

Produção de aroma frutal por *Neurospora* sp. em resíduos agroindustriais

MARINA B. CRESCITELLI¹, RAQUEL SZABO², HUGO A. L. DE SOUZA³, GLÁUCIA M. PASTORE⁴, DANIELE S. DE CARVALHO⁵

¹ Graduanda em Engenharia de Biosistemas, Bolsista PIBIFSP, IFSP, Câmpus Avaré, marina.b.crescitelli@gmail.com

² Graduanda em Licenciatura em Ciências Biológicas, IFSP, Câmpus Avaré

³ Professor colaborador IFSP-Câmpus Avaré

⁴ Professora colaboradora FEA-UNICAMP

⁵ Professora Orientadora IFSP-Câmpus Avaré

Área de conhecimento (Tabela CNPq): 1.12.02. 02-8 Microbiologia Industrial e de fermentação

RESUMO: Aromas naturais são aqueles obtidos por via enzimática, microbiológica ou extração física. Dessa forma o uso de processo fermentativo para obtenção de bioaroma se torna interessante visto a crescente demanda dos consumidores por alimentos mais saudáveis. A utilização de resíduos agroindustriais na produção de aromas possui vantagens do ponto de vista da gestão de resíduos bem como diminuição de custos de produção. O presente estudo teve como objetivo estudar uma linhagem de *Neurospora* sp. na produção de aroma frutal utilizando resíduos agroindustriais como meio de cultura na etapa fermentativa a fim de se obter hexanoato de etila, produto de alto valor agregado. Foi realizada a etapa de pré-inoculo e a biomassa obtida foi transferida para os substratos (bagaço de malte, bagaço de cana-de-açúcar e película de café) em concentrações de 5, 10 e 15%. A fermentação foi conduzida a 30°C a 200rpm. Foram coletados 5 mL de amostra após 24, 48 e 72 horas, as quais foram submetidas ao processo de extração por solvente e analisada em sistema cromatógrafo gasoso acoplado em um espectrômetro de massas (CG/MS). Nos meios bagaço de malte e bagaço de cana-de-açúcar houve produção do composto hexanoato de etila, identificado pela comparação com o padrão analítico.

PALAVRAS-CHAVE: Bioaroma; hexanoato de etila; resíduo; agroindustrial; biotecnologia.

Production of fruity flavor by *Neurospora* sp. using agro-industrial waste

ABSTRACT: Natural flavors are substances obtained by enzymatic, microbiologic way or by physical extraction. Thus, fermentative processes on bioaroma's obtaining gets interesting in the point of view of the growing demand for healthy food. The use of agro-industrial waste to produce bioaromas has many advantages in the point of view of the agro-industrial waste management as well as decrease the production costs. This main goal of this study the utilization of *Neurospora* sp. to produce fruity flavor using agro-industrial waste as a media for cultivation during the fermentative step trying to produce ethyl hexanoate, high earned value product. The microorganism was pre inoculated and the biomass obtained was transferred to agro-industrial was substrates (malt bagasse, sugarcane bagasse and coffee husk) on concentrations of 5, 10 e 15%. The fermentation was made under conditions of 30°C in 200 rpm. After the fermentation, 5 mL of fermented extract was collected after 24, 48 and 72 hours wich was submitted to extraction process by solvent and analyzed in a gas chromatograph attached to a mass spectrometer (CG/MS). In a media for cultivation malt waste, malt extract and sugarcane waste there was production of the ethyl hexanoate, identified by comparing to the analytical standard.

KEYWORDS: Bioflavors; ethyl hexanoate; agro-industrial; waste; biotechnology.

INTRODUÇÃO

Segundo a Resolução nº 12, de 17/01/2007 da ANVISA, aromas são substâncias ou misturas de substâncias com propriedades odoríferas e ou sápidas, capazes de conferir ou intensificar o aroma e

ou sabor dos alimentos. Concomitantemente a isso, a utilização de resíduos agroindustriais na produção de bioaromas é considerada uma boa estratégia pois reduz as despesas financeiras na adequação da responsabilidade ambiental ao padrão atual e agrega valor àquilo considerado inutilizável (MIRABELLA et al., 2014).

De acordo com Leffingwell & Associates, a venda global de aromas e fragrâncias em 2014 foi de aproximadamente US\$ 24.9 bilhões, com taxa de crescimento esperada de 5 a 6% por ano (UBIC Consulting, 2014). Segundo Aditivos e Ingredientes (2019) estima-se que o mercado global atinja US\$ 191,973 milhões em 2023, crescendo a uma taxa de 13,7% de 2017 a 2023.

