



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Ciência de Alimentos



Produção de aroma frutal por linhagens de *Neurospora* sp em meios
sintéticos e resíduos agroindustriais

Daniele Souza de Carvalho
Msc. Ciência de Alimentos

Tese de doutoramento em Ciência de Alimentos

Orientadora: Gláucia Maria Pastore

Campinas, setembro 2011



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

DANIELE SOUZA DE CARVALHO

PRODUÇÃO DE AROMA FRUTAL POR LINHAGENS DE *Neurospora* SP EM
MEIOS SINTÉTICOS E RESÍDUOS AGROINDUSTRAIS

TESE DE DOUTORADO APRESENTADA À FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

Gláucia Maria Pastore

ORIENTADOR

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida por
Daniele Souza de Carvalho, aprovada pela comissão julgadora
em ___/___/___ e orientada pela Profa. Dra. Gláucia Maria
Pastore.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

C253p

Carvalho, Daniele Souza de
Produção de aroma frutal por linhagens de
Neurospora sp em meios sintéticos e resíduos
agroindustriais / Daniele Souza de Carvalho. –
Campinas, SP: [s.n], 2011.

Orientador: Gláucia Maria Pastore.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Neurospora. 2. Hexanoato de etila. 3.
Resíduos agroindustriais. 4. Extrato de malte.
I. Pastore, Gláucia Maria. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Production of frutal aroma by strains of Neurospora sp in
synthetic medium and agroindustrial residues

Palavras-chave em inglês (Keywords):

Neurospora

Ethyl hexanoate

Agroindustrial residues

Malt extract

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Gláucia Maria Pastore [Orientador]

Ana Paula Dionisio

Mário Roberto Maróstica Júnior

Rosângela dos Santos

Rui Carlos Zambiasi

Data da defesa: 16/09/2011

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore

(orientadora)

Dra. Ana Paula Dionísio

(membro)

Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Junior

(membro)

Dra. Rosângela dos Santos

(membro)

Prof. Dr. Rui Carlos Zambiasi

(membro)

Prof. Dr. Juliano Lemos Bicas

(membro)

Dra. Regina Prado Zanes Furlani

(membro)

Dr. Stanislaw Bogusz Junior

(membro)

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela força e proteção.

À minha família; mãe, pai, irmãs, por todo amor, carinho, compreensão, apoio nos momentos difíceis e pelo incentivo constante. Obrigada por acreditarem em mim.

Ao Bruno, pela compreensão, paciência, incentivo, ajuda, sugestões e acima de tudo por todo amor e felicidade.

A Profa. Gláucia Maria Pastore pelo apoio e orientação.

Aos amigos Xispita, Molina, Ju Bicas, Angélica e Stanis pelo incentivo, sugestões, ajuda, risadas, amizade, carinho e compreensão.

Aos meus amigos, pelo apoio e motivação. Em especial as amigas Dani Bio, Re, Pati, Lu e Ceci pela ajuda, pela amizade, força constante, muitas risadas e companhia.

Aos amigos e colegas do bioaromas: Rô, Fabio, CD, Cris, Beth, Ju Bueno, Adriane, Manola, Mário, Mari, CD, Simi, Érica, Patrícia, Renata, Julia, Ourinhos, Rebeca, Renata IC, Mônica, pela amizade, convívio agradável, risadas e companhia.

Aos colegas e amigos dos laboratórios de bioquímica e análise de alimentos. Muito obrigada por tudo, pela amizade, risadas, companhia e apoio.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Ciência dos Alimentos pelos esclarecimentos, pelos conhecimentos adquiridos e constante auxílio.

A Juliana (IC) pelo esforço e dedicação e constante auxílio.

A Cervejaria Itaipava (Grupo Petrópolis), pela doação do bagaço de malte.

A Plaza Indústria de Farinha de Mandioca LTDA, pela doação da manipueira.

Aos membros da banca, pelas valiosas correções e sugestões.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	1
RESUMO GERAL.....	2
ABSTRACT	4
INTRODUÇÃO GERAL	6
OBJETIVOS	11
CAPÍTULO 1 - PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE AROMAS POR SÍNTESE <i>DE NOVO</i>: PANORAMA E PERSPECTIVAS FUTURAS	15
RESUMO	15
ABSTRACT	15
INTRODUÇÃO	16
Aromas e alimentos	17
Produção biotecnológica de aromas: Bioaromas	19
Metabolismo: Vias de formação de aromas	23
Formação de compostos de aroma pelo metabolismo de carboidratos	26
Formação de compostos de aroma pelo metabolismo de ácidos graxos	26
Formação de compostos de aroma pelo metabolismo de aminoácidos	29
Principais classes de compostos de aroma	30
Ésteres	30
Lactonas	32
Alcoóis	34
Ácidos e aldeídos	35
Terpenos	38
Cetonas	39
Outros compostos	40
Pirazinas	40
Compostos sulfurados	41
Ciência, mercado e patentes: presente e futuro	42
Considerações finais	50

Referências bibliográficas	51
----------------------------------	----

CAPÍTULO 2 - PRODUCTION OF ETHYL HEXANOATE BY <i>Neurospora</i>	
SPECIES ISOLATED FROM BEIJU IN DIFFERENT CULTURE MEDIUM	63
ABSTRACT	63
1.INTRODUCTION	64
2. MATERIALS AND METHODS	65
2.1 Standards and reagents	65
2.2 Isolation of <i>Neurospora</i> sp. from beiju	65
2.3 Culture mediums	66
2.4 Preparation of pre-inoculum and fermentation	66
2.5 Liquid-liquid extraction	67
2.6 GC-FID conditions	67
2.7 GC-MS conditions	68
2.8 Statistical analysis	68
3. RESULTS AND DISCUSSION	68
3.1 Liquid-liquid extraction	68
3.1.1 Select the type of solvent and the volume	68
3.1.2 Effect of amount of NaCl	70
3.1.3 Summary of the set up conditions	70
3.2 Performance characteristics	71
3.2.1 Calibration	71
3.2.1.1 Linearity	71
3.2.2 Precision	72
3.2.3 Recovery (%)	72
3.2.4 Limit of detection (LOD) and Limit of quantification (LOQ)	73
3.3 Quantification the target compound in different culture medium and different periods of fermentation	74
3.4 Identification of ethyl hexanoate	76
4. CONCLUSION	76

