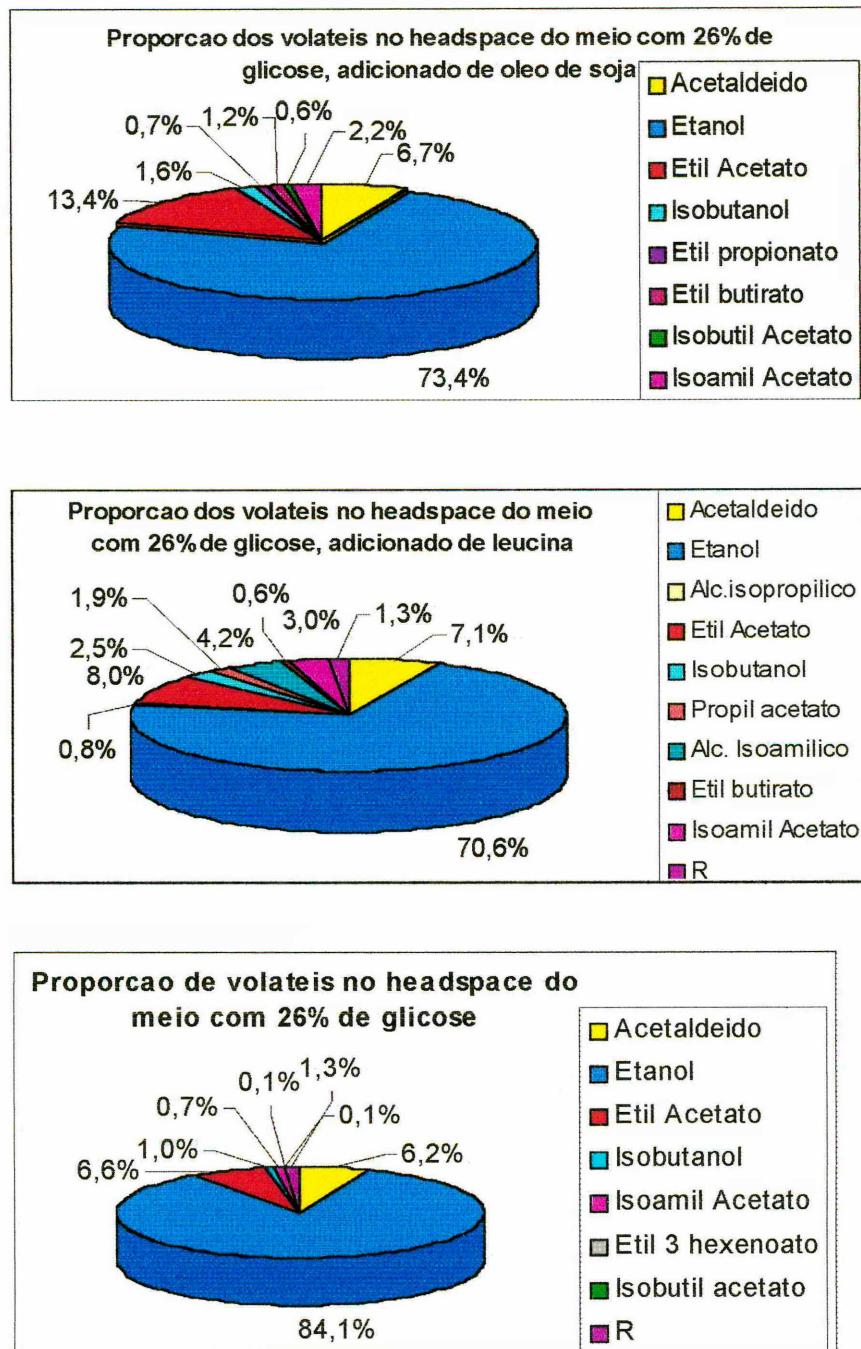


Figura 16: Gráficos da proporção dos voláteis medidos no **headspace** dos cultivos do segundo estudo feito com *P. tannophilus*

Em relação à produção de componentes específicos, a adição de leucina ao meio favoreceu a síntese de outros compostos voláteis: álcool isopropílico, propil acetato e álcool isoamílico. Além disto, houve aumento na proporção de isobutanol e isoamil acetato. A leucina é conhecida como precursora de álcool isoamílico e de isoamil acetato

e o aumento na biosíntese destes compostos indica que a levedura foi capaz de assimilar este aminoácido.

O composto etil butirato foi detectado nos meios com leucina e com óleo de soja e nestes dois meios houve menor proporção da produção de etanol, em relação ao controle.

A adição do óleo, comparada ao meio sem adição de precursores, favoreceu a síntese de novos compostos aromáticos: etil propionato e etil butirato.

Em relação aos outros meios naquele adicionado somente de glicose percebeu-se a presença de etil-3-hexenoato.

Como as fermentações dos meios adicionados de óleo e de leucina terminaram antes do meio controle, no estudo seguinte não efetuou-se a adição destes compostos.

O resultado da análise sensorial, apresentado na Tabela 15, corresponde ao tempo de máxima produção de aromas de cada meio, ou seja, 85 horas para os meios adicionados de precursores e 125 horas para C/N 20 sem precursores.

Tabela 15 – Resultado da avaliação sensorial do segundo estudo feito com a levedura *P. tannophilus*

Meio- código	Intensidade do aroma
26	++ álcool / +++ frutal (banana/abacaxi)
26.L	+++ álcool / ++ banana/ maçã
26.O	+++ álcool / ++ frutal/ banana

Intensidade do aroma observado: nenhum (-), fraco (+), médio (++) e intenso (+++); 26- meio com 26% de glicose; 26.L- adicionado de leucina; 26.O-adicionado de óleo de soja

A nota alcoólica foi percebida em todos os meios, predominando naquele adicionado de leucina, confirmando os dados do gráfico da proporção dos voláteis (Figura 16). Os aromas frutais dos cultivos devem-se à presença dos ésteres. O aroma identificado como banana é devido à presença de isoamil acetato nos três cultivos e a presença de etil butirato lembrou a algumas pessoas o aroma de maçã.

A seguir está apresentada a evolução individual dos voláteis identificados durante as fermentações. Todos os compostos estão indicados, mesmo aqueles que aparecem pontualmente (Figuras 17, 18 e 19).

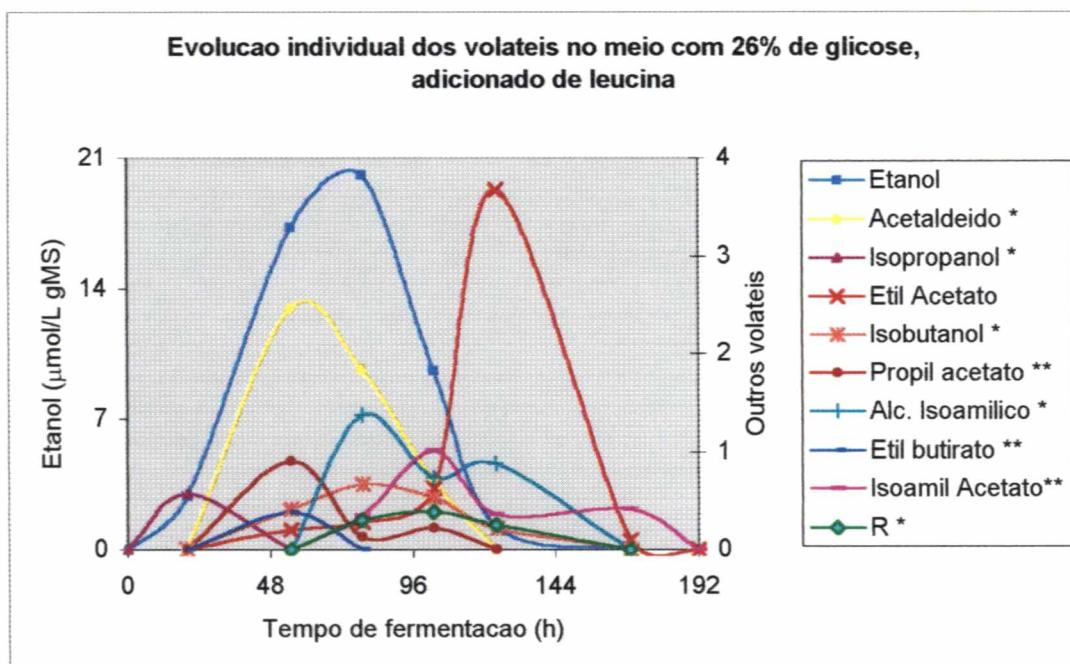


Figura 17 : Gráfico da evolução dos voláteis individuais no **headspace** do cultivo De *P. tannophilus* com 26% de glicose adicionado de leucina.

* equivalente de etanol $\mu\text{mol}/\text{L gMS}$; ** equivalente etil acetato $\mu\text{mol}/\text{L gMS}$;

Analizando o gráfico (Figura 17) pode-se observar que a produção de etanol e de acetaldeído possuem evolução semelhantes, guardando a devida proporção de cada uma. A esterificação dos álcoois ocorre de muito claramente. A produção de etil acetato se intensifica justamente no momento do declínio das curvas de etanol e acetaldeído, mostrando a esterificação deste álcool pelo microorganismo, provavelmente para detoxificação do meio.

A produção de álcool isoamílico e de isoamil acetato, decorrentes da biosíntese do aminoácido, também ocorreram simultaneamente; contudo, a quantidade do éster aumentou na medida em que o álcool foi diminuindo no **headspace** do cultivo, o que também pode indicar sua esterificação.

Com exceção do etil butirato, compostos de cadeia mais complexa passaram a ser metabolizados com aproximadamente 50h de fermentação.

No momento do início do declínio da concentração do isopropanol observa-se o início da produção do propil acetato, que atinge seu valor máximo justamente quando a quantidade do álcool no **headspace** é nula.

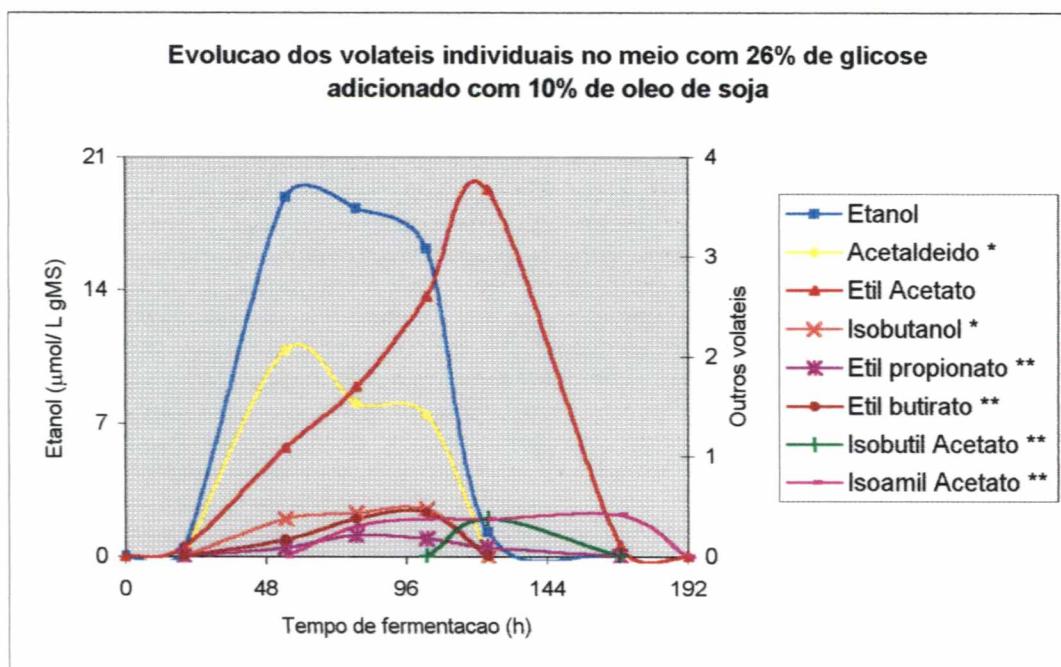


Figura 18: Gráfico da evolução dos voláteis individuais no **headspace** do cultivo de *P. tannophilus* com 26% glicose e adicionado de óleo de soja

* eq. etanol $\mu\text{mol}/\text{L gMS}$; ** eq. etil acetato $\mu\text{mol}/\text{L gMS}$;

Podem ser observadas semelhanças na evolução de determinados voláteis nos meios adicionados de óleo e leucina; por exemplo, a diminuição do etanol / acetaldeído e a máxima produção de etil acetato foram parecidos, 136 h e 120 h , respectivamente.