A produção de hexanoato de etila, éster que confere aroma frutal descrita por alguns autores com notas de morango, banana, pêssego, abacaxi, butiá e pêra por *Neurospora* sp. foi explorado por diferentes grupos de pesquisa, destacando-se a produção através do uso do meio de cultura extrato de malte (BRIGIDO, 2000; CARVALHO, 2011; PASTORE et al., 1995; PASTORE et al., 1994; YAMAUCHI et al., 1991; YOSHIZAWA et al., 1988).

Com base no exposto acima, o uso de *Neurospora* sp. em processos biotecnológicos de produção de aroma é factível. O objetivo desse projeto foi verificar a produção de hexanoato de etila em diferentes resíduos agroindustriais como meio de cultura aliando a redução de custo com obtenção de produtos de alto valor agregado.

MATERIAL E MÉTODOS

A linhagem de *Neurospora* sp. utilizada (identificada “linhagem n°8”) foi doada pelo Laboratório de Bioaromas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, em tubos de ensaio contendo PDA (Potato Dextrose Agar) e foi mantida sob refrigeração.

Os resíduos agroindustriais foram doados por empresas locais sendo eles o bagaço de malte, a película de café e o bagaço de cana-de-açúcar.

Os meios de cultura utilizados foram extrato de malte (Kasvi), extrato de levedura, peptona e PDA (Himedia) e os reagentes: glicose (Dinâmica), NaCl (Synth), padrão hexanoato de etila (Sigma Aldrich) e éter etílico (Dinâmica).

Uma alçada contendo esporos de *Neurospora* sp. dos tubos de armazenamento da cultura foram transferidos para tubos com PDA e incubados a 30°C por 72 horas. A seguir, ainda nos tubos de ensaio, foram acrescentados 10 mL em água estéril e removidos por meio de raspagem com auxílio de alça de platina para serem pré inoculados em 50 mL de caldo YM (peptona 0,5%, glicose 1%, extrato de malte 0,3% e extrato de levedura 0,3%) por 24 horas a 30°C em shaker a 200rpm. A biomassa de *Neurospora* sp. formada no meio de cultura líquido foi filtrada a vácuo utilizando funil de Bucher e kitazato, sendo o papel filtro lavado com água destilada estéril e a biomassa, lavada da mesma forma durante o processo de filtragem. A seguir, 1 grama da biomassa de *Neurospora* sp. filtrada foi adicionado em cada erlenmeyer contendo 100 mL de meio constituído por diferentes concentrações (5, 10 e 15%) dos resíduos agroindustriais, sendo eles: bagaço de cana-de-açúcar ou bagaço de malte ou película de café estéreis tendo um erlenmeyer de controle (não inoculado) para cada um substratos. Com o auxílio de agitador magnético, os meios foram submetidos a agitação durante 30 segundos após a inoculação.

Os meios de cultura inoculados e o erlenmeyer controle (branco) foram submetidos a 200 rpm em shaker de bancada a 30°C por um período de 72 horas. Todos os experimentos foram conduzidos em duplicata.

Foram coletadas 5 mL de extrato fermentado de cada erlenmeyer as 24, 48 e 72 horas de fermentação para posterior análise em sistema cromatógrafo gasoso acoplado em um espectrômetro de massas (Thermo Scientific) a fim de identificar se houve produção de hexanoato de etila.

Para a extração de compostos para análise no CG/MS, para cada 5mL de amostra foram acrescentadas 0,1g de NaCl e agitadas em vortex por 10 segundos. A seguir, 1mL de éter etílico foi adicionado aos tubos e agitadas por mais 30 segundos. O sobrenadante contendo os compostos extraídos foi removido com o auxílio de pipeta pasteur e transferido para tubo eppendorf contendo 0,1g de NaCl.

Um microlitro de cada amostra extraída foi injetado através de um injetor split/splitless a uma temperatura de 250°C, no modo splitless. Uma coluna capilar de sílica fundida TR-5 de 60 m x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,5 µm de espessura de fase estacionária foi utilizada para separar os componentes voláteis. Gás Hélio foi utilizado como gás de arraste, a uma vazão constante de 1,0

mL.min⁻¹. A programação de temperatura do forno do cromatógrafo gasoso foi iniciada a 50°C, permanecendo nesta temperatura por 1 minuto, em seguida foi adicionada uma rampa de 10°C.min⁻¹ até atingir 110°C permanecendo durante 1 minuto e, posteriormente, uma rampa de 20°C.min⁻¹ até 200°C, a qual foi mantida por 3 minutos. A temperatura da interface CG-EM foi de 250°C e a energia de impacto de +70eV. Para a identificação do composto foi comparado ao índice de retenção e o espectro de massas do pico alvo com o do padrão analítico de hexanoato de etila.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas imagens a seguir é possível notar o crescimento dos esporos de *Neurospora* sp. nos substratos utilizados.

