

# PRODUÇÃO DE AROMAS POR *Ceratocystis fimbriata* EM FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO RESÍDUOS DA AGROINDÚSTRIA DO CAFÉ COMO SUBSTRATOS

ADRIANE, B.P.M.<sup>1</sup>; SOCCOL, C.R.<sup>1\*</sup> e FREITAS, R.J.S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Processos Biotecnológicos; <sup>2</sup> Laboratório de Química Analítica Aplicada Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná (UFPR), CP 19011, CEP 81531-970 Curitiba-PR; \* <soccol@engquim.ufpr.br>

**RESUMO:** Neste trabalho, duas diferentes cepas de *Ceratocystis fimbriata* foram testadas para a produção de aromas frutais em fermentação no estado sólido (FES), utilizando como substratos casca e polpa de café, suplementados com glicose. Os experimentos foram realizados em frascos erlenmeyer de 250 mL. As condições experimentais foram: umidade inicial de 70%, adição de 20% de glicose e pH 6,0. Os frascos foram cobertos com gaze e a aeração ocorreu por difusão passiva. A análise do “headspace” da cultura foi feita por cromatografia gasosa e 12 compostos foram produzidos utilizando a casca de café. A análise respirométrica foi realizada para o acompanhamento do crescimento do microrganismo, pela determinação do dióxido de carbono produzido. A produção de ésteres caracterizou o aroma frutal da cultura. A concentração máxima de voláteis totais foi alcançada após 72 horas de cultivo em casca de café ( $28 \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{g}^{-1}$ ). Os principais compostos produzidos foram acetato de etila, etanol e acetaldeído, representando 84,7, 7,6 e 2,0% dos voláteis totais, respectivamente.

**Palavras-chave:** *Ceratocystis fimbriata*, resíduos, café, fermentação no estado sólido, aroma.

## PRODUCTION OF AROMA BY *Ceratocystis fimbriata* ON SEMI - SOLID STATE FERMENTATION USING RESIDUES FROM COFFEE AGROINDUSTRY AS SUBSTRATES.

**ABSTRACT:** The ability of two different strains of *C. fimbriata* for production of fruity aroma in solid state fermentation (SSF) was tested on coffee pulp and coffee husk complemented with glucose as substrates. Experiments were carried out in 250 mL Erlenmeyer flasks. Experimental conditions were: 70% of initial water content, 20% of glucose addition and pH 6.0. Aeration was made by passive diffusion through the gauze covering the flasks. Headspace analysis of the culture by gas chromatography (GC) showed that 12 compounds were produced with coffee husk. Esters production characterized the fruity

aroma of the culture. Maximum total volatiles (TV) concentration was reached after 72 h with coffee husk as substrate ( $28 \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{g}^{-1}$ ). Ethyl acetate, ethanol and acetaldehyde were the major compounds produced, representing 84.7%, 7.6% and 2.0% of TV, respectively. A pre-treatment with heat (100 °C/ 40 min) of substrates did not improve TV production.–Respirometry analysis was used to determine the growth of the culture by measuring carbon dioxide produced. Results showed that the CO<sub>2</sub> production follows the TV production.

**Key words:** *Ceratocystis fimbriata*, coffee residues, solid-state fermentation, aroma.

## INTRODUÇÃO

Os resíduos tropicais agroindustriais, como casca e polpa de café, bagaço de mandioca e de cana-de-açúcar, são gerados em grandes quantidades durante o processamento e sua disposição causa sérios problemas ambientais. O aproveitamento desses resíduos como substrato (fonte de carbono) vem sendo estudado para a produção de vários metabólitos de origem biotecnológica de interesse industrial [1]. A fermentação no estado sólido (FES) tem sido usada para a produção de aromas por leveduras e fungos, como *Neurospora* sp. [2], *Kluyveromyces marxianus* [3], *Trichoderma viride* [4], utilizando como substratos arroz pré-gelatinizado, bagaço de mandioca e ágar, respectivamente. A produção intensa de aromas frutais por *Ceratocystis fimbriata* em FES em farelo de trigo, bagaço de mandioca e de cana-de-açúcar foi explorada por Christen et al. [5]. Bramorski et al. [6] estudaram a produção de voláteis por *Ceratocystis fimbriata* em resíduos agroindustriais.

