

## 12º Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia do IFSP - 2021

### Otimização da produção de bioaroma utilizando bagaço de cana-de-açúcar

ISAMARA ADRIENE MOREIRA SILVA<sup>1</sup>, RAQUEL SZABO<sup>2</sup>, DANIELE SOUZA DE CARVALHO<sup>3</sup>, GLÁUCIA MARIA PASTORE<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Graduanda em Licenciatura em Ciências Biológicas, Bolsista PIBIFSP, IFSP, Câmpus Avaré, isamara.moreira@ifsp.edu.br.

<sup>2</sup> Graduanda em Licenciatura em Ciências Biológicas, Bolsista PIBIFSP, IFSP, Câmpus Avaré, raquel.szabo@ifsp.edu.br.

<sup>3</sup> Professora Orientadora IFSP-Câmpus Avaré

<sup>4</sup> Professora colaboradora FEA-UNICAMP

Área de conhecimento (Tabela CNPq): 2.12.02.02-8 Microbiologia Industrial e de fermentação

**RESUMO:** A biotecnologia visa aplicar tecnologia em sistemas biológicos para fabricar, otimizar, modificar produtos ou processos para utilização específica, dentre elas a produção de bioaromas os quais são considerados naturais quando produzidos por microrganismos. Ademais a utilização de resíduos agroindustriais como substrato torna-se uma estratégia, pois além de ser capaz de fornecer os nutrientes tem um baixo valor, reduzindo o custo da etapa fermentativa. Aliado a esses fatores, a otimização do processo fermentativo, destaca-se por apontar a melhor condição, sendo esta informação muito útil em termos de economia de processo. Assim o presente estudo visou otimizar a produção do hexanoato de etila, um éster com forte aroma frutal muito utilizado na indústria alimentícia, pelo fungo *Neurospora sitophila* n° CTT 5055, a partir da variação de temperatura (25°C e 30°C) e agitação (0, 100 e 200rpm), combinadas entre si, utilizando 5% m/v de bagaço de cana-de-açúcar em 24 horas de fermentação. Cada amostra foi extraída com éter dietílico e analisada em um cromatógrafo gasoso. Em todos os tratamentos, foi detectado o bioaroma de interesse, observando-se a maior produção nas condições de 30°C sob agitação de 100rpm, cuja concentração foi de 4,77 mg / L de hexanoato de etila.

**PALAVRAS-CHAVE:** aroma; hexanoato de etila; resíduos agroindustriais.

### Optimization of bioaroma production from sugarcane bagasse

**ABSTRACT:** Biotechnology aims to apply technology in biological systems to manufacture, optimize, modify products or processes for specific use, including the production of bioflavors which are considered as natural when produced by microorganisms. Furthermore, the use of agro-industry residues as substrate becomes a strategy because, in addition to being able to supply nutrients, it has a low value, reducing the cost of the fermentation stage. The optimization of the fermentation process stands out for pointing out the best condition, and this information is very useful in terms of process economy. Thus, the present study aimed to optimize the production of ethyl hexanoate by the fungus *Neurospora sitophila* n° CTT 5055, from the variation of temperature (25°C and 30°C) and agitation (0, 100 and 200rpm), combined between each other, using 5% m/v of sugarcane bagasse in 24 hours of fermentation. Each sample was extracted with diethyl ether and analyzed by gas chromatograph. In all treatments, the bioaroma of interest was detected, with the highest production being observed under conditions of 30°C under 100 rpm agitation, whose value was at 4.77 mg / L of ethyl hexanoate.

**KEYWORDS:** aroma; ethyl hexanoate; agro-industrial waste.

## INTRODUÇÃO

O Brasil é, atualmente, o quarto maior mercado para produtos saudáveis. A indústria de aromas naturais ocupa uma parcela significativa do mercado de ingredientes naturais (Aditivos Ingredientes, 2019). Assim, o uso de microrganismos se mostra uma boa alternativa para produção natural de aromas, utilizando-se de processos biotecnológicos (Bergamo e Ninow, 2010). Ademais destaca-se o metabolismo dos fungos, capazes de utilizar uma gama de substratos para sua nutrição, (Tortora et al., 2010; Virgilio, 2012), dentre os quais pode-se citar o bagaço de cana-de-açúcar.