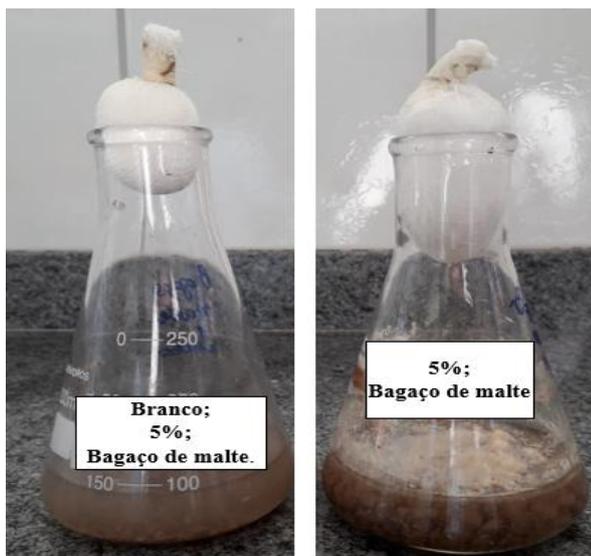


FIGURA 1. Crescimento da linhagem de *Neurospora* sp. no meio bagaço de malte comparado ao meio não inoculado (Branco).

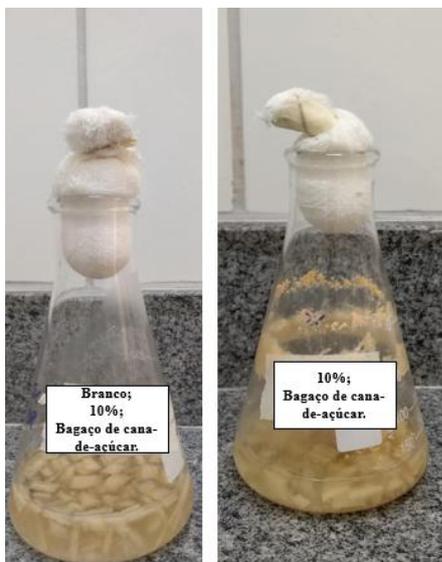


FIGURA 2. Crescimento da linhagem de *Neurospora* sp. no meio bagaço de cana-de-açúcar comparado ao meio não inoculado (Branco).

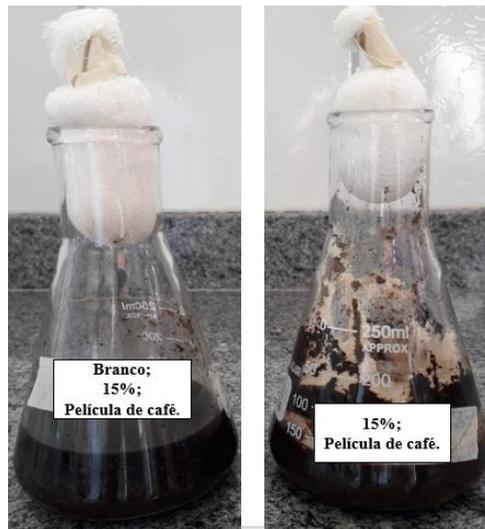


FIGURA 3. Crescimento da linhagem de *Neurospora* sp. no meio película de café comparado ao meio não inoculado (Branco).

Após a análise dos dados obtidos no CG/MS, pôde-se identificar o composto hexanoato de etila nos meios de bagaço de cana-de-açúcar e no bagaço de malte.

Carvalho (2011) relatou o uso inédito bagaço de malte na produção de hexanoato de etila por *Neurospora sitophila* FGSC1135 o qual gerou uma patente junto ao Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI). Os resultados obtidos nesse trabalho vêm de encontro ao relatado na literatura entretanto, destaca-se que o uso da linhagem de *Neurospora* sp. neste estudo foi diferente.

Não há relatos da produção de hexanoato de etila por *Neurospora* sp. em bagaço de cana-de-açúcar. Nas amostras analisadas foi possível confirmar que houve a produção deste composto nesse meio.