O objetivo deste trabalho foi a produção de aromas com características frutais por *Ceratocystis fimbriata* em fermentação no estado sólido, utilizando como substratos casca e polpa de café.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Microrganismo e preparo do inóculo:** Duas cepas de *Ceratocystis fimbriata* (CBS 374.83; CBS 146.53) foram usadas neste estudo. Os microrganismos foram mantidos em PDA (potato dextrose agar) e mantidos sob refrigeração a 4°C. Preparou-se uma suspensão de esporos a partir do cultivo do microrganismo em frascos erlenmeyer de 250 ml, durante cinco dias a 30 °C. Os esporos foram coletados com água destilada estéril contendo gotas de Tween 80.

**Preparo dos substratos:** Os resíduos de café foram secos em estufa com circulação de ar a 60° C por 24 horas. Os substratos secos foram moídos e classificados granulometricamente entre 0,82 e 2,0 mm. De acordo com Soares et al. [7] e com o objetivo de se obter um substrato mais adequado para produção de aromas pelo microrganismo, realizou-se um pré-tratamento térmico a 100 °C durante 40 minutos. Os compostos inibitórios presentes na casca e na polpa de café foram, provavelmente, eliminados no tratamento térmico.

**Fermentação:** A FES foi realizada em frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 15 g de substrato suplementado com 20% de glicose. Após o ajuste do pH em 6,0 e a umidade inicial em 70%, os substratos foram esterilizados a 121° C por 15 min e inoculados com  $1 \times 10^7$  esporos/ g de matéria seca inicial. Os frascos foram incubados a 30 °C. Todos os experimentos foram feitos em duplicatas.

**Análises:** Os compostos aromáticos produzidos no “headspace” do frasco de cultivo foram analisados em cromatógrafo de gás HP 6890 GC, equipado com detector de ionização de chama a 230°C. As condições operacionais foram: coluna capilar HP- 5 com 30 x 0,32 mm, programação de temperatura do forno de 40°C a 150°C a uma taxa de 20°C/min e temperatura do injetor de 230° C. Os compostos voláteis totais e individuais foram expressos em  $\mu\text{mol}$  por litro de “headspace”, em equivalente de etanol. Os compostos foram identificados por comparação de tempos de retenção com compostos-padrões. A análise do “headspace” das culturas por cromatografia gasosa utilizando-se equipamento com detector de condutividade térmica foi utilizada para quantificar a taxa de consumo de oxigênio e de dióxido de carbono produzido. A quantificação desses compostos é freqüentemente utilizada para uma estimativa indireta da biomassa, sendo importantes parâmetros para o escalonamento de processos de FES [8].

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos por Soares et al.[7], as melhores condições para maximizar a produção de voláteis produzidos por *C. fimbriata* em casca de café foram: pH 6,0, 70% de umidade inicial, 30°C, taxa de inóculo de  $1 \times 10^7$  esporos/g de matéria seca e 20% de adição de glicose. As mesmas condições foram aplicadas aos experimentos com polpa de café.