A esterificação do etanol/ acetaldeído em etil acetato no meio com óleo de soja teve o mesmo comportamento daquele observado no meio com adição de leucina: a esterificação do etanol ocorre justamente quando percebe-se sua diminuição no **headspace** e o aumento na presença de etil acetato.

A esterificação do isobutanol em isobutil acetato também ocorre de maneira semelhante.

Na produção do isoamil acetato dos dois meios percebe-se certa diferença. A produção deste composto no meio com leucina é maior, porque o aminoácido é precursor deste éster. Contudo, em ambos os casos o isoamil acetato só passa a ser identificado com 50h de fermentação.

No meio adicionado de óleo de soja, apesar do isoamil acetato estar presente no **headspace** do cultivo não percebe-se a formação do álcool isoamílico. Isto provavelmente indica que a produção do álcool neste meio é menor e não há tempo de

seu acúmulo no substrato, ou seja, todo o álcool isoamílico é imediatamente esterificado em isoamil acetato.

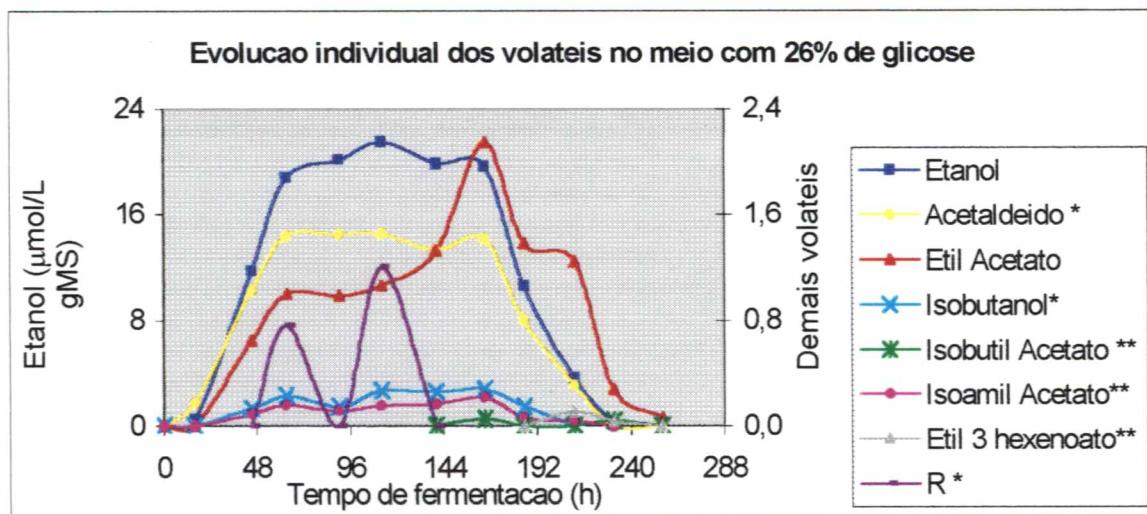


Figura 19: Gráfico da evolução dos voláteis individuais no **headspace** do cultivo de *P. tannophilus*, no meio adicionado de 26% de glicose.

Repetindo o que foi observado nos meios adicionados de diferentes substâncias, as curvas de evolução de etanol e acetaldeído são semelhantes.

O isobutanol e o álcool isoamílico, cuja presença só fica evidenciada pela sua esterificação, são formados desde o princípio da fermentação, sendo que a esterificação do primeiro só foi percebida na segunda metade do tempo de fermentação.

O etil – 3- hexenoato, um composto de alto peso molecular, só foi metabolizado no final da fermentação. Talvez, com o prolongamento da cinética o microorganismo passe a sintetizar compostos mais complexos, tanto ácidos quanto os ésteres para detoxificar a formação dos primeiros.

Além da formação de etil-3-hexenoato houve a produção de um outro composto não identificado (R), cujo tempo de retenção na coluna cromatográfica (Tabela 8) é de 10,92 min, sugerindo que seja um composto de sete ou oito carbonos na estrutura química.

4.2.3- Terceiro estudo: efeito da adição de glicose/xilose na produção de voláteis

Aqueles experimentos cujos meios de cultivo possuíam 44 e 49% de glicose e 35% de xilose não apresentaram produção de voláteis.

O gráfico da Figura 21 agrupa os resultados deste experimento com aqueles feitos anteriormente com diferentes concentrações de glicose, favorecendo a comparação dos

resultados. O gráfico mostra a evolução dos voláteis totais do meio sem adição de glicose (anteriormente representado na Figura 11), com 14%, 20% (representado pelo meio 7 do estudo 4.2.1 feito com a levedura – Figura 13), 26% (estudo 4.2.2- Figura 16) e 35%.

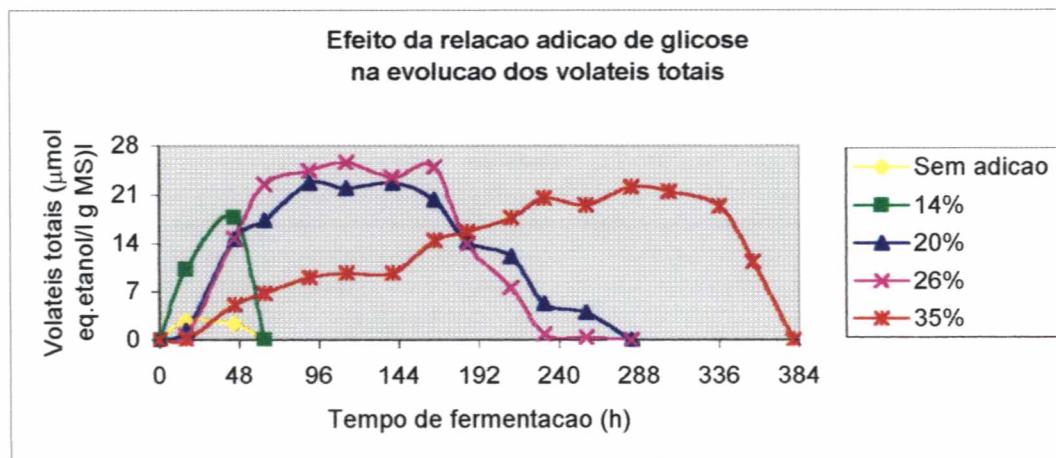


Figura 20: Evolução dos voláteis totais nos meios de cultivo adicionados com diferentes concentrações de glicose (14, 20, 26 e 35%) e no meio sem adição de fonte de carbono.

No gráfico percebe-se que a adição de glicose (meios 20, 26 e 35) não aumentou a produção máxima de voláteis, ficando próxima de 25 μmol/L gMS nos três meios; a diferença no tempo de fermentação aumentou progressivamente: 240h, 288h e 384h, até um limite no qual não se observou crescimento algum (44% de glicose). Além disto, percebe-se que quanto menor a concentração de glicose no meio mais rápida é a velocidade inicial de produção de voláteis. Isto pode ter ocorrido devido a dois fatores:

1. com a diminuição da atividade de água, ocasionada pelo aumento na concentração de glicose, o microorganismo demorou mais para se adaptar ao meio de cultivo. Conforme ocorre a multiplicação da levedura aumenta o consumo de açúcar, gerando um gradativo aumento na atividade de água do meio ou, ainda, promovendo a adaptação do microorganismo a esta concentração de glicose.
2. A maior concentração de nitrogênio nos meios fez com que o microorganismo gerasse biomassa mais rapidamente. Como determinados metabólitos, como o etanol, não são secundários e são sintetizados simultaneamente ao crescimento, quanto maior for a disponibilidade de nitrogênio, mais rapidamente ocorrerá a geração de biomassa e, consequentemente, a velocidade de produção de voláteis. Contudo, como estes meios têm menor disponibilidade de carbono, as fermentações são mais curtas.

Parece não ter havido diferença significativa na produção de voláteis totais dos meios com 20 e 26% de glicose. Para estimar qual foi a produção de voláteis totais de cada meio faz-se a análise da área total embaixo das curvas, seguindo o modelo de GOMPERTZ cuja curva da integração está apresentada na Figura 21.

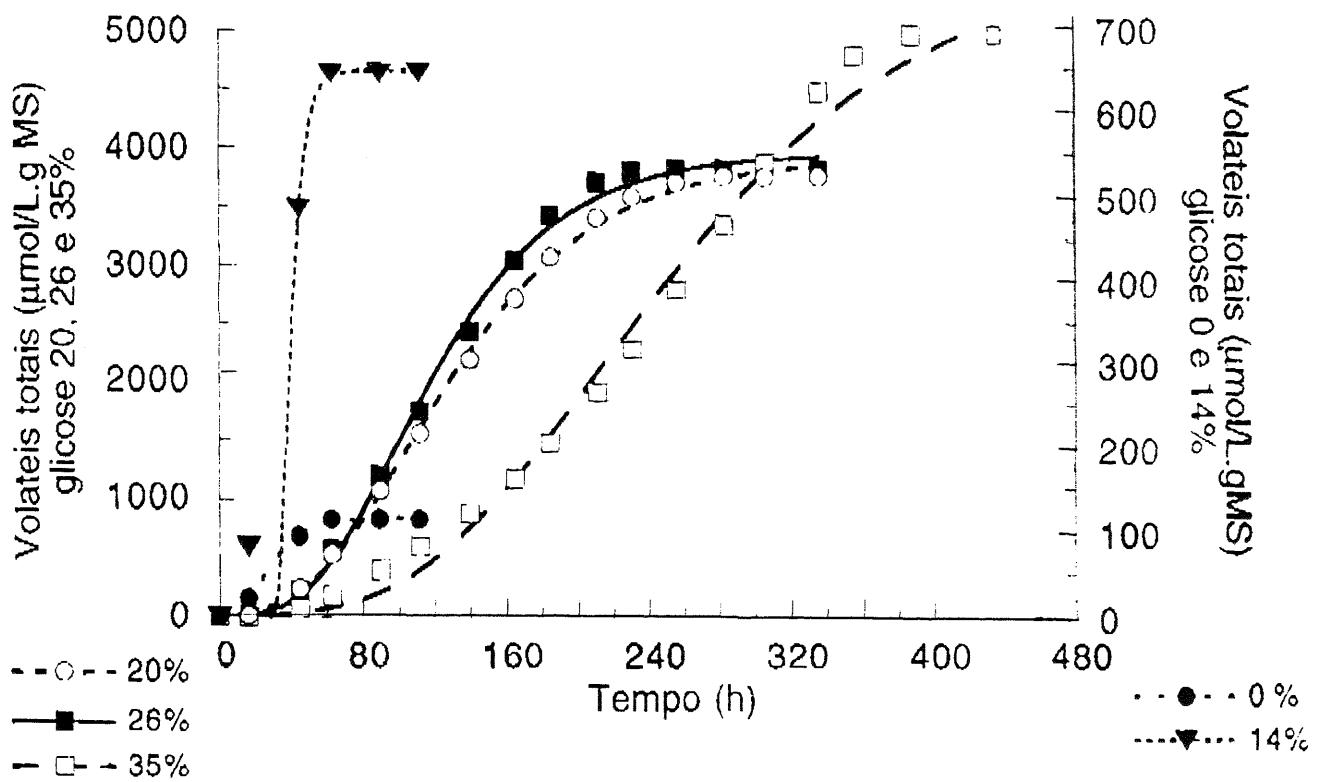


Figura 21: Curva da integração dos valores de produção de voláteis totais nos meios com adição de glicose (14, 20, 26 e 35%) e do meio sem adição de fonte de carbono (resíduo somente umidificado).