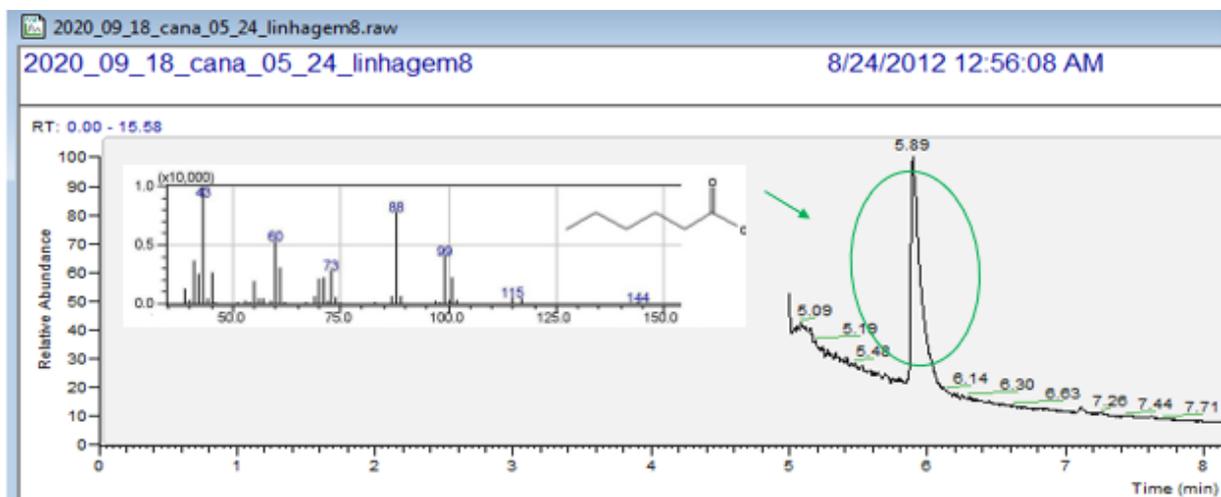


FIGURA 4. Cromatograma do CG/MS e espectro de massas do hexanoato de etila obtido na amostra com 5% de bagaço de cana-de-açúcar em 24 horas de fermentação.

Embora a linhagem de *Neurospora* sp. utilizada tenha apresentado crescimento satisfatório no meio de película de café (FIGURA 3), não houve a detecção de hexanoato de etila nas amostras analisadas. Será necessário rever o método de extração para esse resíduo visto a dificuldade de extrair o solvente após a mistura nesse meio. Dessa forma a fermentação em película de café requer modificações no método de extração bem como ajustes na concentração do meio utilizado para confirmar se realmente não houve produção de hexanoato.

As amostras extras dos extratos fermentados nos três tempos de coleta foram congeladas para posterior quantificação em cromatográfico gasoso, após a instalação do equipamento.

CONCLUSÕES

Concluiu-se que a linhagem utilizada de *Neurospora* sp. (linhagem nº8) é produtora de hexanoato de etila no bagaço de malte e no bagaço de cana-de-açúcar.

Destaca-se o uso inédito do resíduo agroindustrial de bagaço-de-cana para a produção deste composto usando *Neurospora* sp.

A película de café se mostrou um substrato promissor para a multiplicação dos esporos da linhagem de *Neurospora* sp., entretanto novos estudos devem ser realizados para verificar a viabilidade de produção de hexanoato de etila neste meio.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo, Campus Avaré pelo concedimento de uma bolsa PIBIFSP.

REFERÊNCIAS

- ADITIVOS E INGREDIENTES. **Ingredientes Naturalmente Saudáveis**. Disponível em: <https://aditivosingredientes.com.br/artigos/artigos-editoriaisgeral/ingredientes-naturalmente-saudaveis>. Acesso em 20 de setembro de 2019.
- ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução nº12, de 17 de janeiro de 2007. Estabelece o regulamento técnico sobre aditivos aromatizantes. Resolução – RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_02_2007_COMP.pdf/c966caff-1c19-4a2f-87a6-05f7a09e940b. Acesso em 20 de setembro de 2020.
- BRIGIDO, B. M. **Produção de compostos voláteis de aroma por novas linhagens de *Neurospora* sp.** 2000. 172f. Tese (Mestrado em Ciência de Alimentos) - UNICAMP, Campinas/SP, 2000.
- CARVALHO, D. S de. **Produção de aroma frutal por linhagens de *Neurospora* sp. em meios sintéticos e resíduos agroindustriais.** 2011. 174p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.
- MIRABELLA, N., CASTELLANI, V., & SALA, S. 2014. Current options for the valorization of food manufacturing waste: A review. **Journal of Cleaner Production**, Universidade de Milão – Milão, Itália. v. 65, n. 15, p. 28-41, fevereiro. 2014.
- PASTORE, G. M; PARK, Y. K; MIN, D. B. Production of Fruity Aroma by *Neurospora* from Beiju. **Mycol Res.** V. 98, p. 1300-1302,1994.
- UBIC CONSULTING. **The World Biotech Flavours Market**. Disponível em: <http://ubicconsulting.com/wp-content/uploads/2015/08/Biotech-Flavor.pdf> >. Acesso em: 18 de fevereiro de 2016.
- YAMAUCHI, H; OBATA, T; AMACHI, T; HARA, S. Production of characteristics odors by *Neurospora*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, n. 12, p. 3115-3116, 1991.
- YOSHIZAWA, K; YAMAUCHI, H; HAUSO, T; AKITA, O; HARA, S. Production of a fruity odor by *Neurospora* sp. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 52, n. 8, p. 2129-2130, 1988.