Dentre os microrganismos capazes de sintetizar aromas, destaca-se o fungo do gênero *Neurospora*, capaz de produzir o hexanoato de etila, éster que apresenta um forte aroma frutal (Carvalho, 2011; Carvalho et al., 2012), podendo ser utilizado em muitos produtos alimentícios.

A produção de compostos de interesse, deve ser otimizada, de tal forma que os custos relacionados a sua produção e purificação possam permitir a sua comercialização. Diversas ferramentas podem colaborar com processos mais competitivos, citando-se a otimização do processo fermentativo, a utilização de resíduos agroindustriais como substrato, para minimização dos custos em contrapartida aos meios de cultura sintéticos, bem como a seleção de novas linhagens produtoras e o seu estudo de melhoramento genético, com base na engenharia genética (CARVALHO, 2011).

Crescitelli et al. (2020) utilizou de diferentes concentrações de bagaço de cana-de-açúcar mantidos sob a agitação de 200 rpm a 30°C, em seu estudo, onde relata a produção do hexanoato de etila, por *Neurospora* sp.. Assim o presente projeto objetivou avaliar quais as melhores condições de temperatura e agitação para a produção do bioaroma frutal por *Neurospora sitophila* n° CTT 5055, utilizando o bagaço como meio em 24 horas de fermentação.

## MATERIAL E MÉTODOS

O bagaço de cana-de-açúcar usado no presente estudo foi doado por empresas locais. Os meios de cultura utilizados foram extrato de malte (Kasvi), extrato de levedura, peptona, glicose e PDA (Himedia). Já os reagentes utilizados foram o padrão de hexanoato de etila e 2-heptanol (Sigma-Aldrich) e solvente éter dietílico padrão cromatográfico (Merck), além do cloreto de sódio (Synth).

A linhagem de *Neurospora sitophila* n° CCT 5055 (referência ATCC 46892) foi adquirida na Fundação André Tosello, sendo mantida em meio PDA (potato dextrose Agar) com a adição de óleo mineral (União Química), sob refrigeração.

A linhagem de *Neurospora sitophila* foi repicada em tubos contendo PDA sendo mantidos em estufa microbiológica por 72 horas a 30°C, após este período foram acrescidos de 10 mL de água estéril, raspados e transferidos para 50 mL de meio líquido Yeast Malt Broth –YM (composto de 0,5% de peptona, 1% de glicose, 0,3% de extrato de malte e 0,3% de extrato de levedura) e acondicionados em shaker de bancada sob condições 200 rpm e 30 °C por 24 horas. A biomassa passou por um sistema de filtração a vácuo e foi lavada com água estéril. Um grama da biomassa de *Neurospora sitophila* foi adicionado a um erlenmyer contendo 100 ml de meio composto por 5% m/v de bagaço de cana-de-açúcar. As fermentações ocorreram em 24 horas e foram conduzidas sob diferentes condições de temperatura e agitação sendo T1: temperatura de 30°C sob agitação de 200 rpm; T2: 30°C sem agitação; T3: 30°C sob agitação de 100 rpm; T4: de 25°C sem agitação; T5: de 25°C sob agitação de 100 rpm e T6: 25°C sob agitação de 200 rpm.

Para a extração do analito de interesse, 5 mL do meio fermentado foram transferidos para tubo de ensaio e acrescidos com 0,1 g de NaCl, agitando-os em vórtex por 10 segundos, subsequente foi adicionado 1 mL de éter etílico contendo 0,003% v/v de 2-heptanol, agitando novamente em vórtex por 30 segundos e realizando a extração com o auxílio de uma pipeta de Pasteur para um vial de 1,5 ml contendo 0,1 g de NaCl. Um microlitro da amostra obtida foi injetado através de um injetador split/splitless a uma temperatura de 250°C, no modo splitless no cromatógrafo gasoso (Thermo Scientific). Foi utilizada a coluna capilar de sílica fundida DA-5 de 60 m x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,50 µm de espessura de fase estacionária e gás Hélio como gás de arraste, a uma vazão constante de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>. A programação de temperatura do forno foi iniciada a 50°C, permanecendo nesta temperatura por 1 minuto, em seguida acresceu-se uma rampa de 10°C.min<sup>-1</sup> até atingir 150°C, permanecendo durante 1 minuto e, posteriormente, uma rampa de 20°C.min<sup>-1</sup> até 200°C, na qual foi mantida por 3 minutos. A temperatura do detector foi de 250°C.