REFERENCES	77
------------------	----

CAPÍTULO 3 - ANALYTICAL METHOD VALIDATION AND OPTIMIZATION OF SPME EXTRACTION OF ETHYL HEXANOATE

PRODUCED BY <i>Neusporora sitophila</i>	81
SUMMARY	81
INTRODUCTION	82
EXPERIMENTAL	84
Standard	84
SPME fiber coatings	84
Optimization of HS-SPME procedure	84
Extraction time and equilibrium time	84
Method validation	85
Preparation of pre-inoculum and fermentation	86
GC-FID conditions	86
GC-MS conditions	87
Quantification	88
Statistical analysis	88
RESULTS AND DISCUSSION	88
SPME fiber coatings	88
Effect of equilibrium time and extraction time	89
Method validation	91
Identification	93
Analysis of fermentation samples	93
CONCLUSION	95
REFERENCES	95

CAPÍTULO 4 - OPTIMIZATION OF ETHYL HEXANOATE PRODUCTION BY *Neurospora sitophila* FGSC1135

ABSTRACT	101
1.INTRODUCTION	102

2.MATERIAL AND METHODS.....	104
2.1 Microorganism and chemical	104
2.2 Inoculum	104
2.3 Optimization experiments	105
2.4 Quantification and identification of ethyl hexanoate	105
2.5 Data analysis	106
3. RESULTS AND DISCUSSION	107
3.1 Screening of the variables	107
3.1.1 Effect of the medium composition	109
3.1.2 Effect of the cultivation conditions	110
3.1.3 Effect of the inoculums size	110
3.2 Optimization using a central composite design	111
CONCLUSION	116
REFERENCES	117

CAPÍTULO 5 - FRUITY FLAVOR PRODUCTION BY *Neurospora* SP GROWN ON CASSAVA WASTE WATER AND MALT BAGASSE

ABSTRACT	123
1. INTRODUCTION	124
2. METHODS	126
2.1. Preparation and characterization of the substrates	126
2.2 Preparation of pre-inoculum and fermentation	126
2.3 Extraction procedure	127
2.4 GC-FID conditions	127
2.5 GC-MS conditions	128
2.6 Quantification	129
2.7 Statistical analysis	129
3. RESULTS AND DISCUSSION	129
3.1 Cassava waste water and malt bagasse composition	129
3.2 Identification	131

3.3 Validation method and aroma production	131
CONCLUSION	135
REFERENCES	136

CAPÍTULO 6 – USE OF EXPERIMENTAL DESIGN FOR ETHYL HEXANOATE PRODUCTION BY <i>Neurospora sitophila</i> GFSC1135 IN MALT BAGASSE	141
ABSTRACT	141
1. INTRODUCTION	142
2. METHODS	143
2.1 Microorganism	143
2.2 Inoculum	143
2.3 Optimization experiments	144
2.4 De novo procedure	144
2.5 Quantification and identification of ethyl hexanoate	145
2.6 Data analysis	146
3. Results and discussion	146
3.1 Screening of the variables	146
3.1.1 Effect of the medium compositium	147
3.1.2 Effect of the cultivation conditions	148
3.1.3 Effect of the inoculums size	149
3.2 Optimization using a central composite design	153
4. CONCLUSION	153
REFERENCES	153
CONCLUSÃO GERAL	155

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 - PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE AROMAS POR SÍNTESE DE NOVO: PANORAMA E PERSPECTIVAS FUTURAS	15
Figura 1. Formação de compostos voláteis a partir de seus substratos	23
Figura 2. Metabolismo de glicose/carbono para a formação de compostos de aroma e sabor	27
Figura 3. Formação de compostos de aroma através do metabolismo de lipídios	28
Figura 4. Formação de compostos de aroma a partir do metabolismo de proteínas e aminoácidos	30
 CAPÍTULO 2 - PRODUCTION OF ETHYL HEXANOATE BY <i>Neurospora</i> SPECIES ISOLATED FROM BEIJU IN DIFFERENT CULTURE MEDIUM	63
Figure 1. Production of ethyl hexanoate in malt extract broth for different strains of <i>Neurospora</i> sp	75
Figure 2. GC/MS Chromatogram and Spectra of the ethyl hexanoate produced by strain LB23DSC	76
 CAPÍTULO 3 – ANALYTICAL METHOD VALIDATION AND OPTIMIZATION OF SPME EXTRACTION OF ETHYL HEXANOATE PRODUCED BY <i>Neurospora sitophila</i>	81
Figure 1. Efficiency of coating of SPME fibers for extraction of ethyl hexanoate by HS-SPME. Results expressed as mean of triplicates of the total area of chromatograms by GC-FID. Means followed by different letters differ by Tukey test ($p < 0.05$)	89
Figure 2. Influence of equilibrium time on extraction recovery of ethyl hexanoate produced by <i>Neurospora sitophila</i> , in malt extract 5% by HS-SPME	90
Figure 3. Influence of exposure time on extraction recovery of ethyl	

hexanoate produced by <i>Neurospora sitophila</i> , in malt extract 5% by HS-SPME	90
Figure 4. Production of ethyl hexanoate by <i>Neurospora sitophila</i> in malt extract broth at 30°C and 200 rpm	95

CAPÍTULO 4 - OPTIMIZATION OF ETHYL HEXANOATE PRODUCTION BY NEUROSPORA SITOPHILA FGSC1135

Figure 1. Contour plot of the Ethyl hexanoate area as a function of temperature and I/M (g.L ⁻¹) Agitation was fixed in 200 rpm and soybean concentration in 20 g.L ⁻¹	115
Figure 2. Contour plot of the Ethyl hexanoate area as a function of temperature and agitation (rpm). The inoculums/medium was fixed in 30 g.L ⁻¹ and soybean concentration in 20g.L ⁻¹	115
Figure 3 - Contour plot of the Ethyl hexanoate area as a function of soybean oil concentration and I/M (g.L ⁻¹). The temperature was fixed in 30°C and agitation in 200 rpm	116

CAPÍTULO 5 - FRUITY FLAVOR PRODUCTION BY *Neurospora* SP. GROWN ON CASSAVA WASTE WATER AND MALT BAGASSE

Figure 1. Production of ethyl hexanoate by <i>Neurospora</i> sp. in bagasse malt at 30°C under agitation 200 rpm.	134
Figure 2. Production of ethyl hexanoate by <i>Neurospora</i> sp. in cassava wastewater 30°C under agitation 200 rpm	135

CAPÍTULO 6 – USE OF EXPERIMENTAL DESIGN FOR ETHYL HEXANOATE PRODUCTION BY *Neurospora sitophila* GFSC1135 IN MALT BAGASSE