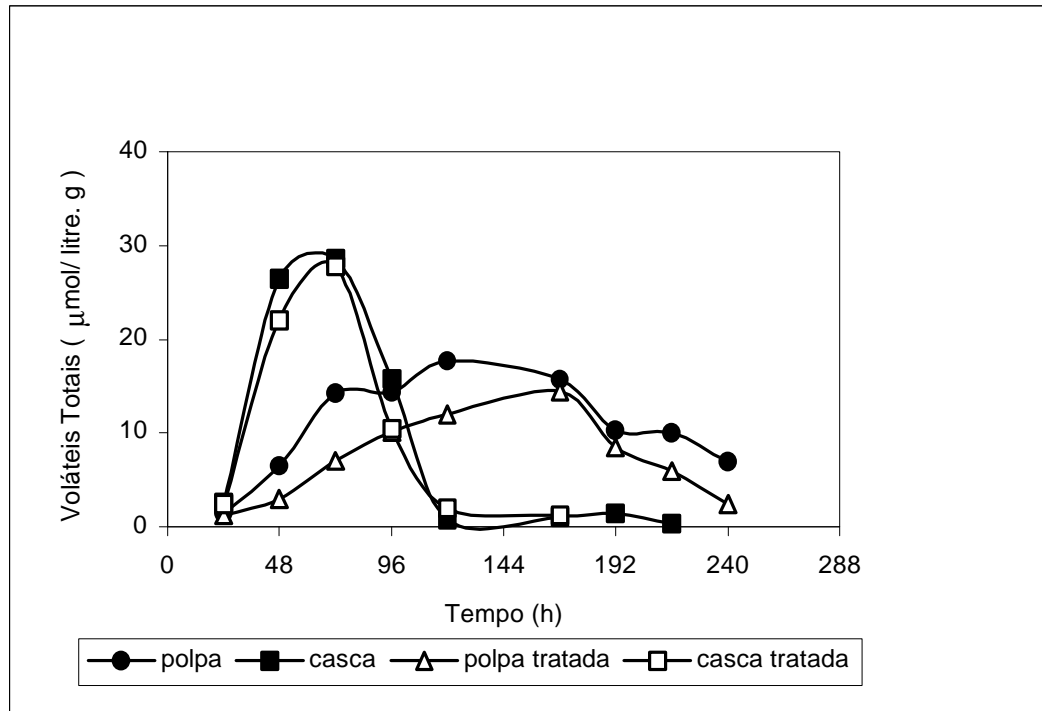
## Produção de Voláteis Totais

Na Figura 1, a concentração de máxima de voláteis totais foi alcançada em 48 horas com *Ceratocystis fimbriata* CBS 374.83 cultivado em casca de café sem tratamento térmico. O pré-tratamento térmico (100 °C/ 40 min) dos substratos não influenciou a produção de voláteis. Treze compostos foram produzidos em ambos os substratos. Acetato de etila, etanol e acetaldeído foram os principais compostos produzidos. Os demais compostos incluem: propionato de etila e acetato de propila, isobutirato de etila, acetato de butila. Quatro compostos não foram identificados. A Tabela 1 mostra a porcentagem individual máxima de cada composto produzido por *Ceratocystis fimbriata* CBS 374.83 nos diferentes substratos, acumulados no “headspace” do frasco de cultura. Os experimentos com *Ceratocystis fimbriata* CBS 146.53 (Figura 2) apresentaram menor produção de voláteis, quando comparados com *C. fimbriata* CBS 374.83, mostrando diferenças na síntese de compostos voláteis por estas cepas. A cultura de *Ceratocystis fimbriata* CBS 146.53 em casca de café apresentou maior fase “lag” que a observada para a outra cepa. A polpa de café e a polpa tratada termicamente não apresentaram bons resultados quanto à produção de voláteis.

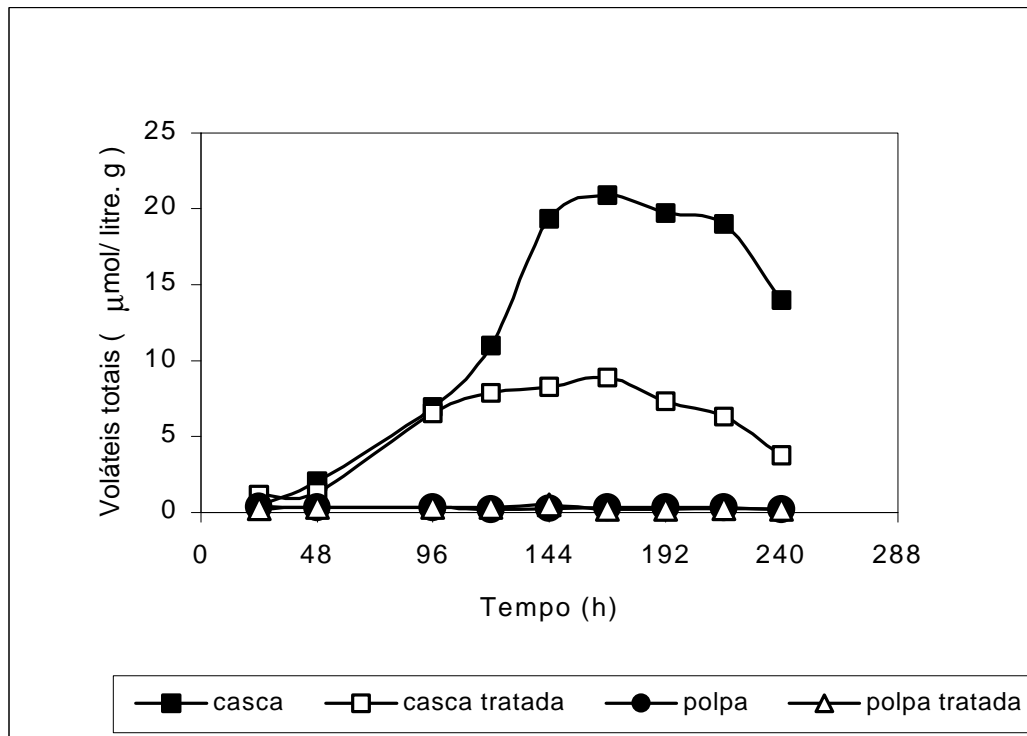
A característica frutal dos aromas produzidos pela cultura foi atribuída aos ésteres. Acredita-se que a concentração de voláteis no “headspace” da cultura seja afetada por muitos fatores, principalmente a natureza e a concentração do meio de fermentação da pressão de vapor dos componentes.