Como critérios para avaliar se o pico alvo obtido nas amostras fermentadas era do bioaroma de interesse comparou-se o tempo de retenção (TR) das amostras com o TR obtido com o padrão analítico do hexanoato de etila, além do uso de fortificação das amostras fermentadas com um microlitro de uma solução com concentração de 10 mg/L de hexanoato de etila.

Para a quantificação do analito de interesse foi construída uma curva de calibração com 8 concentrações de hexanoato de etila, sendo elas 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 mg/L obtidas a partir de uma solução de 500 mg/L com 0,003% de 2-heptanol, utilizado como padrão interno. Dispondo da equação da reta obtida a partir da curva analítica pode-se calcular a concentração do analito nas amostras.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gênero *Neurospora* tem crescimento vegetativo em temperatura ótima de 30 a 35°C, embora possa crescer de 42°C a 45°C. A morfologia das colônias de *Neurospora* sp. é semelhante a algodão, veludo ou pulverulenta, apresentando geralmente coloração rosada ou alaranjada devido a produção de pigmentos carotenóides (Costa, 1999), conforme pode ser observado na Figura 1.

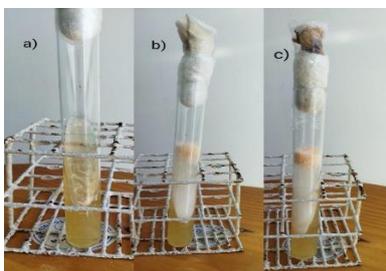


FIGURA 1. *Neurospora sitophila* n° CTT 5055 repicadas em tubos de ensaio (a) recém inoculado (b) 72 horas de incubação e (c) 168 horas de crescimento.

A nutrição da maioria dos fungos dá-se por absorção, eles se utilizam de processos, no qual enzimas (exoenzimas) hidrolisam macromoléculas, quando necessário, tornando-as assimiláveis através de mecanismos de transporte. Dessa forma, são capazes de incorporar moléculas pequenas que utilizam como fonte de nutriente e energia para seu crescimento (Gompertz et al., 2015). Esta capacidade de secretar enzimas extracelulares, associado à sua particular forma de crescimento filamentosos, possibilita que linhagens de *Neurospora* sp. sejam organismos com uma grande capacidade de aproveitamento de uma gama de substratos (Galvagno e Forchiassin, 2010). Então ao considerar os fatos expostos acima o bagaço de cana-de-açúcar é possível de ser utilizado como substrato de fungos filamentosos como a *Neurospora sitophila* n° CTT 5055, sendo favorável para o seu crescimento, reprodução e produção de compostos de interesse.

A produção de ésteres em fungos filamentosos se dá por duas vias pela alcoólise de compostos acil-CoA, ou pelo processo de esterificação de ácidos e alcoóis como mecanismo de remoção desses compostos do meio (CARVALHO et al, 2012).

A partir das análises realizadas, observa-se que houve a produção de hexanoato de etila utilizando-se de *Neurospora sitophila*, demonstrado na Figura de 2 com o pico de interesse esta destacado com uma seta. Como critérios de confirmação de que o pico de interesse era o bioaroma estudado, o tempo de retenção do pico alvo foi comparado com o padrão do hexanoato de etila, o qual foi de 13,5 minutos e observou-se o aumento do pico após a fortificação das amostras conforme pode ser observado na Figura 3.

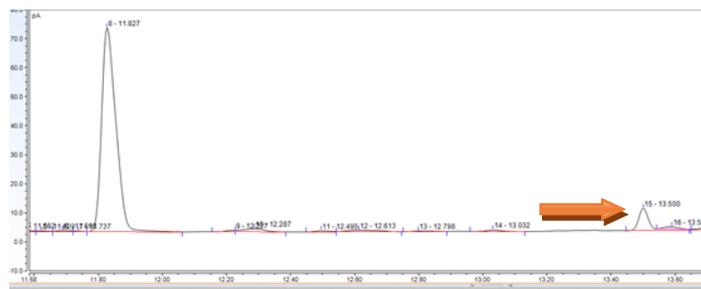


FIGURA 2. Cromatograma gerado da amostra fermentada a 30°C a 100rpm.