Figure 1. Figure 1. Predicts values x Observed values	152
---	-----

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 1 - PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE AROMAS POR SÍNTESE DE NOVO: PANORAMA E PERSPECTIVAS FUTURAS	15
Tabela 1. Classes de compostos de aroma produzidos por síntese de novo e os gêneros de fungos, bactérias e leveduras responsáveis pela produção	22
Tabela 2. Precursores de compostos de aroma e seus respectivos produtos	24
Tabela 3. Classes químicas, alguns aromas produzidos por via biotecnológica, com a respectiva descrição aromática	43
 CAPÍTULO 2 - PRODUCTION OF ETHYL HEXANOATE BY <i>Neurospora</i> SPECIES ISOLATED FROM BEIJU IN DIFFERENT CULTURE MEDIUM	63
Table 1. Relative area of ethyl hexanoate using different types of solvents ..	69
Table 2. Response of relative area using different volumes of ether diethyl and weigh of sample	70
Table 3. Relative area of ethyl hexanoate using different amounts of NaCl .	71
Table 4. The concentration range, regression equations, R^2 , recovery, LOD, LOQ and RSD for the ethyl hexanoate in each matriz.....	73
Table 5. Maximum production of ethyl hexanoate in different culture medium	74
 CAPÍTULO 3 - ANALYTICAL METHOD VALIDATION AND OPTIMIZATION OF SPME EXTRACTION OF ETHYL HEXANOATE PRODUCED BY <i>Neusporora sitophila</i>	81
Table 1. The concentration range, regression equations, R^2 , recovery, LOD, LOQ and RSD for the ethyl hexanoate.....	92
 CAPÍTULO 4 - OPTIMIZATION OF ETHYL HEXANOATE PRODUCTION BY <i>Neurospora sitophila</i> FGSC1135	101

Table 1. Variables and levels evaluated in the screening design.....	107
Table 2. Plackett-Burnan screening design matrix (PB- 12) and the ethyl hexanoate area after 24h of fermentation	108
Table 3. Estimates of the effects of the parameters analysed after 24 h of fermentation	109
Table 4. Variables and levels evaluated in the central composite design.....	111
Table 5. 2 ⁴ Central composite design matrix and the ethyl hexanoate GC-FID area after 24h fermentation	112
Table 6. The least- squares and significances of the regression coefficients of the model parameters	113
Table 7 ANOVA of the quadratic model	114

CAPÍTULO 5 - FRUITY FLAVOR PRODUCTION BY *Neurospora* SP. GROWN ON CASSAVA WASTE WATER AND MALT BAGASSE 123

Table 1. Physicochemical composition of cassava wastewater and malt bagasse	130
Table 2. The concentration range, regression equations, R ² , recovery, LOD, LOQ and RSD for the ethyl hexanoate	133

CAPÍTULO 6 - USE OF EXPERIMENTAL DESIGN FOR ETHYL HEXANOATE PRODUCTION BY *Neurospora sitophila* GFSC1135 IN MALT BAGASSE 141

Table 1. Variables and levels evaluated in the screening design.....	146
Table 2. Plackett-Burnan screening design matrix (PB- 12) and the ethyl hexanoate area after 24h of fermentation	147
Table 3. Estimates of the effects of the parameters analysed after 24 h of fermentation	148
Table 4. Variables and levels evaluated in the central composite design.....	149

Table 5. 2 ⁴ Central composite design matrix and the ethyl hexanoate GC- FID area after 24h fermentation	150
Table 6. The least- squares and significances of the regression coefficients of the model parameters	151
Table 7 ANOVA of the quadratic model	151

APRESENTAÇÃO

A Tese de Doutorado intitulada “Produção de aroma de frutas por linhagens de *Neurospora* sp. em meio sintético e resíduos agroindustriais” foi estruturada em seis capítulos, na forma de artigos, nos quais foram abordados (i) um estudo bibliográfico sobre a produção biotecnológica via síntese *de novo*; (ii) o isolamento de linhagens de *Neurospora* sp. de beiju e seleção da linhagem com interesse potencial para a produção hexanoato de etila; (iii) otimização da técnica de SPME para a extração do composto de interesse em meio extrato de malte; (iv) otimização da produção do éster em meio extrato de malte; (v) seleção de linhagens e avaliação do potencial produtor em resíduos agroindustriais e (vi) otimização da produção de hexanoato de etila em bagaço de malte.

Os capítulos foram mantidos na formatação de acordo com as normas das revistas as quais eles serão submetidos.

RESUMO GERAL

A produção de compostos de aroma por via biotecnológica é um campo emergente pois diferentemente da tradicional síntese química, os compostos produzidos por micro-organismos são classificados como naturais, indo de encontro à busca dos consumidores por alimentos saudáveis, isentos de aditivos sintéticos. O gênero *Neurospora*, pertencente a um grupo de fungos filamentosos, é relatado como produtor de hexanoato de etila, um éster caracterizado por possuir intenso um aroma frutal amplamente utilizado na indústria de alimentos. A produção deste aroma por via biotecnológica apresenta ainda alguns entraves, relacionados principalmente ao custo de produção e extração, que podem ser minimizados com o uso de resíduos agroindustriais, diminuindo assim, os custos da etapa fermentativa e tornando-o factível. Considerando que a produção de hexanoato de etila por via biotecnológica é pouco explorada e poucas publicações podem ser encontradas, os objetivos desta tese de doutorado compreenderam o isolamento e seleção de linhagens de *Neurospora* potencialmente produtoras de hexanoato de etila, em diferentes meio de cultura. Observou-se que o melhor meio sintético foi constituído de 5% extrato de malte e a maior concentração de éster obtida foi mediada pela linhagem *Neurospora sitophila* GFSC1135. A partir desses resultados foi realizada a otimização do processo de produção de hexanoato de etila visando maior rendimento para possíveis aplicações industriais. Utilizando delineamento composto central rotacional onde os parâmetros otimizados foram: temperatura, agitação, concentração de óleo de soja e inóculo,

observou-se um incremento na produção cerca de cinco vezes (45mg.L^{-1}) quando comparado com o primeiro estudo (8mg.L^{-1}). Para os dois métodos de preparo de amostra, extração líquido-líquido e microextração em fase sólida, alguns parâmetros de validação foram determinados visando segurança analítica e credibilidade aos resultados, já que as matrizes são muito complexas. Também foi realizada a otimização do método de extração de hexanoato de etila do meio fermentativo, empregando a técnica de microextração em fase sólida (SPME). Dessa forma, pode-se observar os compostos produzidos pelo micro-organismo, os quais poderiam ser mascarados pelo pico do solvente, quando utilizada a técnica de extração líquido-líquido. Além disso, muitas vezes a concentração dos compostos produzidos é baixa, necessitando de uma técnica mais sensível. De forma semelhante ao realizado com meios sintéticos, a seleção de linhagens foi realizada utilizando resíduos agroindustriais como substrato (manipueira e bagaço de malte), visando minimizar custos relacionados ao meio de cultura, agregar valor ao produto final e suavizar o impacto ambiental gerado por esses resíduos. Comparando-se os resultados obtidos entre o bagaço e o extrato de malte, observou-se que não houve diferença estatística na produção de hexanoato de etila, ficando esta em torno de 45 mg.L^{-1} . Os resultados obtidos mostraram-se promissores, tendo em vista a produção biotecnológica de hexanoato de etila, um éster de aroma impactante e elevado valor agregado, abrindo precedentes aos estudos de elevação da escala de produção e futura aplicação industrial.