## Análise Respirométrica

A máxima atividade respirométrica, representada pelo CO<sub>2</sub> produzido e oxigênio consumido (Figura 3), foi observada em 48 horas de fermentação. A concentração máxima de voláteis totais foi detectada a partir de 48 horas. Os resultados mostram que a produção de voláteis foi dependente do crescimento do microrganismo. O microrganismo utilizou a fonte de carbono e oxigênio para seu crescimento, e a máxima produção de voláteis ocorreu imediatamente antes ou após o máximo crescimento de biomassa. Oxigênio e substrato foram utilizados pelo fungo não somente na produção de biomassa e CO<sub>2</sub>, mas na produção de metabólitos (compostos voláteis). Após 48 horas de fermentação, a produção de CO<sub>2</sub> diminuiu. Bramorski et al. [6], utilizando a produção de CO<sub>2</sub> como indicador do crescimento, também observaram correlação entre o crescimento de *C. fimbriata* em diferentes meios e a produção de compostos voláteis, mostrando que a máxima produção de voláteis sempre ocorria algumas horas ou após a máxima atividade respirométrica.



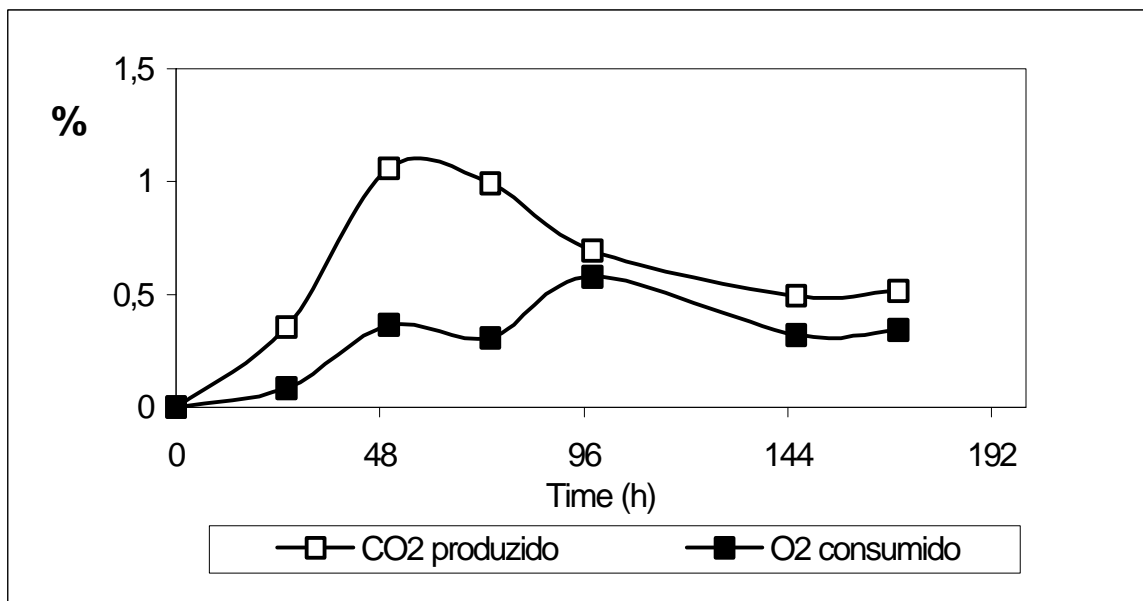
**Figura 1** - Evolução de compostos voláteis totais para experimentos com CBS 374.83 em diferentes substratos.