Os resultados obtidos com a aplicação do modelo de GOMPERTZ (descrito 3.4.1.3) estão indicados na Tabela 16.

Tabela 16: Constantes cinéticas da produção total de voláteis, segundo o modelo de GOMPERTZ

Adição de Glicose (%)	Total Voláteis (eq. etanol $\mu\text{mol/LgMS}$)	K (h^{-1})	Tempo máx. produção (h)	R ²
Sem	110	0,370	17	0.977
14	650	0,187	38	0.985
20	3910	0,0175	105	0.999
26	3942	0,0206	100	0.997
35	5661	0,0098	212	0.991

Pelos resultados indicados na Tabela 16 percebe-se claramente que quanto maior foi a adição de glicose no meio, maior foi a produção de voláteis totais, até o limite de 35%, confirmando afirmações anteriores. É possível ainda estabelecer uma estreita relação entre a maior presença de nitrogênio do meio (menor adição de glicose) e a velocidade de formação de voláteis, que por sua vez direciona o tempo de máxima produção.

Percebe-se que os meios com adição de 20 e 26% de glicose apresentaram produção de voláteis similar, assim também a cinética dos mesmos (Figura 20 e 21). O meio com 35% de glicose teve produção 30% superior a estes; contudo a velocidade de produção foi duas vezes mais lenta. Seria interessante direcionar os estudos em coluna tentando obter uma adição de glicose que tenha boa produção de voláteis, com rápido crescimento.

Os gráficos das proporções dos voláteis não serão repetidos, estando anteriormente indicados nas Figuras: 10 (sem adição), 13 (20%) e 16 (26%). Na Figura 22 apresentam-se gráficos da proporção dos voláteis dos meios 35%.

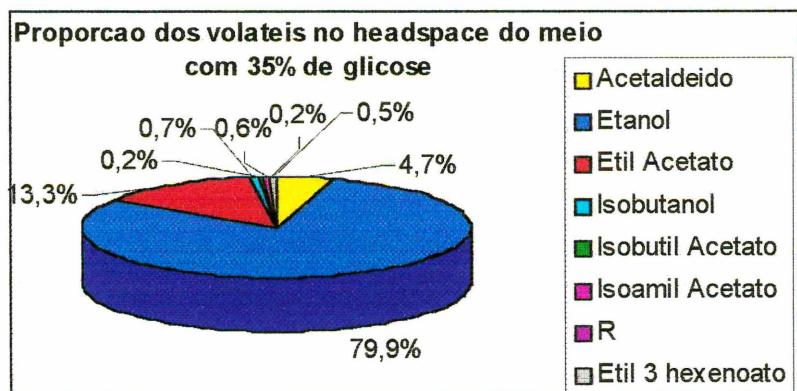


Figura 22: Gráfico das proporções de cada composto identificado no **headspace** do cultivo de *P. tannophilus* com adição de 35% de glicose.

O meio com 20% de glicose apresentou menor variedade de voláteis em relação aos demais meios; contudo, neste meio percebe-se a formação de etil butirato, não visto nos demais meios.

A proporção dos voláteis presentes nos meios 20, 26 e 35 (acetaldeído, etanol, e isobutanol) foi semelhante. O que se percebe comparando os três casos é que quanto maior a produção de etil acetato, menor aquela de etanol e de acetaldeído.

Ainda nos meios 26 e 35 estavam presentes no headspace compostos não verificados no meio 20: isobutil acetato, isoamil acetato, etil-3-hexenoato e o composto R (não identificados).

A seguir está o gráfico da evolução individual dos voláteis no meio 35.

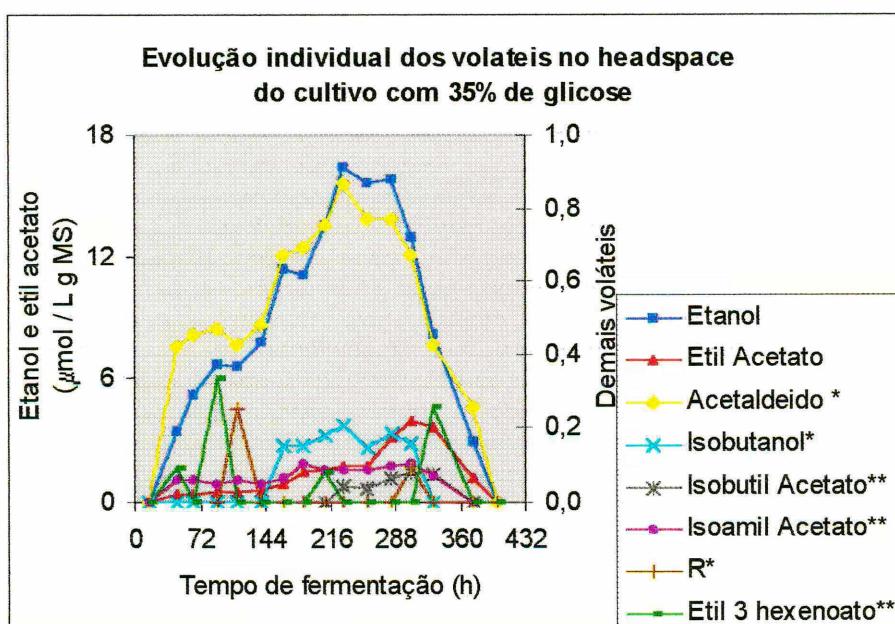


Figura 23: Gráfico da evolução individual dos compostos no headspace do cultivo de *Pachysolen tannophilus*, adicionado de 35% de glicose.

*eq. etanol $\mu\text{mol} / \text{L g MS}$; ** eq. etil acetato $\mu\text{mol} / \text{L g MS}$;

Assim como anteriormente percebido nos meios com outras concentrações de glicose (Figuras 17, 18 e 19) as curvas de acetaldeído e etanol são similares e a maior produção de etil acetato é percebida a partir da queda na quantidade de etanol do headspace.

Com cultivos mais prolongados, naqueles com maior adição de glicose, provavelmente o microorganismo tem mais tempo para produzir compostos mais complexos, como o isoamil acetato, etil 3 hexenoato, isobutil acetato e o composto R.

Tabela 17: resultado das análises feitas no estudo do efeito da adição de glicose

Glicose (%)	Máx. prod. Aroma (h)	Descrição do aroma	n. células/g MS	Açúcar total residual (%)	Perda peso(%)	pH final
14	45	++ frutal, +alcoólico	$4,7 \times 10^8$	3,07	0,6	5,05
26	100	++ banana + acetona ++ álcool	$5,89 \times 10^9$	2,53	3,02	4,83
35	250	+++ abacaxi e banana	8×10^9	7,06	5,07	4,66

Intensidade do aroma observado: nenhum (-), fraco (+), médio (++) e intenso (+++)

O pequeno aumento no pH pode ter ocorrido devido à degradação das proteínas, o que justificaria o maior pH no meio com menor relação C/N; contudo, a produção de ácidos (por exemplo acético, na rota de formação do etil acetato) manteve o pH de ambos meios baixo.

A perda de peso dos frascos foi mais intensa no meio cujo tempo de fermentação foi mais prolongado, provavelmente devido ao calor nas câmaras de fermentação.

Tabela 18: Compostos voláteis identificados no **headspace** dos cultivos de *P. tannophilus*, valores totais de dados integrados (Kaleidagraph)

Composto	Meio:		Adição	glicose	(%)		35
	Sem	14			26	26.O	
Acetaldeído *	-	32	257	225	130	133	202
Etanol	93	370	3154	3035	1410	1328	3416
Isopropanol *	-	-	-	-	-	16	-
Etil acetato	23	74	125	239	258	151	570
Isobutanol *	-	8	22	35	32	47	28
Etil propionato **	-	-	-	-	14	-	-
Propil acetato **	-	-	-	-	-	35	-
Álcool isoamílico *	-	-	-	-	-	79	-
Isobutil acetato **	-	-	-	2	12	-	8
Etil butirato **	-	13	29	-	24	12	-
Isoamil acetato **	-	-	-	24	42	57	24
R *	-	-	-	47	-	24	9
Etil-3-hexenoato**	-	-	-	3	-	-	21
Tempo ferment.(h)	63	63	240	284	211	211	388
Total voláteis *	121	648	3746	3811	2211	2488	4948

26.O – meio com 26% de glicose adicionado de 10% de óleo de soja.

26.L – meio com 26% de glicose adicionado de uma solução 10 mMol de leucina.

* eq. etanol $\mu\text{mol/L}$ g MS ; ** eq. etil acetato $\mu\text{mol/L}$ g MS

4.3- *Ceratocystis fimbriata*: produção de voláteis em Erlenmeyer

A Tabela 19 mostra a evolução dos parâmetros que indicam crescimento do microorganismo.

Tabela 19 : Resultado das análises dos experimentos com *C. fimbriata*.

Glicose (%)	Análise sensorial(h)	Descrição do aroma/intensidade	pH final	Umidade Final %	Proteína final (%)	Açúcar residual (%)
20	100	+++abacaxi ++acetona	4,92	57,5	8,6	4,78
35	250	+++ fruta/ abacaxi	4,42	55,7	8,2	15,62
46	190	++ banana passa	4,69	58,1	6,6	34,6
35+ SS	250	+ banana ++ acetona	4,32	52,8	6,8	15,48
35+ O	250	+ banana	4,54	60,2	7,3	10,8
30+ L	250	+++ banana ++ acetona	4,69	58,7	8,5	6,34

35+ SS- solução salina; 30 + O- óleo de soja; 30 + L- leucina

Intensidade do aroma observado: nenhum (-), fraco (+), médio (++) e intenso (+++)

Percebe-se que a perda de umidade ocorrida nos meios de cultivo foi intensa. A umidade inicial do meio era de 70% e possivelmente esta diminuição tenha sido um dos parâmetros que marcaram o término da fermentação. Esta desidratação provavelmente deva-se ao calor na câmara de crescimento (30°C), acentuado pelos longos períodos fermentativos (12 a 20 dias).

Apesar desta variação de umidade em Erlenmeyer, os resultados da produção de voláteis foram satisfatórios. Contudo, a continuidade dos estudos de otimização do meio de cultivo para a produção de aromas frutais será feita em fermentador do tipo colunas, no qual é possível o controle da umidade do ar de entrada.

Todos os meios apresentaram pH final próximo ao natural do resíduo. Este parâmetro em estudos posteriores não foi corrigido.

Para facilitar a interpretação dos resultados, os mesmos agrupados. Considera-se o meio com adição de 36% de glicose como padrão, referência, em todos os estudos. O agrupamento dos experimentos foi feito da seguinte forma:

- Adição de glicose: 20, 35 e 46%
- Meio controle com 35% de glicose, adicionado de 10% óleo (35.O), ou embebido com solução salina (35.SS) ou embebido com solução de 10 mMol de leucina (35.L).

4.3.1- Primeira comparação: efeito da adição de diferentes concentrações de glicose na produção de voláteis.