ABSTRACT

The biotechnological production of aroma compounds is an emerging field and it was stimulated by the increasing preference of alienated consumers for products bearing the label “natural”. The genus *Neurospora* belongs to a group of fungus filamentosus, is reported as a producer of ethyl hexanoate and it is characterized by having strong fruity aroma is much used in food industry. The production of this flavor by biotechnological process also presents some difficulties, mainly related to the cost of production and extraction, which can be minimized with the use of agro-industrial waste, reducing costs and making feasible fermentation step. Considering the production of ethyl hexanoate by means of biotechnological processes is rarely explored and few papers can be found, the aims of this research included the isolation and selection of strains of *Neurospora* potentially producing ethyl hexanoate in different culture media. Observed the best synthetic medium consisted of malt 5% extract and the highest concentration produced by strain *Neurospora sitophila* GFSC1135.

Then the optimization of the production of ethyl hexanoate was carried out in order to increase production to possible industrial applications. Using central composite rotational design where the optimized parameters were temperature, agitation, concentration of soybean oil and inoculum, there was an increase in production about five times (45mg.L^{-1}) compared to the first study (8mg.L^{-1}). For both methods of sample preparation, liquid-liquid extraction and solid phase microextraction, some validation parameters were determined with security and reliability to analytical results, since the matrices are very complex. Was also performed to optimize the extraction method of

ethyl hexanoate fermentation media, employing the technique of solid phase microextraction (SPME), because that way, could be observed the compounds produced by microorganism, which could be masked the peak of the solvent, when used the technique of liquid-liquid extraction. In addition, many times the concentration of the compounds produced is low, requiring a more sensitive technique. Likewise, strain selection was accomplished using as substrate (cassava wastewater and bagasse malt) in order to minimize costs related to the culture medium, to add-value to the final product and minimize the environmental impact generated by these agroindustrial residues. Comparing the results between the bagasse and malt extract, it was observed that there was no statistical difference in the production of ethyl hexanoate, it being around 45 mg.L⁻¹. The results were promising of the biotechnological production of ethyl hexanoate, ester of a fruit aroma and high value added, opening previous studies of increased scale of production and its creating opportunity for the industry.

INTRODUÇÃO GERAL

De acordo com a resolução nº 104, 14/05/1999 da ANVISA, os aromas são definidos como substâncias ou misturas de substâncias com propriedades odoríferas e/ou sápidas, capazes de conferir ou intensificar o aroma e/ou sabor dos alimentos. Podem ser classificados em naturais ou sintéticos, sendo os primeiros obtidos exclusivamente mediante métodos físicos, microbiológicos ou enzimáticos a partir de substratos naturais.

A produção biotecnológica vêm expandindo nos últimos anos, despertando grande interesse pela indústria de aromas, devido nova tendência e crescente preferência dos consumidores por produtos que contenham em sua formulação matérias-primas naturais, em detrimento dos aditivos químicos, diferenciando esses no mercado (Berger, 2009; Bicas *et al*, 2009, Maróstica Junior, 2006).

Os compostos de aroma resultam principalmente do metabolismo secundário de micro-organismos, visto que estas substâncias não são essenciais para a síntese celular (Brigido, 2000). Muitas substâncias voláteis encontram-se nesta categoria como, por exemplo, ésteres, alcoóis, aldeídos, cetonas, terpenos e lactonas (Berger, 1995; Brigido, 2000; Uenojo e Pastore, 2003).

Os ésteres formados por fungos são exemplos de metabólitos secundários, oriundos do mecanismo de remoção de ácidos e alcoóis do meio, pelo fato do acúmulo destes ser tóxico ao micro-organismo (Scharpf *et al*, 1986).

O hexanoato de etila, um éster com fórmula molecular $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOCH}_2\text{CH}_3$, caracteriza-se por ser um líquido incolor com ponto de ebulição a 168°C e forte aroma frutal. Seu limiar de detecção (*threshold*) é de 1 mg.L^{-1} , sendo muito utilizado em bebidas alcoólicas, sorvete, produtos de panificação, doces e geléias (Brigido, 2000).

A produção de hexanoato de etila por *Neurospora* foi explorado por diferentes Grupos de Pesquisa, destacando-se a produção através do uso do meio de cultura extrato de malte (Brigido, 2000; Pastore, *et al* 1994; Yamauchi, *et al* 1991; Yoshizawa, *et al* 1988). Entretanto, o uso de meio de cultura sintético torna o processo de produção mais oneroso. Sendo o Brasil uma economia importante baseada na agricultura, produzindo e exportando café, açúcar de cana, soja, mandioca, frutas entre outros, gera uma grande quantidade de resíduos (Soccol & Vandenberghe, 2003; Uenojo e Pastore 2003).

Por esse motivo, o interesse em uma utilização mais eficiente de resíduos agroindustriais como bagaço de mandioca, bagaço de cana, casca de café, entre outros, tem aumentado ano a ano. A aplicação de resíduos agroindustriais em bioprocessos tem sido considerada uma boa alternativa para novos substratos, além de ajudar na redução do impacto ambiental (Medeiros *et al.*, 2000; Pandey, *et al* 2000, Soccol & Vandenberghe, 2003).

A manipueira é o resíduo líquido gerado pelas indústrias de processamento de mandioca. Durante a fabricação da farinha de mandioca são gerados cerca de 300L de manipueira por tonelada de raiz processada (Barana, 2000). Apesar de altamente poluente (por conter alto teor de cianeto, alta carga de demanda bioquímica de

oxigênio, alta carga orgânica, etc) este resíduo pode ser considerado não esgotado, ou seja, pode ser empregado como matéria-prima para outros processos industriais por apresentar altas concentrações de carboidratos, nitrogênio e uma grande variedade de minerais (K, Mg, P, Ca, S, Fe, Zn, Mn, Cu) (Maróstica Jr. e Pastore, 2007; Nitskie, 2004).