**Figura 2** - Evolução de compostos voláteis totais para experimentos com CBS 146.53 em diferentes substratos.

**Tabela 1** - Produção de compostos voláteis por *Ceratocystis fimbriata* CBS 374.83 em diferentes substratos. Valores representados em porcentagem de voláteis totais

Substrato Composto	Casca de café	Casca de café tratada	Polpa de café	Polpa de café tratada
Acetaldeído	2,0	0,6	2,1	0,6
Etanol	7,6	1,9	20,0	2,0
A	0,3	0,6	1,4	1,8
B	0,3	0,5	0,2	2,0
Acetato de etila	84,7	92,9	69,6	75,8
Propionato de etila	1,6	1,1	0,8	1,0
Acetato de propila	0,4	0,2	0,6	0,2
Acetato de isobutila	0,8	0,9	0,5	0,8
Isobutirato de etila	0,8	0,8	0,6	0,7
Butirato de etila	0,4	0,5	0,3	0,4
C	0,3	0	0	0
D	0,8	0	3,9	14,7



**Figura 3** - Produção de dióxido de carbono (%) e oxigênio consumido (%) por *Ceratocystis fimbriata* CBS 374.83 cultivado em casca de café.

## CONCLUSÕES

A casca de café foi considerada um substrato adequado à produção de aromas por *C. fimbriata*. A análise do “headspace” dos frascos de cultura por cromatografia gasosa detectou 12 compostos. Os compostos predominantes foram acetato de etila, etanol e acetaldeído. Não foi observada nenhuma influência do tratamento térmico dos substratos em relação à produção de aromas. Foi observada correlação entre o crescimento do microrganismo e a produção de voláteis”.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDEY, A. AND SOCCOL, C. R. (1998), Bioconversion of biomass: a case study of lignocellulosic bioconversions in solid state fermentation. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, 41, 379-390
- PASTORE, G. M., PARK, Y. K. AND MIN, D. B. (1994), Production of a fruity aroma by *Neurospora* from beiju. **Mycol. Res.**, 98, 25-35
- MEDEIROS, A.B.P., PANDEY, A., FREITAS, R.J.S., CHRISTEN, P. AND SOCCOL, C.R. (2000), Optimization of the production of aroma compounds by *Kluyveromyces marxianus* in solid state fermentation using factorial design and response surface methodology. **Biochem. Eng. J.**, 6, 33-39.
- GERVAIS, P. AND SARRETTE, M. (1990), Influence of age of mycelia and water activity on aroma production by *Trichoderma viride*. **J. Ferment. Bioeng.**, 69, 46-50
- CHRISTEN, P., MEZA, J. C. AND REVAH, S. (1997), Fruity aroma production in solid state fermentation by *Ceratocystis fimbriata*: influence of the substrate type and the presence of precursors. **Mycol. Res.**, 101, 911-919
- BRAMORSKI, A., SOCCOL, C. R., CHRISTEN, P. AND REVAH, S. (1998b), Fruity aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in solid cultures from agro-industrial wastes. **Rev. Microbiol.**, 28, 208-212
- SOARES, M., CHRISTEN, P., PANDEY, A., SOCCOL, C. R. (2000), Fruity flavour production by *Ceratocystis imbriaata* grown on coffee husk in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, 35, 857 – 861.

SAUCEDO-CASTAÑEDA, G. TREJO-HERNÁNDEZ, M. R., LONSANE, B. K., NAVARRO, J. M., ROUSSOS, S., DUFOUR, D., RAIMBAULT, M. (1994), On-line automated monitoring and control systems for CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> aerobic and anaerobic solid state fermentations. **Process Biochm.**, 29, 13-24.