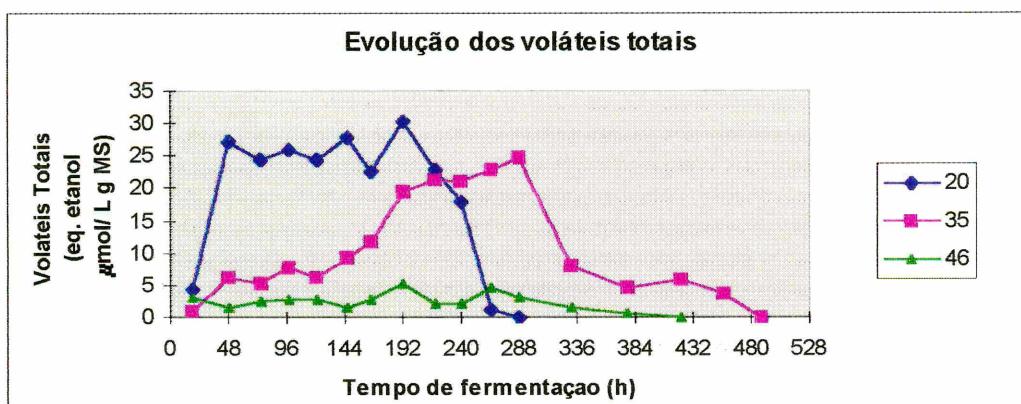


Figura 24: Gráfico da evolução dos voláteis totais produzidos pelo fungo *C. fimbriata* em resíduo de café, com diferentes concentrações de glicose: 20, 35 e 46%.

No meio com adição de 46% de glicose percebe-se uma inibição da cinética de evolução dos voláteis. Como a produção foi significativamente inferior aos demais meios seus dados não foram analisados em profundidade. O mais interessante é perceber o crescimento do microorganismo, mesmo com adições tão elevadas de glicose.

Assim como observado nos estudos para a levedura *P. tannophilus*, a influência da concentração de glicose/nitrogênio no desenvolvimento microbiano pode ser percebido comparando o tempo que o microorganismo leva até atingir a máxima produção de voláteis. Na concentração de 35% o microorganismo apresenta uma fase mais longa até atingir a máxima produção de voláteis, que acontece somente com 288h; já com 20% o fungo já atinge valores máximos de produção total de voláteis com 48h. Acreditamos que esta produção de voláteis esteja relacionada à maior produção de biomassa, da mesma maneira como sugerida no caso da levedura.

A Figura 24 mostra que a produção de voláteis é significativamente mais interessante quando se trabalha com relações menores adições de glicose.

A Figura 11, na etapa de seleção de um meio de cultivo (4.2), mostra que o meio de cultivo somente umidificado apresentou uma cinética de 96h e com máxima produção de voláteis totais de 6 μmol eq. etanol/L gMS. Na Figura 24 percebe-se que a simples adição de glicose aumentou a produção máxima para próximo de 30 μmol eq. etanol/L gMS com fermentações de, no mínimo, 280h.

Este estudo ainda não é conclusivo, apenas mostra que a adição ideal de glicose ainda não foi atingida e novos estudos devem ser feitos.

O gráfico apresentado na Figura 25 mostra o valor total dos voláteis produzidos, através da integração das áreas das curvas.

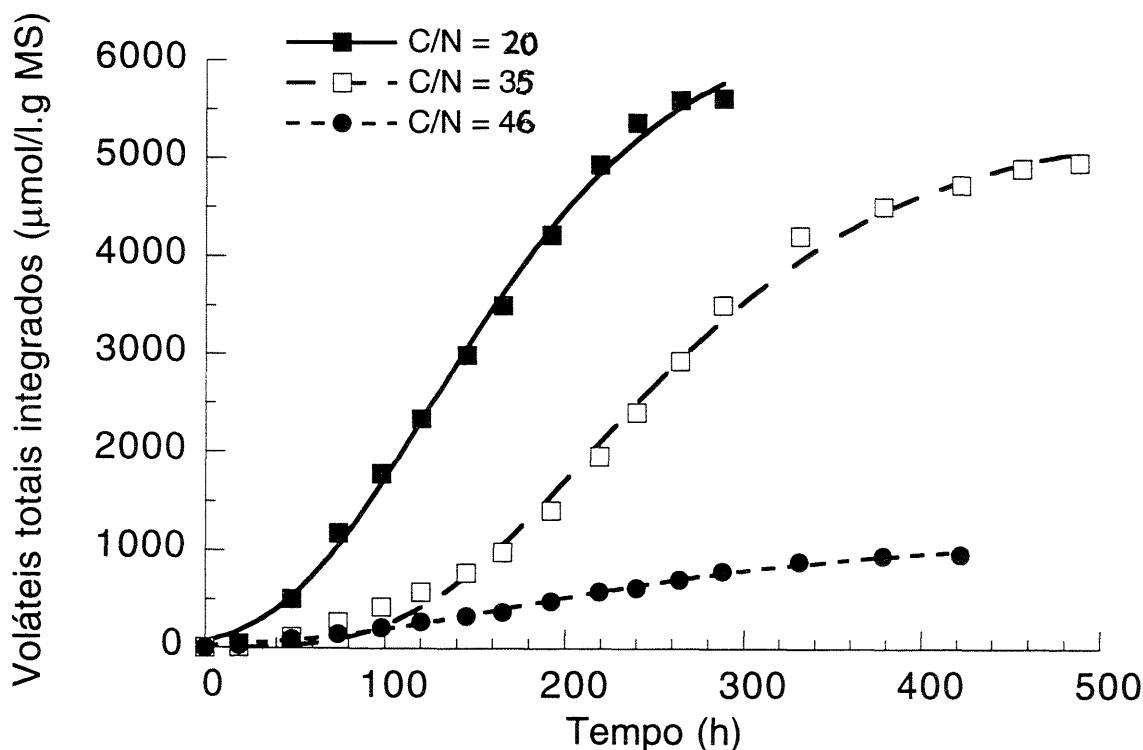


Figura 25: Gráfico da integração dos valores dos voláteis produzidos durante a fermentação de resíduo de café por *Ceratocystis fimbriata*, em diferentes concentrações de glicose (20, 35 e 46%).

Os resultados obtidos com a aplicação do modelo de GOMPERTZ (descrito 3.4.1.3) estão indicados na Tabela 20.

Tabela 20: Constantes cinéticas da produção total de voláteis, segundo o modelo de GOMPERTZ

Adição de Glicose (%)	Total Voláteis Etanol (eq. μmol/LgMS)	K (h^{-1})	Tempo máx. produção (h)	R ²
20	6583	0,0123	123,1	0,997
35	5243	0,0093	213,6	0,994
46	1134	-	169,2	0,997

Pela integração dos valores fica evidente que o meio 46 apresenta produção total de voláteis muito inferior aos demais; o meio com 35% de glicose, apesar da cinética mais prolongada, teve produção inferior àquele com 20%. Todas curvas apresentam R^2 adequado. A velocidade de produção dos voláteis diminuiu com o aumento na concentração de glicose dos meios.

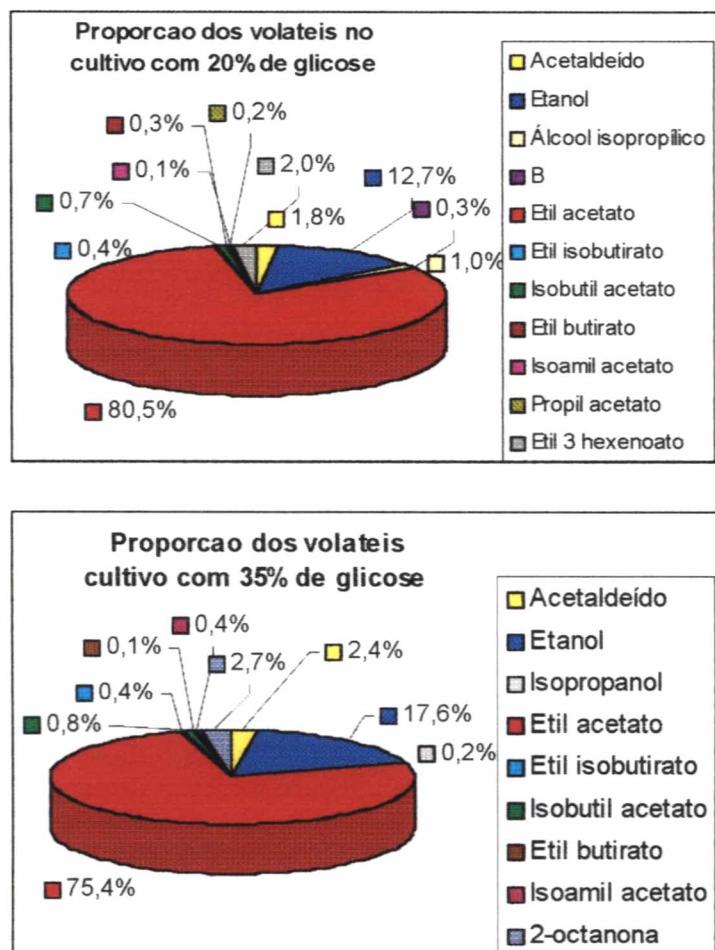


Figura 26: Gráficos da proporção dos voláteis identificados no **headspace** dos cultivos de *Ceratocystis fimbriata*, com 20 e 35% de glicose.

Diferentemente da levedura, este fungo direciona a produção de voláteis a ésteres, sobretudo etil acetato, importante na composição do aroma frutal. Percebe-se também que quanto maior a concentração de açúcar no meio maior é a concentração de álcool produzido, ocasionando a diminuição na proporção de etil acetato.

Nos meios desequilibrados (com muita ou nenhuma adição de glicose) houve menor variedade de compostos voláteis. No meio sem adição de glicose o microorganismo sintetizou somente etanol e etil acetato (Figura11) e com a adição de

46% de glicose, além destes dois voláteis, ainda detectou-se acetaldeído, isoamil acetato e etil-3-hexenoato.

A proporção dos principais voláteis detectados no **headspace** dos cultivos 20 e 35 foram parecidas, sendo a principal diferença a presença de etil 3 hexenoato no primeiro e de 2- octanona no segundo.

A Figura 27 mostra como acontece a evolução individual dos voláteis nos meios 20 e 35%. Os voláteis produzidos pontualmente não foram representados.