Entre os diversos resíduos agroindustriais com potencial para uso como substrato em bioprocessos encontra-se o bagaço de malte, produzido em larga escala pela indústria cervejeira (a cada 100 litros de cerveja produzida são gerados 20 kg de bagaço) cujo destino, atualmente é ração animal. Este resíduo apresenta elevado teor de proteínas e carboidratos podendo ser aproveitados como substrato para produção de enzimas e aromas por micro-organismos (Cabral Filho, 1999; Mello e Pawlowsky, 2003). Frente ao exposto acima, o país necessita de pesquisas na área de produção de aromas naturais.

Desta forma, o intuito principal da tese de doutorado foi selecionar e otimizar o processo de produção de hexanoato de etila em meio sintético e em resíduo agroindustrial.

Referências bibliográficas

- Barana, A. C. Avaliação de tratamento de manipueira em biodigestores fase acidogênica e metanogênica. *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 2000. 95p.
- Berger, R. G., *Aroma Biotechnology*. Springer: Germany, 1995. 240p.

- Berger, R. G., (2009). Biotechnology of flavours - the next generation. *Biotechnological Letters*, 31, 1651-1659.
- Bicas, J. L.; Dionísio, A. P.; Pastore, G. M. 2009. Bio-oxidation of terpenes: an approach to flavor industry. *Chem. Rev.*, 109, 9, 4518-4531.
- Brigido, B. M. Produção de compostos voláteis de aroma por novas linhagens de *Neurospora*. *Dissertação de mestrado*, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000. 148p.
- Cabral Filho, S. L. S. Avaliação do resíduo de cervejaria em dietas de ruminantes através de técnicas nucleares correlatas. *Dissertação de mestrado*. Universidade Estadual de São Paulo, Piracicaba, 1999, 68p.
- Maróstica Junior, M.R. Biotransformação de terpenos para a obtenção de compostos de aroma e funcionais. *Tese de doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006, 182p.
- Mello, E. T.; Pawlowsky, U. 2003. Minimização de resíduos em uma indústria de bebidas. *Engenharia Sanitária e Ambiental*. 8, 4, 249-256.
- Nitskie, M. Produção e caracterização de biosurfactante de *Bacillus subtilis* utilizando manipueira como substrato. *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004, 88p.
- Pastore, G. M.; Park, Y. K.; Min, D. B. (1994). Production of fruity aroma by *Neurospora* from beiju. *Mycological Research*, 98 (11), 1300-1302.

- Scharpf, J.G.; Seitz, E.W.; Morris, J.A., Farbood, M.I. Generation of flavor and odor compounds through fermentation processes. In: Biogenesis of aromas, Washington, DC, ACS Symposium Series, 317, p. 323-346, 1986.
- Soccol, C. R.; Vandenberghe, L. P. S. 2003. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochem. Eng. J.* 13, 20.
- Uenojo, M. Produção e Caracterização de aromas de frutas por micro-organismos pectinolíticos utilizando-se resíduos agroindustriais. *Dissertação de mestrado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2003.
- Yamauchi, H.; Obata, T.; Amachi, T.; Hara, S. (1991). Production of characteristic odors by *Neurospora*. *Agricultural and Biological Chemistry* ,55 (12), 3115-3116.
- Yoshizawa, K.; Yamauchi, H.; Hasuo T.; Akita, O.; Hara, S. (1988). Production of a fruity odor by *Neurospora* sp. *Agricultural and Biological Chemistry*, 52(8), 2129-21.

OBJETIVOS

Objetivo geral: Selecionar e otimizar o processo de produção de hexanoato de etila em meio sintético e em resíduo agroindustrial.

Objetivos específicos:

- Isolar e selecionar linhagens de *Neurospora* potencialmente produtoras de hexanoato de etila através de extração líquido-líquido em diferentes meios de cultura (extrato de malte, Yeast malt broth –YM, Czapeck modificado e frutose/extrato de levedura);
- Otimizar o método de extração de hexanoato de etila por meio do uso de micro extração em fase sólida (SPME);
- Otimizar a produção de hexanoato de etila no melhor meio de cultura sintético;
- Selecionar linhagens de *Neurospora* potencialmente produtoras de hexanoato de etila por meio de SPME em resíduos agroindustriais (manipueira e bagaço de malte);
- Otimizar a produção de hexanoto de etila no melhor resíduo agroindustrial por meio do uso de extração líquido-líquido.

CAPÍTULO 1

Artigo a ser submetido ao periódico Química Nova

CAPÍTULO 1

PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE AROMAS POR SÍNTESE *DE NOVO*: PANORAMA ATUAL E PERSPECTIVAS FUTURAS

Resumo

O mercado crescente de aromas requer novas estratégias para a produção destes compostos, hoje realizado, em sua maior parte, por síntese química ou extração de materiais vegetais. Esses métodos ainda são os mais viáveis economicamente, mas a produção biotecnológica de aromas tem se tornado cada vez mais atrativa pela busca pelos consumidores por produtos cada vez mais saudáveis e naturais. A obtenção de aromas por síntese *de novo* (processo fermentativo) leva a formação de compostos de aromas classificados como naturais pela legislação brasileira, européia e americana. Esse capítulo revisa os principais grupos de aroma obtidos por síntese *de novo* e aborda a utilização de resíduos como uma alternativa factível para trazer melhorias e novas alternativas aos processos biotecnológicos.

Palavras-chave

Síntese *de novo*, resíduos agroindustriais, aromas

Abstract

The growing market share of flavoured and fragranced products requires novel strategies for aroma chemicals. The conventional routes of chemical synthesis or isolation from plants are still viable, but the biotechnological generation of aroma

compounds is becoming increasingly attractive. *De novo* synthesis (fermentative processes) leads to aroma compounds that are classified as natural by the Brazilian, European and American food legislations. This paper reviews the most important compounds that can be obtained for *de novo* synthesis, the use of agroindustrial residues as an alternative to develop and expand the use of biotechnological processes to make the process evaluable.

Key-words: *de novo* synthesis, agro-industrial residues, flavor compounds.

Introdução

A produção de aromas tem crescido muito nos últimos anos devido aos avanços científicos em diversos setores co-relacionados à área, como por exemplo, novas linhagens produtoras, o desenvolvimento de diferentes processos de (bio)produção e o surgimento de novas técnicas de extração e purificação dos compostos. Os dois métodos clássicos para a obtenção de compostos de aromas são a síntese química e a extração de materiais vegetais. Porém, a síntese química geralmente gera alto impacto ambiental por emitirem certa carga de resíduos não biodegradáveis. Por sua vez, aromas extraídos das plantas estão sujeitos a instabilidade advinda da sazonalidade, ataque de pragas e efeitos geográficos. Desta forma, o grande foco das pesquisas atuais é a utilização de micro-organismos como alternativa a esses dois métodos, pois os aromas gerados biotecnologicamente são denominados naturais, sendo, portanto, mais valorizados no mercado quando comparados aos aditivos químicos artificiais.^{8,9,64} Além da conotação “natural”, em alguns casos, os produtos obtidos por fermentação

microbiana podem ser produzidos em curto prazo, em qualquer época do ano e utilizando substratos de baixo custo, o que se torna um atrativo pela vantagem de o Brasil ser rico em subprodutos desta natureza.¹¹³ Neste contexto, o artigo contempla uma revisão sobre o desenvolvimento da síntese *de novo* ao longo dos últimos anos, relacionada a produção de compostos de aroma de interesse industrial, realiza um panorama da pesquisa e as perspectivas futuras da produção de bioaromas. Além disso, o presente trabalho explora o uso de resíduos da agroindústria como ferramenta necessária para garantir um maior destaque na produção de aromas naturais por via biotecnológica, enfatizando os principais produtos obtidos por síntese *de novo*.