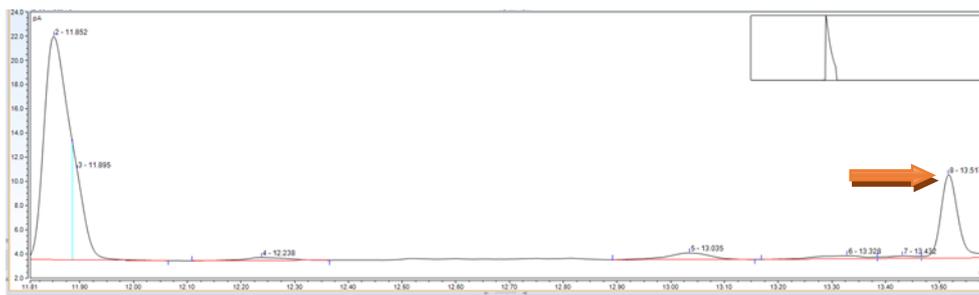


FIGURA 3. Cromatograma gerado da amostra fermentada, 30°C a 100rpm, após a fortificação.

Treatamento	Concentração de hexanoato de etila (mg/L)
T1	2,44 ±0,002
T2	0,94±0,001
T3	4,77±0,038
T4	1,27±0,0002
T5	1,50± 0,008
T6	3,56 ±0,024

TABELA 1. Produção de hexanoato de etila em 24 horas de fermentação nos diferentes tratamentos.

Observa-se na Tabela 1, que houve produção de hexanoato de etila em todos os tratamentos sendo que a maior produção do hexanoato de etila ocorreu no tratamento T3, obtendo uma produção de 4,77 mg/L de hexanoato de etila. Dessa forma, o processo se mostra factível. Ademais se destaca que até o presente momento, não há registros de dados quantitativos da produção deste bioroma por *Neurospora sp.*, na literatura.

## CONCLUSÕES

Conclui-se assim que o uso do bagaço de cana-de-açúcar utilizando 100 rpm de agitação a 30°C foi o melhor para a produção hexanoato de etila em 24 horas.

## AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo, Campus Avaré pela concessão de uma bolsa PIBIFSP e pela oportunidade de realizar o presente projeto.

## REFERÊNCIAS

ADITIVOS E INGREDIENTES. **Ingredientes naturalmente saudáveis.** Disponível em: <https://aditivosingredientes.com.br/artigos/artigos-editoriais-geral/ingredientes-naturalmente-saudaveis>. Acesso em: 20 set. 2019.

- BERGAMO, R. A. M.; NINOW, J. L. **Produção do bioaroma acetoína por *Hanseniaspora guilliermondii* CCT3800 através do processo fermentativo batelada alimentada.** 2010. p. 93. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC, 2010.
- CARVALHO, D. S de. **Produção de aroma frutal por linhagens de *Neurospora sp.* em meios sintéticos e resíduos agroindustriais.** 2011. p. 174. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas/SP, 2011.
- CARVALHO, D. S. de; MOLINA, G.; MARÓSTICA Jr, M.R.; PASTORE, G. M. Fruity aroma production by *Neurospora sitophila*: Influence of precursors. **Current Topics in Biotechnology**, v. 7, p. 45-49, 2012.
- COSTA, A. S. **Taxonomia polifásica de *Neurospora* produtoras de aroma.** 1999. p. 128. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas/SP, 1999.
- CRESCITELLI, M. B.; SZABO, R.; SOUZA, H. A. L.; PASTORE G. M; CARVALHO, D. S.. 11º CONGRESSO DE INOVAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO IFSP - 2020, 11º, 2020, CONICT IFSP 2021. **Produção de aroma frutal por *Neurospora sp.* em resíduos agroindustriais** .[S.L:s.n.],2020.
- GALVAGNO, M. A.; FORCHIASSIN, F. **Fisiologia dos fungos e metabolismo.** In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. 2 ed. Caxias do Sul: Educs, 2010. Cap. 4, p. 125–164.
- GOMPERTZ, O. F.; GAMBALE, W.; CORRÊA, B.; PAULA, C. R. **Fisiologia dos Fungos nutrição, crescimento e metabolismo.** In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 6 ed. São Paulo: Atheneu, 2015. Cap. 64.3, p. 557-558.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Eucariotos: fungos, algas, protozoários e helmintos.** In: \_\_\_\_ **Microbiologia.** 10. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010. Cap. 12, p. 330-366.
- VIRGILIO, S. **Metabolismo de glicogênio e relógio biológico em *Neurospora crassa*. Fatores e cofatores de transcrição envolvidos nos processos.** 2012. p. 140. Dissertação (Mestre em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara/SP, 2012.