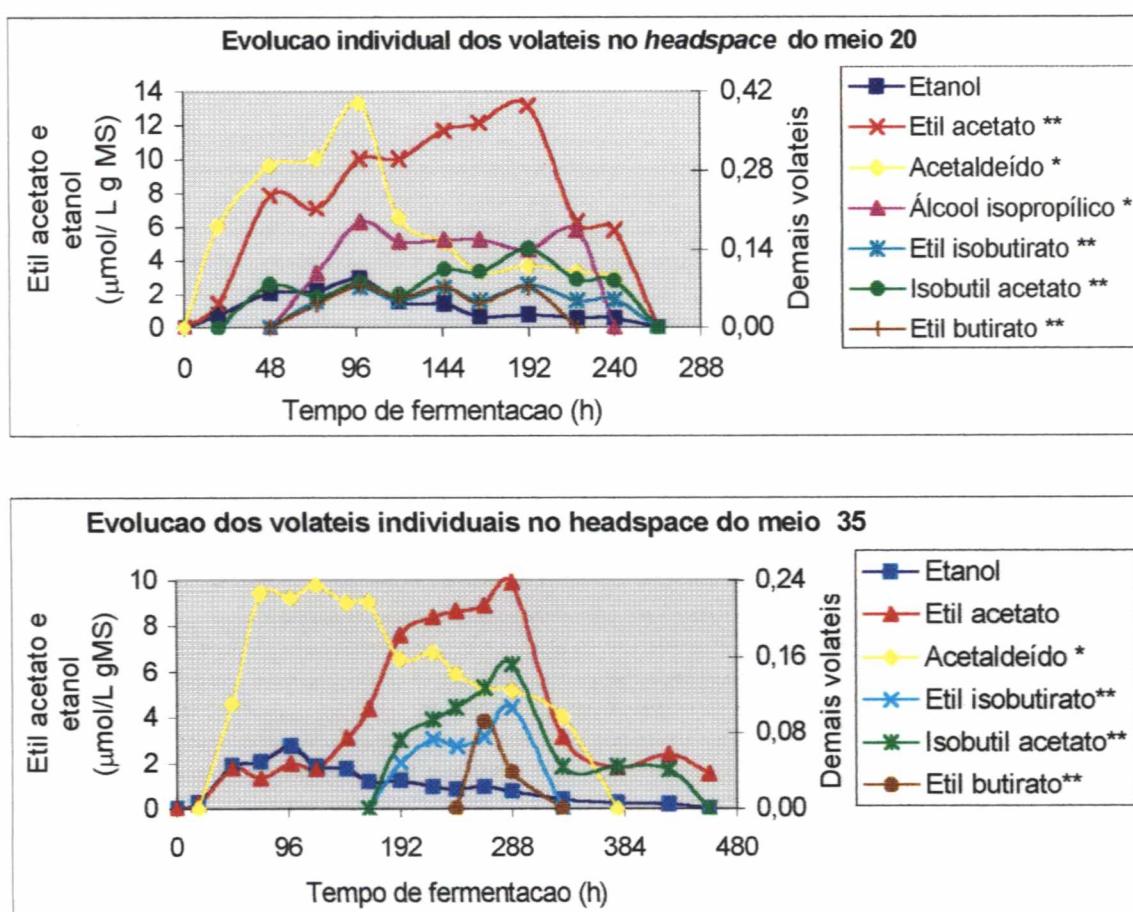


Figura 27: Gráficos da evolução individual dos principais compostos identificados no **headspace** dos cultivos de *Ceratocystis* (glicose 20 e 35%). *eq. etanol $\mu\text{mol} / \text{L g MS}$; ** eq. etil acetato $\mu\text{mol} / \text{L g MS}$.

4.3.2- Segunda comparação: influência da adição de solução salina, óleo de soja e leucina na produção de voláteis

Este estudo foi feito paralelamente ao anterior e, por isso, apesar dos resultados no meio 20 terem sido mais interessantes os experimentos não foram continuados neste. O objetivo deste estudo não foi a otimização final da produção de voláteis, mas a

verificação da influência de determinadas substâncias adicionadas ao meio de cultivo na produção de aromas.

Caso fosse verificada a influência positiva da adição de uma destas substâncias na produção total de aromas a mesma seria adicionada ao meio em diferentes concentrações simultaneamente à otimizada da quantidade de glicose, comentada no item 4.3.1, num fermentador do tipo colunas.

O meio “controle” é aquele com adição de 35% de glicose, cuja produção foi analisada no estudo 4.3.1; os meios também possuem esta adição de glicose e foram adicionados de: solução 10mMol de leucina (35.L) (BRAMORSKI, 1997; CHRISTEN et alli, 1997), 10% de óleo de soja (35.O) (BRAMORSKI, 1997) ou solução salina (35.SS).

A Figura 28 apresenta o gráfico da evolução dos voláteis totais medidos no **headspace** dos cultivos.

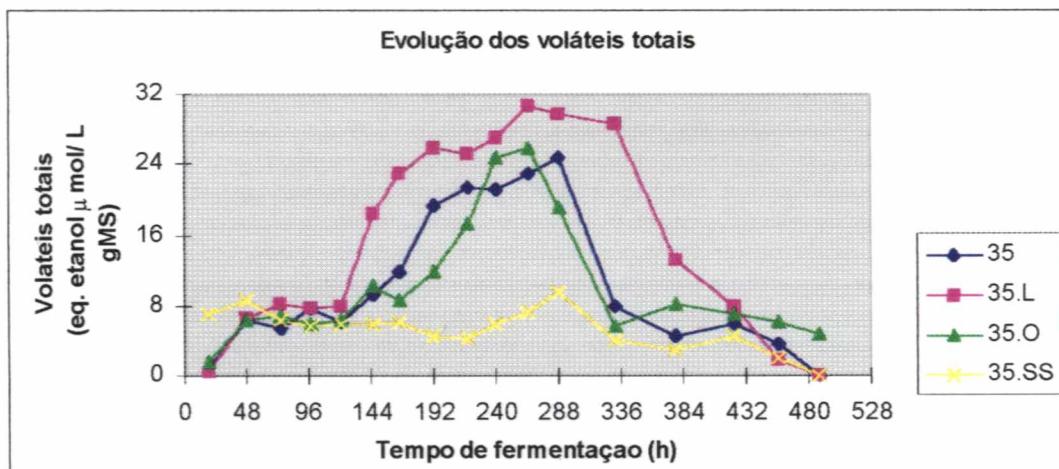


Figura 28: Gráfico da evolução da produção de voláteis totais nos meios com 35% de glicose, adicionados de leucina (35.L), solução salina (35.SS) e óleo de soja (35.O), por *Ceratocystis fimbriata*.

A adição de leucina no resíduo de café teve efeito positivo na produção de voláteis totais por *Ceratocystis fimbriata* quando comparada ao meio básico, fato também observado por outros autores (CHRISTEN et alli, 1997).

A adição de óleo não teve efeito significativo na produção de voláteis, visto que a evolução dos voláteis totais produzidos neste meio foi similar àquela do meio padrão. Este dado foi diferente do observado por BRAMORSKI (1997).

O meio de cultivo adicionado de solução salina apresentou evolução de voláteis inferior ao meio “controle”. Isto indica que na produção de aromas por *Ceratocystis fimbriata* em resíduo sólido de café não há necessidade da complementação com solução de sais, conforme também observado no estudo com a levedura *Pachysolen tannophilus*. Isto provavelmente ocorre devido à elevada quantidade de sais presentes

neste substrato (Tabela 6). Como este fato também foi verificado no caso da levedura, anteriormente citado, acreditamos que a quantidade de sais presentes na casca de café é um fator limitante à produção de voláteis por estes microorganismos; já no resíduo, cuja composição apresenta 27,5% de redução na quantidade de sais, ambos desenvolvem-se satisfatoriamente.

Sabe-se que este não é o único fator cuja concentração é reduzida durante a extração da casca para obtenção do resíduo; contudo, fatores normalmente limitantes do crescimento, como cafeína por exemplo, não foram avaliadas no término da fermentação.

A Figura 29 mostra as curvas de integração dos valores das áreas das curvas dos quatro meios, que nos fornece a produção total de voláteis, segundo o modelo de GOMPERTZ.

Tabela 20: Constantes cinéticas da produção total de voláteis, segundo o modelo de GOMPERTZ

Código do meio	Total Voláteis (eq. Etanol $\mu\text{mol/L.g MS}$)	K (h^{-1})	Tempo máx. produção (h)	R^2
35	5243	0,0105	210	0,996
35.O	5698	0,0085	234	0,996
35.L	8286	0,0098	225	0,997
35.SS	2798	0,0069	288	0,994

35.O- 10% de óleo de soja; 35.L- 10 mMol de leucina;

35.SS- solução salina .

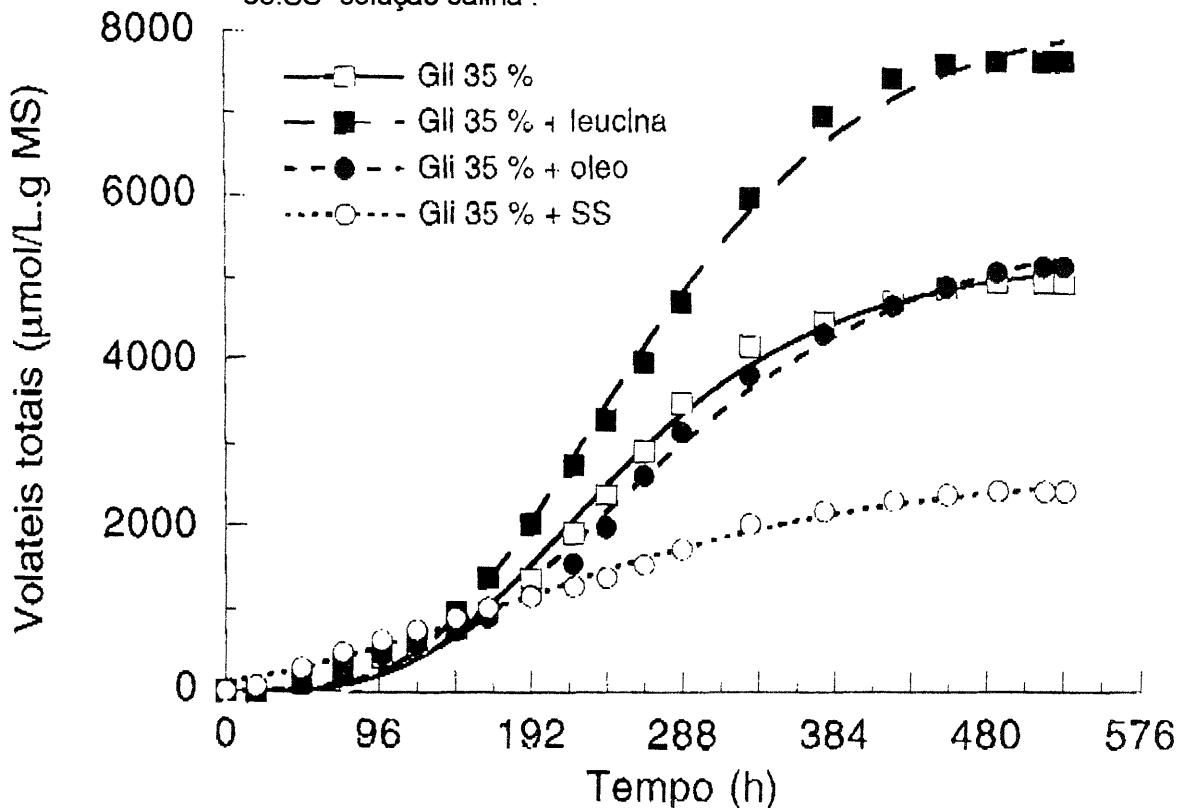


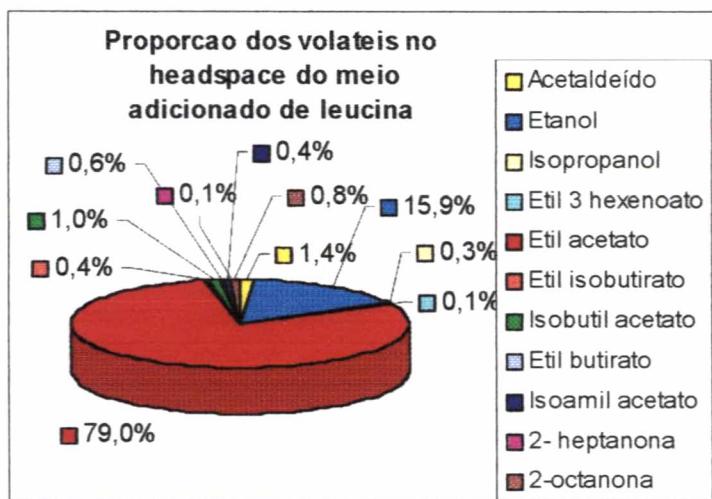
Figura 29: Gráfico da integração da produção de voláteis totais no resíduo adicionado de 35% de glicose, solução salina (35.SS), leucina (35.L) ou óleo de soja (35.O) por *C. fimbriata*.

O resultado da integração dos valores da produção de voláteis totais mostra que a adição do óleo de soja no resíduo de café não aumentou expressivamente a produção total de voláteis em comparação ao meio padrão.

Já o cultivo adicionado de leucina a produção foi de $8286 \mu\text{mol eq. etanol/L g MS}$, 58% maior do que do meio básico.