Aromas e alimentos

O aroma é conhecido como um fator importante na determinação da qualidade do gosto e do sabor de um alimento, onde sua percepção é um processo dinâmico de uma série de eventos e leva o consumidor à aceitação ou a rejeição de um produto.^{71, 85} Segundo a resolução nº 104, 14/05/1999 da ANVISA, os aromas são considerados como substâncias ou misturas de substâncias com propriedades odoríferas e/ou sápidas, capazes de conferir ou intensificar o aroma e/ou sabor dos alimentos podendo ser classificados em naturais ou sintéticos, sendo os primeiros obtidos exclusivamente mediante métodos físicos, microbiológicos ou enzimáticos.

Em sua maior parte, os compostos de aroma são produzidos via síntese química ou pela extração do material natural, das quais as plantas são as maiores fontes de óleos essenciais e aromas. A síntese química obtém compostos artificiais, não podendo

ser rotulados como “naturais”, o que representa uma desvantagem de marketing, devido ao interesse crescente dos consumidores por produtos naturais e saudáveis. Além disso, os métodos químicos não apresentam seletividade ao substrato, resultando em misturas racêmicas e aumento nos custos de purificação dos produtos.^{8,9,82,87} Por sua vez, a obtenção de aromas considerados naturais pode ser feita através de plantas e matrizes vegetais. Entretanto, diversos problemas estão associados a essa extração, como a baixa concentração dos compostos e o efeito de sazonalidade que implica na elevação do custo deste processo. Considerando estas variáveis, os processos biotecnológicos tornam-se extremamente interessantes e uma importante alternativa de mercado.⁸² Associado a isso, a produção biotecnológica de aromas gera, na maioria das vezes, uma menor carga de resíduos químicos, além da oportunidade de uso de resíduos agroindustriais nestes processos, seja para crescimento de biomassa ou como substrato no processo fermentativo.

Neste contexto, a produção de aromas baseada na biossíntese microbiana ou bioconversão têm sido estudada como uma alternativa diferenciada para obtenção de compostos de alto valor agregado e maior aceitação frente aos consumidores.^{60,100} Compostos de aroma produzidos biotecnologicamente tendem a substituir os compostos obtidos sinteticamente num futuro próximo. Em países europeus, essa transformação já está em curso. Isso se deve principalmente às vantagens que os processos biotecnológicos oferecem frente à síntese química, além da potencialidade destes processos em produzir compostos de aromas novos e com aplicações diversas na indústria, como demonstrado ao longo dessa revisão.

Produção biotecnológica de aromas: Bioaromas

O uso de micro-organismos para produção de aromas em alimentos existe há centenas de anos. Inicialmente, o processo fermentativo tinha como principal finalidade o aumento da vida de prateleira, pela liberação de ácidos e outros compostos, que garantiam uma maior conservação do produto. Porém, em alimentos e bebidas fermentadas, a ação dos micro-organismos não somente aumentava a vida de prateleira, como também tinha um papel fundamental na produção de aromas característicos do produto.⁴⁰

Baseada na história e na avançada experiência dos métodos de bioengenharia e engenharia genética de fermentações em escala industrial de compostos não voláteis, como ácidos orgânicos e aminoácidos, que contribuem para o sabor e aroma de diversos alimentos, a geração de aromas recebeu maior atenção nos últimos anos devido a diversos fatores. Dentre eles, destacam-se: (1) a crescente demanda industrial por compostos de aromas naturais, (2) a decrescente disponibilidade de aromas naturais obtidos por fontes vegetais, devido a problemas agrícolas ou ecológicos nos países produtores; (3) falta de alternativas quimiossintéticas convincentes e (4) rejeição dos consumidores por produtos que contenham aditivos não-naturais.¹

Em princípio há dois métodos de se produzir compostos de aroma biotecnologicamente: síntese *de novo* e biotransformação/bioconversão. O primeiro método implica na produção de compostos de aroma utilizando meios de cultura simples sem nenhuma adição de substratos especiais; já o segundo refere-se à síntese

de um ou vários compostos de aroma pela adição de seus precursores ao meio de cultura. Enquanto a síntese *de novo* utiliza todo o arsenal metabólico do micro-organismo e em geral produz uma mistura de vários compostos de aroma que são importantes para a formação do aroma ou *bouquet* do produto, a biotransformação/bioconversão tem por objetivo a obtenção de um produto principal. Enzimas microbianas, tanto construtivas quanto indutivas, podem ser responsáveis pela formação de compostos de aroma em um único passo reativo.^{7, 63} Outra forma de obtenção de compostos de aromas é o uso de célula vegetal,⁸⁶ que é menos explorada do que micro-organismos, mas que apresenta como principal vantagem o sistema enzimático mais complexo, que pode levar a produtos específicos. Levando-se em consideração que diversos trabalhos publicados recentemente abordam a produção de aromas através da biotransformação/bioconversão,^{9, 30, 33, 52} o foco desta revisão será abordar em maiores detalhes os principais grupos de compostos de aromas obtidos pela síntese *de novo* explorando as perspectivas que essa área desempenha para a produção de compostos naturais de elevado valor agregado.

Um dos primeiros relatos de micro-organismos produtores de aromas pela síntese *de novo* aconteceu na década de 1970, quando Tahara e colaboradores (1975) avaliaram a produção de aromas por *Sporobolomyces odor*. Os compostos de aromas formados na fermentação microbiana foram caracterizados como pertencentes às classes de aldeídos, alcoóis, ésteres e lactonas. Em 1976, Lanza e colaboradores verificaram a produção de compostos de aromas com característica frutal por *Ceratocystis fimbriata*, onde até hoje, diversos trabalhos podem ser encontrados

relacionados a esse micro-organismo para produção de aromas naturais.^{12, 13, 24, 25, 55,}

¹⁰⁰ A partir de então, a produção de compostos de aromas por síntese de novo apresentou uma intensificação dos estudos, e hoje, diversos trabalhos utilizam distintas linhagens e compostos voláteis produzidos por via microbiana. A Tabela 1 compila diversas classes de compostos de aroma obtidos por síntese *de novo*, bem como o gênero responsável pela produção.