Os gráficos da Figura 30 mostram a proporção individual dos voláteis no headspace dos meios 35.O e 35.L. O meio controle tem sua representação indicada na Figura 26.

30a



30b

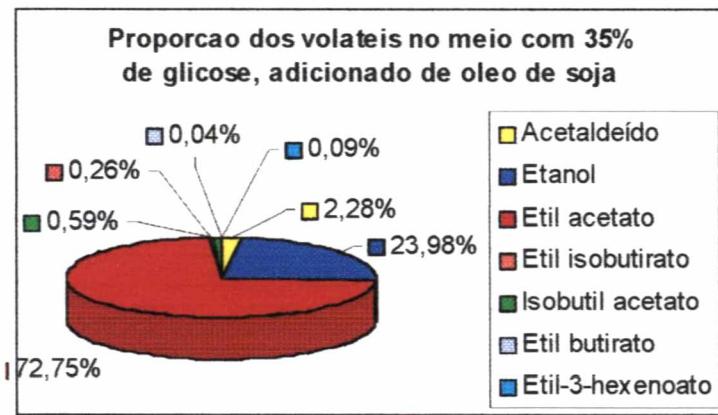


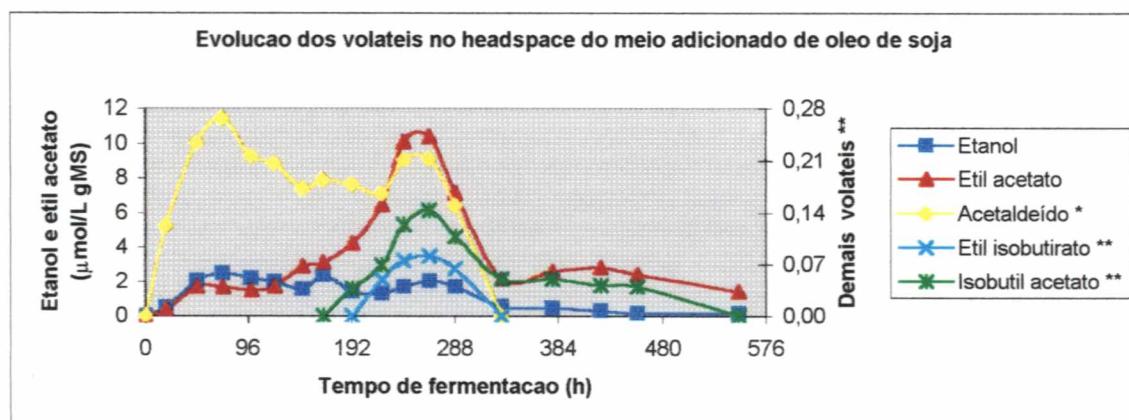
Figura 30: Gráficos da proporção individual dos voláteis medidos no **headspace** dos meios com 35% de glicose, adicionados de óleo de soja (30b) e de leucina (30a).

O meio adicionado de óleo de soja apresentou redução na diversidade dos compostos em relação ao meio básico, não sendo identificados: isopropanol, isoamilacetato e 2-octanona. A quantidade de acetaldeído, etanol e de etil acetato mantiveram-se constantes. Houve a formação de etil-3-hexenoato.

A adição de leucina ao meio além de aumentar a produtividade de voláteis pelo microorganismos aumenta também a diversidade dos compostos: etil-3-hexenoato e 2-heptanona.

Os gráficos a seguir mostram a evolução dos voláteis no **headspace** dos cultivos.

31a



31b

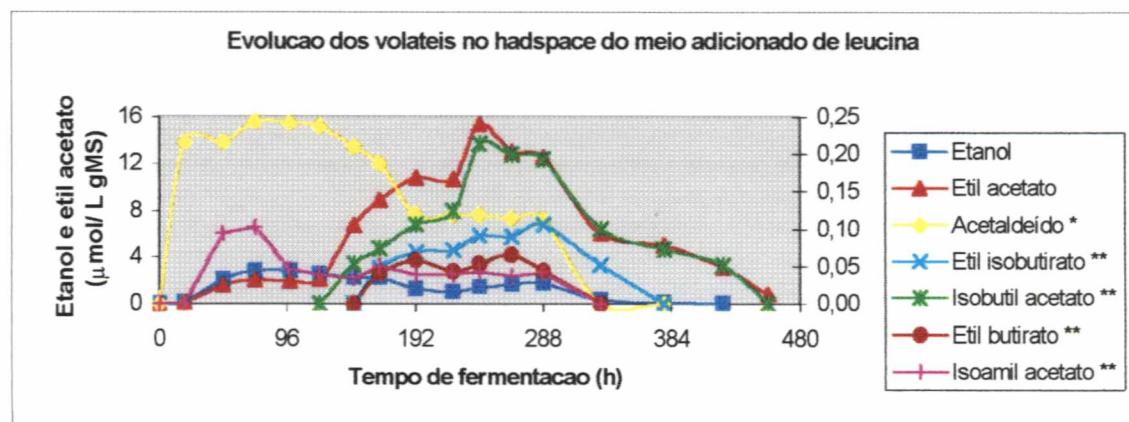


Figura 31: Evolução dos compostos individuais medidos no **headspace** dos cultivos com 35% de glicose, adicionados de leucina (31a) e de óleo de soja (31b).

No meio “ controle” e naquele adicionado de óleo de soja a produção de etil isobutirato e de isobutil acetato ocorreram de maneira similar (tempo/concentrações).

Determinados compostos têm comportamento similar em ambos gráficos, como etanol, acetaldeído e etil acetato. O acetaldeído apresenta rápido aumento, atingindo o máximo em aproximadamente 48h. O etil acetato até aproximadamente 100 h de

fermentação aparece timidamente e em seguida aumenta em aproximadamente quatro vezes, atingindo a máxima produção em 288 h.

O isobutil acetato e o etil isobutirato não apresentam mesmo tipo de evolução nos dois casos; contudo em ambos experimentos estes compostos começam a formar com o aumento da concentração de etil acetato. Nota-se também que inicialmente aparece o isobutil acetato e em seguida o etil isobutirato, no mesmo espaço de tempo nos dois gráficos.

No experimento com óleo de soja percebe-se que o etil acetato e o isobutil acetato têm curvas de produção semelhantes, ou seja, apresentam máxima produção e diminuição em tempos equivalentes.

No resíduo de café adicionado de leucina os seguintes compostos apresentam o mesmo comportamento: etil acetato, isobutil acetato, etil butirato e etil isobutirato. Também percebe-se que estas produção começam a aumentar no momento em que há uma diminuição da concentração de acetaldeído.

Em relação ao meio controle o meio com leucina a evolução dos principais compostos foi parecida, sendo que a principal diferença ocorreu na produção de isoamil acetato.

Tabela 21: Quantidade total dos compostos produzidos em diferentes condições, por *C. fimbriata*.

Compostos/Meios	20	35	35.O	35.L
Acetaldeído *	47	57	58	50
Etanol *	329	428	607	565
Isopropanol *	26	5	-	11
B *	8	-	-	-
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
Total*	6583	5243	5698	8286

20- 20% de glicose; 35- 35% de glicose (controle)

35.L- com adição de leucina; 35.O- adição de óleo de soja

*eq. etanol $\mu\text{mol} / \text{L g MS}$; ** eq. etil acetato $\mu\text{mol} / \text{L g MS}$.

5- CONCLUSÕES

A casca de café, seu extrato obtido por hidrólise a vapor e o resíduo sólido desta hidrólise mostraram-se adequados ao desenvolvimento de diferentes fungos filamentosos e leveduras, pois de maneira geral todos aqueles que fizeram parte da seleção inicial de cepas se desenvolveram satisfatoriamente.

Por possuirem elevado teor protéico a casca de café e seu resíduo sólido são substratos economicamente importantes para o crescimento de microorganismos. Neste estudo com a adição de uma fonte de carbono simples, como a glicose, foi possível melhorar a produção dos compostos voláteis.

Para a produção de compostos aromáticos por *Ceratocystis fimbriata* e *Pachysolen tannophilus* o resíduo sólido (tratado termicamente em solução aquosa de 200g de casca de café por litro de água destilada durante 45 min), mostrou-se mais adequado do que a casca.

Não foi necessária a adição de solução salina ao resíduo da casca de café. Do ponto de vista nutricional isto provavelmente indica que o resíduo possui quantidade suficiente de sais para o desenvolvimento microbiano. Convém ressaltar que em todos os estudos feitos anteriormente com *Ceratocystis fimbriata* na produção de aromas por fermentação no estado sólido, de meios sintéticos ou de outros resíduos industriais, sempre houve a suplementação dos substratos (BRAMORSKI, 1997; CHRISTEN & RAIMBAULT, 1991; CHRISTEN et alli 1994 e 1997; SENEMAUD, 1988).

O resíduo possui redução de 27,5% na quantidade de sais em relação à casca. Contudo, quando este meio foi adicionado de solução salina apresentou produção de voláteis inferior aos meios sem adição, para ambos microorganismos. Isto provavelmente ocorre devido à elevada quantidade de sais presentes neste substrato (Tabela 6). Como na casca os microorganismos não se desenvolveram satisfatoriamente e tampouco no resíduo adicionado de solução salina, pode-se supor que este fator é limitante à produção de voláteis por estes microorganismos. Este não é o único parâmetro cuja concentração é diminuída durante a extração da casca para obtenção do resíduo; contudo, fatores normalmente limitantes do crescimento, como cafeína por exemplo, não foram analisadas no término da fermentação.

É interessante observar que, de maneira geral, as leveduras quando crescidas no meio líquido (extrato) produziram aromas que lembraram cerveja e vinho. Esta percepção

foi completamente diferente nos meios de cultivos sólidos, nos quais aromas frutais passaram a ser descritos (Tabela 10). Duas explicações podem ser exploradas:

- a primeira, abordada por GERVAIS (1990), quando estudou a influência da atividade de água na produção de aromas extracelulares avaliando o desenvolvimento *Trichoderma viride*. O autor levanta a possibilidade de que o aumento na produção de voláteis verificada com a diminuição na atividade de água do meio é função da pressão osmótica: quando a pressão externa aumenta as células têm que equilibrar seu interior para prevenir o estresse causado pela perda passiva de água, o que gera uma variação da permeabilidade celular, até um valor que iniba os sistemas enzimáticos.
- a segunda , existe a possibilidade da cinética em meio líquido ter seguido a rota fermentativa, ocasionada pela pouca difusão do oxigênio nos meios de cultivos líquidos.

Os aromas frutais reconhecidos nos meios de cultivo de *Pachysolen tannophilus* e *Ceratocystis fimbriata*, lembrando abacaxi, banana e maçã, foram identificados. Ficou caracterizado que a biosíntese de ésteres, como: isoamil acetato, etil acetato, isobutil acetato (aromas de banana), etil isobutirato e etil butirato (aroma de maçã e morango) entre outros, foi responsável por este aroma, mais alcoólico nos cultivos da levedura.

Segundo LATRASSE et alli (1987), a presença de ésteres nos meios de cultivo microbianos ocorre devido a um metabolismo de detoxificação do substrato, através do qual o microorganismo impede o acúmulo de compostos tóxicos, como ácidos de cadeia curta e álcoois. Em alguns gráficos de evolução dos voláteis individuais medidos no headspace dos cultivos de *Pachysolen tannophilus* foi possível verificar o aumento na concentração de ésteres no mesmo tempo em que começa a diminuir a quantidade de álcoois (Figuras 17 e 18) , fato que pode indicar esta detoxificação citada por LATRASSE.

Na FES do resíduo por *Ceratocystis fimbriata* a maior produção de voláteis foi conseguida sem adição de solução salina, na temperatura de 30°C e com a umidificação do suporte até sua máxima capacidade de absorção. As maiores produções de voláteis totais foram obtidas com adição de glicose variando entre 20 e 35%. O pH final dos meios de cultivo, próximos ao do resíduo sem correção, indicam que não há necessidade da correção deste parâmetro nos estudos posteriores.

Apesar da maior produção de voláteis totais ter sido atingida com adição de 20% de glicose os estudos não foram conclusivos e há necessidade de otimização deste parâmetro com valores intermediários, entre 15 e 35%, por exemplo. É interessante

perceber que o microorganismo suporta adições bastante elevadas de glicose, pois verificou-se crescimento/produção de voláteis no meio com concentrações de 45% de glicose.

No estudo da influência da adição de determinadas substâncias ao resíduo na produção dos voláteis por *Ceratocystis fimbriata* a adição de solução de 10 mMol de leucina aumentou a quantidade total dos voláteis produzidos em 58%, em relação ao mesmo meio sem adição deste aminoácido (de 5243 µmol eq. etanol/L gMS para 8286 µmol eq. etanol/L gMS). Este aumento também foi observado por CHRISTEN et alli (1997), mas não foi percebido nos estudos de BRAMORSKI (1997).

A adição da leucina ao meio também promoveu a síntese de novos compostos pelo fungo. Novos compostos passaram a ser encontrados no **headspace** dos meios de cultivo: 2-heptanona e etil-3-hexenoato. Outros compostos tiveram suas concentrações no aumentadas em relação ao meio sem adição de leucina: etanol, isopropanol, etil acetato, etil isobutirato, isobutil acetato, etil butirato e isoamil acetato. Estes mesmos voláteis foram identificados por outros autores (BRAMORSKI, 1997; CHRISTEN et alli, 1994 e 1997).

Mesmo sem que as condições para a produção de voláteis por *Ceratocystis fimbriata* tenham sido totalmente otimizadas, o resultado deste trabalho é animador. No resíduo de café com adição de leucina a produção de voláteis totais foi três vezes maior do que a melhor produção conseguida por outros autores (CHRISTEN et alli, 1997).

O melhor resultado conseguido por CHRISTEN et alli (1997) foi na FES do bagaço de mandioca com adição de uma solução de 167 mMol de leucina (valor 16,7 vezes maior do que o adicionado no nosso estudo). A produção total de voláteis neste meio, cujo resultado também foi obtido utilizando o modelo de GOMPERZ, foi de 2702,4 µmol eq. etanol/L gMS contra 8286 µmol eq. etanol/L gMS obtido no neste trabalho.

A adição de óleo de soja ao resíduo de casca de café não mostrou efeito positivo na produção total de voláteis por *C. fimbriata*. Diferentemente do que foi observado por outros autores (BRAMORSKI, 1997), o óleo de soja causou redução na diversidade e na quantidade dos voláteis produzidos. Especificamente no nosso caso o óleo pode não apresentar nenhum efeito positivo em razão do substrato já apresentar concentração lipídica na ordem de 1,2%.

O aroma frutal percebido nos meios de cultivo da levedura *Pachysolen tannophilus* teve sua composição identificada, sendo formado basicamente por álcoois e ésteres. A maior produção de voláteis totais pela FES do resíduo sólido de café com a levedura *Pachysolen tannophilus* foi atingida com adição de 35% de glicose, com o pH natural do substrato, na temperatura de 30°C, sem adição de solução salina ou de leucina/óleo de soja. A produção total de voláteis foi de 4948 µmol eq. etanol/L gMS, numa fermentação de 16 dias. Menores quantidades de glicose reduziram a variedade dos voláteis.

Os compostos identificados por cromatografia gasosa do **headspace** do resíduo simplesmente umedecido foram etanol (78%) e etil acetato; contudo, com a otimização das condições de crescimento outros compostos foram biosintetizados, sendo que a análise sensorial indicou aroma alcoólico com notas frutais, lembrando banana e abacaxi. Pela análise cromatográfica do meio com 35% de adição de glicose foram identificados além de etanol (79%) e de etil acetato: acetaldeído, isobutanol, isobutil acetato, isoamil acetato e etil-3-hexenoato. A formação de cada composto volátil parece indicar que a biosíntese de ésteres está relacionada com a detoxificação do meio de cultivo, da presença de certos álcoois.

Apesar da produção de voláteis pela levedura ter sido mais intensa no meio com adição de 35% de glicose em comparação àquele com 26%, a velocidade da produção foi duas vezes mais lenta. Isto provavelmente deve-se à baixa concentração de nitrogênio e à alta concentração de glicose. Isto pode ter ocorrido devido a dois fatores:

1. com a diminuição da atividade de água, ocasionada pelo aumento na concentração de glicose, o microorganismo demorou mais para se adaptar ao meio de cultivo. Conforme ocorre a multiplicação da levedura aumenta o consumo de açúcar, gerando um gradativo aumento na atividade de água do meio ou, ainda, promovendo a adaptação do microorganismo a esta concentração de glicose.
2. A maior concentração de nitrogênio nos meios fez com que o microorganismo gerasse biomassa mais rapidamente. Como determinados metabólitos, como o etanol, não são secundários e são sintetizados simultaneamente ao crescimento, quanto maior for a disponibilidade de nitrogênio, mais rapidamente ocorrerá a geração de biomassa e, consequentemente, a velocidade de produção de voláteis. Contudo, como estes meios têm menor disponibilidade de carbono, as fermentações são mais curtas.

A adição de leucina e óleo de soja nos meios de cultivo da levedura não contribuíram para aumentar a quantidade total dos voláteis produzidos, tendo inclusive diminuído o tempo total da fermentação; contudo, houve modificação na diversidade dos compostos no **headspace** dos cultivos.

A adição de leucina favoreceu a biosíntese de outros voláteis, tais como: álcool isopropílico, propil acetato, etil butirato e álcool isoamílico e aumentou a produção de isoamil acetato em 100%. Como estes compostos fazem parte do metabolismo deste aminoácido por microorganismos, *P. tannophilus* foi capaz de assimilar esta substância em meio sólido.

O aroma produzido pela levedura possuía composição mais alcoólica do que o produzido pelo fungo filamentoso, devido a maior presença de etanol e isobutanol na sua composição .Os tempos totais de fermentação foram: 384 h para a levedura e 480 para o fungo filamentoso e as velocidades de produção de voláteis foi 0,007/h e 0,009/h, respectivamente. Isto indica que apesar da facilidade dos fungos filamentosos em se desenvolverem nos substratos sólidos neste caso houve pequena diferença na velocidade de produção de aromas dos dois.

Os resultados obtidos demonstram as potencialidades do uso dos resíduos sólidos da Agroindústria do café na produção de compostos voláteis aromáticos por microorganismos. Estudos complementares serão realizados para ampliar os conhecimentos fundamentais e tecnológicos a nível de recuperação das biomoléculas assim como em escala piloto antes de se vislumbrar uma aplicação em escala industrial.

Para continuidade deste trabalho sugere-se:

- A otimização da adição de glicose em colunas de fermentação e análise da respirometria, para ambos microorganismos;
- A adição de outros aminoácidos conhecidos como precursores de aromas no meio de cultivo, como valina por exemplo, e otimização da concentração de leucina no estudo com *C. fimbriata*;
- A recuperação dos aromas, em polímeros adsorventes;
- A caracterização do sistema enzimático da levedura *Pachysolen tannophilus* em meios líquido e sólido;
- O estudo da adição de outros resíduos industriais ricos em açúcares na casca de café e o efeito na produção dos aromas.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARMSTRONG, D.W.; GILLIES,B.; YAMAZAKI,H. Natural Flavors Produced by Biotechnological Processing in *Flavour Chemistry: Trends and Developments* (ACS 388): 105-119, 1989.
2. BARBOSA, M.F.S; LEE,H; COLLINS-THOMPSON, D.L. Additive effects of alcohols, their acidic by products and temperature on the yeast *Pachysolen tannophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 56(2): 545- 550, 1990.
3. BICHO,P.A. ;CUNNINGHAM, J.D.; LEE,H. Differential fructose effect in *Pachysolen tannophilus* and *Pichia stipis*. *FEMS- Microbiology Letters*; 57 (3): 323 – 327, 1989.
4. BICHO,P.A. ; RUNNALS, P.L.; CUNNINGHAM, J.D.; LEE,H. Induction of xylose reductase and xilitol dehydrogenase activities in *Pachysolen tannophilus* and *Pichia stipitis* on mixed sugars. *Applied and Environmental Microbiology*. 54(1): 50-54, 1988.
5. BRAHAM,J.E.; BRESSANI,R. *Pulpa de café: composición tecnologia y utilización*. Instituto de Nutricion de Centro América y Panamá, Bogotá, 1978. p.1-27.
6. BRAMORSKI, A. *Caracterização do crescimento e da produção de metabólitos voláteis por fungos filamentosos cultivados sobre substratos agro-industriais*. Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre, ao Curso de Pós-Graduação em Tecnologia Química, UFPR, 1997.
7. BRAMORSKI, A.; CHRISTEN, P.; RAMIREZ, M.; SOCCOL, C.R.; REVAH, S. Production of volatile compounds by the fungus *Rhizopus oryzae* during solid state cultivation on tropical agro-industrial substrates. *Biotechnology Letters*, 20 (4): 359-362, 1998.
8. CHRISTEN,P.; LOPEZ-MUNGUA,A. Enzymes and food flavor – a review. *Food Biotechnology*, 8(2): 167-190, 1994.
9. CHRISTEN, P.; MEZA,J.C.; REVAH,S. Fruity aroma production in solid state fermentation by *Ceratocystis fimbriata*: influence of the substrate type and the presence of precursors. *Mycological Research*. 101 (8):911-919, 1997.
10. CHRISTEN,P.; RAIMBAULT,M. Optimization of culture medium for aroma production by *Ceratocystis fimbriata*. *Biotechnology Letters*; 13 (7): 521-526, 1991.
11. CHRISTEN, P.; VILLEGAS,E.; REVAH,S. Growth and aroma production by *Ceratocystis fimbriata*. *Biotechnology Letters*; 16 (11): 1183-1188, 1994.
12. COLLINS,R.P.; HALIM,A. Characterization of the major aroma constituent of the fungus *Trichoderma viride*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 20(2): 437-438, 1972.
13. COLLINS, R.P.; MORGAN, M. E. Identity of fruit-like aroma substances synthesized by endoconidial-forming fungi. *Phytopathology*; 52: 407-409, 1961.