Em geral, estes compostos de aroma são metabólitos secundários, ou seja, são substâncias produzidas por micro-organismos, que não são essenciais para o seu metabolismo.⁶³ Alguns fungos, como *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp., leveduras e bactérias, como *Rodococcus* sp. e *Pseudomonas* sp, também podem produzir compostos de aromas e fragâncias devido ao metabolismo secundário.² Estes compostos contribuem para a sobrevivência do micro-organismo, podendo inibir competitivamente espécies que poderiam ocupar o mesmo nicho.⁶³ Um dos exemplos clássicos é a produção biotecnológica de ésteres, que estaria relacionado com o mecanismo de remoção de ácidos e alcoóis da célula e do meio, que são tóxicos para a célula.⁹⁶

Além dos ésteres, importantes devido a suas descrições aromáticas, outros compostos de aromas característicos também serão abordados no presente artigo, como alcoóis, ácidos, aldeídos, terpenos, cetonas, pirazinas e compostos sulfurosos, bem como os substratos mais importantes para a obtenção destes compostos.

TABELA 1 – Classes de compostos de aroma produzidos por síntese *de novo* e os gêneros de fungos, bactérias e leveduras responsáveis pela produção

Micro-organismos	Classes de compostos de aroma
Fungos	
Aspergillus	Ácidos, alcoóis, terpenos
Cerastocystis	Terpenos, ésteres, alcoóis
Fusarium	Terpenos, lactonas
Geotrichum	Ésteres, lactonas
Trichoderma	Terpenos, ésteres, lactonas
Leveduras	
Dipodascus	Ésteres, alcoóis
Hansenula	Ésteres, alcoóis
Kluyveromyces	Terpenos, ésteres, alcoóis
Sporobolomyces	Lactonas
Saccharomyces	Terpenos, lactonas, ésteres e alcoóis
Bactéria	
Clostridium	Ésteres, alcoóis, ácidos
Corynebacterium	Pirazinas
Pseudomonas	Ésteres, pirazinas
Streptomyces	Terpenos, pirazinas

Fonte: Janssens *et al.*, 1992.

Metabolismo: Vias de formação de aromas

Como discutido anteriormente, a produção de aromas por síntese *de novo* não requer a adição de substratos especiais, entretanto, podem ser produzidos a partir de substratos como ácidos graxos, carboidratos, aminoácidos e outros, presentes no meio de cultura. Um panorama geral da formação de aromas pode ser visualizado na Figura 1.

As vias metabólicas decorrentes de cada substrato apresentam interações, seja nos mecanismos de produção ou nos produtos finais. Alguns precursores e produtos obtidos estão compilados na Tabela 2.

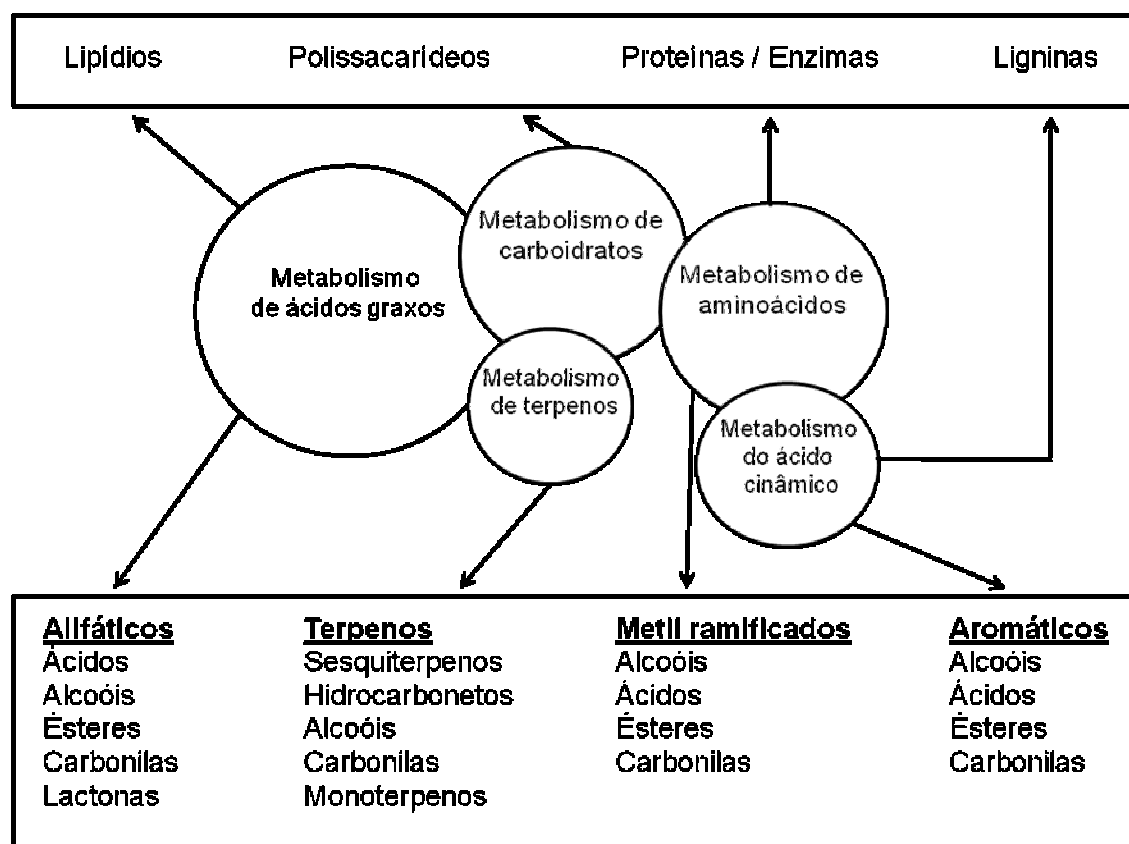


Figura 1 – Formação de compostos voláteis a partir de seus substratos (Tressl *et al.* 1975; Reineccius, 2005)

Tabela 2 – Precursores de compostos de aroma e seus respectivos produtos.