14. DAVIS, R; FALKINER, E.A. ; WILKINSON, J.F.; PEEL, J.L. Esters formation by yeasts: ethyl acetate formation by *Hansenula* species. *Biochemistry Journal*; 49: 58-61, 1951.
15. DEGORGE-DUMAS, J.R.; MORE,J.; GOURSAUD, J.Y. Production d'arômes par les microorganismes: les potentialités. *Industries Alimentaires et Agricoles*; 101(1/2): 11-15, 1984.
16. DRAWERT,F.; BARTON,H. Biosynthese of flavor compounds by microorganisms III- production of monoterpenes by the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Agricultural and. Food Chemistry*; 26(3): 765-766, 1978.
17. FENNEMA, O.R. *Quimica de los alimentos*. Editorial Acribia, Zaragoza, 1993.
18. FILHO, A. A.; FIGUEIREDO, R.; FRANZANI, P.; LIMA, F. B.; BACCET, M. A. Estudo de Cadeias Produtivas do Agronegócio Paranaense: Café. SECRETARIA DO ESTADO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO, JUL/97.
19. FURLAN,S.A.; BOUILLOUD,P.; CASTRO, H.F. Influence of oxigen on ethanol and xilitol production by xilose fermenting yeasts. *Process Biochemistry*, 29 (8): 657-662, 1994.
20. GATFIELD, I.L. Production of flavor and aroma compounds by biotechnology. *Food Technology*. 42 (10): 110-120, 1988.
21. GERVAIS, P. Water activity: a fundamental parameter af aroma production by microorganisms. *Applied Microbiology Biotechnology*; 33: 72-75, 1990.
22. GERVAIS, P.; BELIN, J.M.; GRAJEK, W.; SARRETE, M. Influence of water activity on aroma production by *Trichoderma viride* TS growing on a solid substrate. *Journal of Fermentation Technology*; 66 (4): 403-407 , 1988.
23. GROSS,B.; ASTHER, M. Arômes de basidiomycetes: caractéristiques, analyses et productions. *Sciences des Aliments*; 9: 427 – 454, 1989.
24. HUBBALL, J. A.; COLLINS, R. P. A study of factors affecting the synthesis of terpenes by *Ceratocystis variospora*. *Mycologia*, 70: 117-129, 1978.
25. INOUE, Y; FUKUDA,K; WAKAI,Y; SUDSAI,T; KIMURA,A. Ester formation by a yeast *Hansenula mrakii* IFO 0895: Contribution of esterase for iso- amil acetate production in sake brewing. *Lebensm.-Wiss. U.-Techol.* 27: 189-193, 1994.
26. JANSSENS, L; De-POORTER, H.L; DEMEY, L; VANDAMME, E.J; SCAHMP, N.M. Fruity flavors by fermentation. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent.* V. 53(4b), 1988.
27. JANSSENS, L; De-POORTER, H.L; VANDAMME, E.J; SCAHMP, N.M. Production of flavours by the yeast *Hansenula mrakii*. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent.* 52(4), 1987.
28. JANSSENS, L; De-POORTER, H.L; VANDAMME, E.J; SCAHMP, N.M. Production of flavors by microorganisms. *Process Biochemistry*. 27: 195-215, 1992.

29. KRUSE,B. & SCHUEGERL,K. Investigation of ethanol formation by *Pachysolen tannophilus* from xilose and glicose-xilose co-substrates. *Process Biochemistry*; 31 (4): 389 – 408, 1996.
30. LANZA,E.; KO,K.H.; PALMER,J.K. Aroma production by cultures of *Ceratocystis moniliiformis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 24 (6):1247-1250, 1976.
31. LATRASSE, A.; DAMERON, P.; HASSANI, M; STARON, T. Production d'un arôme fruité par *Geotrichum candidum*. *Sciences des Alimentes*, 7: 637 – 645, 1987.
32. LATRASSE,A.; DEGORGE-DUMAS,J.R.; LEVEAU,J.Y. Production d'arômes par les microorganismes. *Sciences des Aliments*. 5: 1 – 26, 1985.
33. LEE, H. Reversible inactivation of D-xilose utilization by D-glucose in the pentose-fermentating yeast *Pachysolen tannophilus*. *FEMS- Microbiology Letters*, 92(1): 1-4, 1992.
34. LEE, S-L & CHOU, C-C. Growth and production of γ -decalactone and Cis-6-Dodecen-4-Olide by *Sporobolomyces odoratus* in the presence of fatty acids and oils. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 78 (1): 114-116, 1994.
35. MACEDO, G.A.; PASTORE,G.M. Lipases microbianas na produção de ésteres formadores de aroma. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 17(2): 115-119, maio ,1997.
36. MAGA, J.A. Lactones in Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, september, 1976. p.1-56.
37. MARTINEZ-CARRERA, D.; MORALES,P.; SOBAL,M. Cultivation of several mexican strains of *Pleurotus ostreatus* on coffee pulp and barley straw. *Rev. Mexican. Micol.* 4 (10): 153-160, 1988.
38. MASSON, M.L.; SOCCOL,C.R.; VASSÃO,E.; VENTURA,I.; PINHEIRO, L.I.; SCHUTZ,J.G.; MATOS,M.E.; FONTOURA, P.S.G. Tecnologia do café (Parte I). *Boletim do CEPPA*. v.2 (1): 1-16, 1984^a.
39. MASSON, M.L.; SOCCOL,C.R.; VASSÃO,E.; VENTURA,I.; PINHEIRO, L.I.; SCHUTZ,J.G.; MATOS,M.E.; FONTOURA, P.S.G. Tecnologia do café (Parte II). *Boletim do CEPPA*. v.3(1): 13-20, 1984^b.
40. MASSON, M.L.; SOCCOL,C.R.; VASSÃO,E.; VENTURA,I.; PINHEIRO, L.I.; SCHUTZ,J.G.; MATOS,M.E.; FONTOURA, P.S.G. Tecnologia do café (Parte III). *Boletim do CEPPA*. v.3 (2): 1-20, 1985.
41. MERAZ,M.; SHIRAI,K.; LARRALDE,P.; REVAH,S. Studies on bacterial acidification process of cassava (*Manihot esculenta*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 60: 457-463, 1992.
42. MONTEIRO, C.L.B. *Técnicas de Avaliação Sensorial*. 2 ed. Universidade Federal do Paraná, Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos, Curitiba, 1984. p.1-19.
43. OHLOFF,G. Recents developments in the field of naturally occuring aroma components. p.431-527, 1977.

44. OMELIANSKI, V.L. Aroma producing microorganisms. *Journal Bacteriology*. 8: 393-419, 1923.
45. PARK, Y. K.; ZENIN, C.T.; UEDA, S.; MARTINS, C. O.; NETO, J.P.M. Microflora in *Beiju* and their biochemical characteristics. *Journal of the Fermentation Technology*, 60(1): 1-4, 1982.
46. PASTORE, G.M.; PARK, Y.K. Production of fruity aroma by *Neurospora* sp from beiju. *Mycological Research*. 98 (11): 1300 – 1302, 1994.
47. PEREGO,P.; CONVERTI,A.; PALAZZI,E.; BORGHI,M.; FERRAIOLI, G. Fermentation of hardwood hemicelulose hydrolysate by *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae*, *Pichia stipitis*. *Journal of Industrial Microbiology*. 6(3): 157-164, 1990.
48. PRAPULLA, S.G.; KARANTH, N.G.; ENGEL, K.H.; TRESS,R. Production of 6-pentyl-alpha-pyrone by *Trichoderma viride*. *Flavour and Fragrance Journal*, 7(4): 231 – 234, 1992.
49. PREGNOLATO, W.; PREGNOLATO, N.P. *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. Governo do Estado de São Paulo, Secretaria de Estado da Saúde. Instituto Adolfo Lutz, 1985.
50. RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid state fermentation. In: *International Training Course on Solid State Fermentation (FMS 97)*. RAIMBAULT, M.; SOCCOL, C.R.; CHUZEL,G. (eds) n.1: 1-22. ORSTOM, Montpellier, 1998.
51. RICHARD,H & MULTON, J.L. *Les arômes alimentaires*. Collection Sciences & Techniques Agro-Alimentaires. Tec&Doc-Lavoisier, Paris, 1992. 436p.
52. ROEBUCK, K.; BRUNDIN,A.; JOHNS,M. Response surface optimization of temperature and pH for the growth of *Pachysolen tannophilus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 17 (1): 75-78, 1995.
53. ROUSSOS,S.; AQUIAHUATL,M.A.; TREJO-HERNÁNDEZ, M.R.; PERRAUD,I.G.; FAVELA,E.; RAMAKRISHNA,M.; RAIMBAULT,M.; VINIEGRA-GONZALEZ,G. Biotechnological management of coffee pulp: isolation, screening, characterization, selection of caffeine-degrading fungi and natural microflora present in coffee pulp and husk. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 42 (5): 756-762, 1995.
54. SAUCEDO-CASTAÑEDA, G. Yeast cultivation in SSF: control of metabolism of *Schwanniomyces castellii* during solid cultivation of starch. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 36: 47-61, 1992.
55. SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO DO PARANÁ – *Acompanhamento da Situação Agropecuária do Paraná*: Departamento de Economia Rural. JUN/JUL 96.
56. SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO DO PARANÁ – *Desenvolvimento do Agronegócio no Paraná*. JUL/97

57. SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO DO PARANÁ – *Acompanhamento da Situação Agropecuária do Paraná*: Departamento de Economia Rural. V.24 n05 maio /98.
58. SENEMAUD,C. *Les champignons filamenteux producteurs d' arômes fruités.* Etudes de faisabilité sur substrats agro-industriels. Ph.D. Thesis, Université de Bourgogne. France, 1988.
59. SERRANO-CARREON, L.; HATHOUT,Y.; BENSOUSSAN, M.; BELIN, J.M. Metabolism of linoleic acid or mevalonate and 6-pentyl-alpha-pyrone biosynthesis by *Trichoderma viride* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(9): 2945 – 2950, 1993.
60. SHULLER, M.L.; KARGI, F. Major metabolic pathway. In *Bioprocess engineering: basic concepts*. Prentice Hall, New Jersey, 1992. p.128-147.
61. SILVA,P. O mercado do café no Brasil. *Alimentos & tecnologia*. Ano X (64), 1996.
62. SOCCOL, C.R. *Contribuição ao estudo da fermentação no estado sólido em relação com a produção de ácido fumárico: biotransformação de resíduo sólido de mandioca por Rhizopus e basidiomicetos do gênero Pleurotus*. Tese de Professor Titular da Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1994. 228 p.
63. SPINNLER,H.E. & DIJIAN,A. Bioconversion of aminoacids into flavouring alcohols and esters by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35: 264- 269, 1991.
64. TAUK, S.M. Effect of concentration of total sugar and aeration in the culture media. *Rev. Microbiol.* v.17(3): 254-263, 1986.
65. TRESSL, R.; JENNINGS, W. G. Production of volatile compounds in the ripening banana. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 20 (2): 189-192, 1972.
66. VERVACK, W. *Analyse des Aliments: Méthodes courantes d'analyses*. Laboratoire de Biochimie de la Nutricon. UCL, Louvain la Neuve, France. 1973
67. WANG,G.S. & WANG, L.H. Improvement on ethanol tolerance of xylose-fermenting yeast by protoplast fusion. *Taiwan-Sugar*, 37(3): 10-13, 1990.
68. WELSH,F.W; MURRAY, W.D; WILLIANS, R.E. Microbiological and enzymatic production of flavor and fragrance chemicals. *Critical Reviews in Biotechnology*. 9(2): 105-169, 1989.
69. XU,J.; TAYLOR, K.B. Characterization of ethanol production from xylose and xylitol by a cell-free *Pachysolen tannophilus* system. *Applied and Environmental Microbiology* 59 (1): 231-235, 1993.
70. YAMAUCHI, H.; AKITA, O.; OBATA, T.; AMACHI, T.; HARA, S.; YOSHIZAWA, K. Production and application of a fruity odor in solid-state culture of *Neurospora* sp using pregelatinized polish rice. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(11): 2881-2886, 1989.

71. YAMAUCHI, H.; OBATA, T.; AMACHI, T.; HARA, S. Production of characteristic odors by *Neurospora*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55(12): 3115-3116, 1991.
72. YONG, F.M.; WONG, H.A.; LIM, G. Effect of nitrogen source on aroma production by *Trichoderma viride*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 22: 146-147. 1985.
73. YONG, F.M; LIM,G. Effect of carbon source on aroma production by *Trichoderma viride*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2 (4): 483-488, 1986.
74. YOSHIZAWA, K.; YAMAUCHI, H.; HASUO, T.; AKITA, O.; HARA, S. Production of a fruity odor by *Neurospora* sp. *Agricultural and Biological Chemistry*, 52(8): 2129-2130, 1988.
75. ZEPPA, G.; ALLEGGRONE,G.; BARBENI,M.; GUARDA, P.A. Variability in the production of volatile metabolites by *Trichoderma viride*. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia*. 40(2): 171-176, 1990.