Nutriente	Compostos de Aroma
Carboidratos	Ácidos orgânicos: Ác. pirúvico, ác. acético, ác. propiônico, ác. butírico, ác. hexanóico, ác. octanóico
Glicose	
Frutose	Ésteres: Piruvatos, acetatos, propionatos, butiratos, hexanoatos, octanoatos
Sacarose	Álcoois: Etanol, propanol, butanol, hexanol, octanol
	Aldeídos: Acetaldeído, propanal, butanal, hexanal, octanal
	Terpenos: Monoterpenos, linalol, limoneno, α -pineno, citronelal, citral, geranial
Aminoácidos	Ác. pirúvico, acetaldeído, etanol
Alanina	Isopropanal, isopropanol, ác. α -ceto-isobutírico
Valina	3-metilbutanal, 3-metilbutanol, ác. α -ceto-isocapróico
Leucina	2-metilbutanal, 2-metilbutanol
Isoleucina	Benzaldeído, fenilacetaldeído, cinamaldeído
Fenilalanina	Hidrocinaldeído, <i>p</i> -hidroxibenzaldeído <i>p</i> -hidroxi-fenilacetaldeído, <i>p</i> -hidroxicinamaldeído
Serina	
Treonina	Ác. pirúvico

Glicina	Tiazóis
Cistina/Cisteína	Glioxal
Serina	
Ácidos graxos	trans-2-trans-4-Decadienal, hexanal, trans-2-octenal
Ác. Linoléico	trans-2-Pentanal, trans-2-hexenol, hexanal
	cis-3-Hexenal, cis-3-hexenol
	trans-2-trans-4-Heptadienal, propanal
Vitaminas	
Caroteno	
β-Caroteno	β-Ionona

Fonte: Salunkhe, 1976.

Formação de compostos de aroma pelo metabolismo de carboidratos

Durante a fermentação, a fonte de carbono é essencialmente utilizada para o crescimento dos micro-organismos, naturalmente presentes no substrato ou adicionados para a melhoria do processo.

Desta forma, a diversidade de compostos de aroma produzidos a partir do catabolismo da glicose não é muito amplo. Como resumido na Figura 2, o piruvato, resultante da oxidação da glicose pela glicólise, pode ser metabolizado a compostos como diacetil, acetoína, 2-3 butanodiol, etanol e acetaldeído. Os três primeiros, por exemplo, colaboram com odores característicos ao de manteiga, importantes para muitos produtos lácteos. O etanol, por sua vez, quando diluído possui um aroma semelhante ao de maçã e, em altas concentrações, oferece odores pungentes e penetrantes.³⁷

Os terpenos, importantes pela grande diversidade de aromas, por sua vez, derivam tanto do metabolismo de carboidratos como da oxidação de lipídios.³⁷

Formação de compostos de aroma pelo metabolismo de ácidos graxos

Diferente do metabolismo de glicose e carbono, a oxidação ou hidrólise de lipídios pode levar a fontes importantes de aromas. Como visualizado na Figura 3, os compostos voláteis podem ser originados a partir de lipídios seguindo diversas vias metabólicas diferentes, sendo que a via primária inclui a α - β -oxidação, além da oxidação por enzimas lipoxigenases.^{75,90}

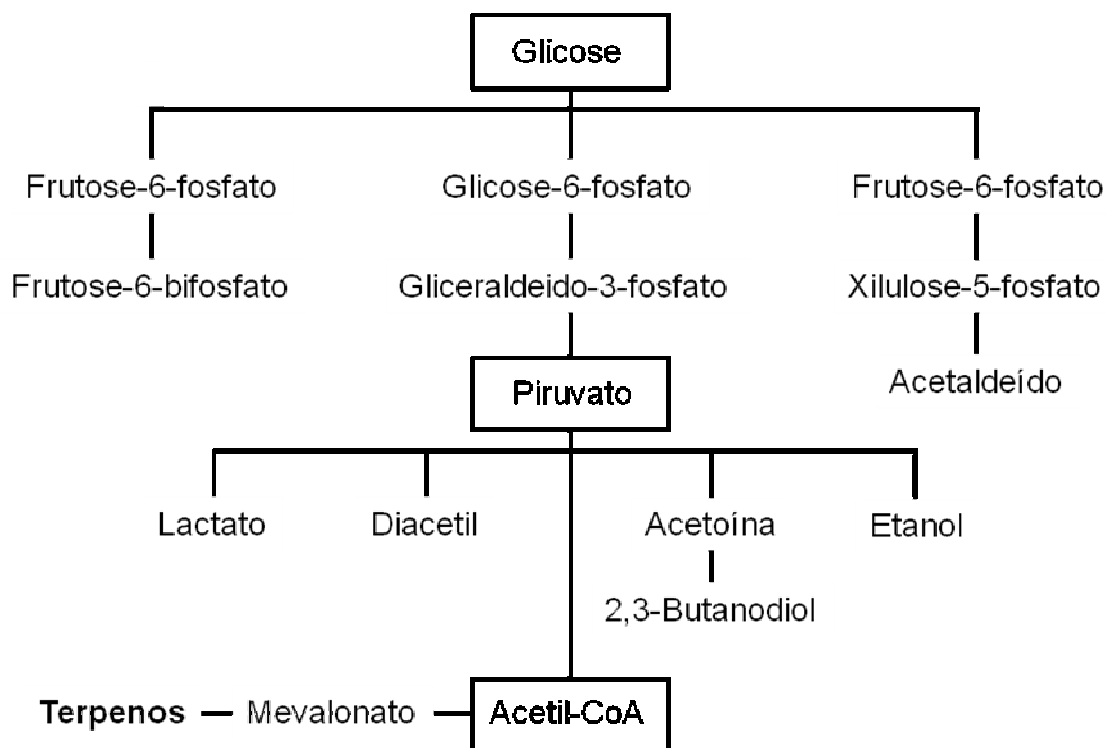


Figura 2 – Metabolismo de glicose/carbono para a formação de compostos de aroma e sabor. (Feron & Waché, 2005).

A lipólise de triglicerídeos pode gerar uma grande variedade de ácidos graxos que, por sua vez, podem contribuir diretamente para o perfil aromático de produtos fermentados. Os ácidos graxos de cadeia curta liberados podem conferir notas aromáticas de vinagre (ácido acético), cabra (ácido 4-etil octanóico) ou ranço (ácido butírico e octanóico) aos produtos.⁸⁸

Após a lipólise, os ácidos graxos de cadeia longa podem ser oxidados, originando diversos grupos de aroma, como metil cetonas, lactonas, aldeídos e alcoóis. A importância aromática destes compostos, bem como sua produção por síntese *de novo* serão relatadas na sequência.³⁷

As metil cetonas e as lactonas são formadas principalmente pela β -oxidação de ácidos graxos. Entretanto, a oxidação intracadeia de ácidos graxos também pode resultar na síntese de diferentes alcoóis e aldeídos (como visualizado na Figura 3).³⁷

Em particular, os ácidos linoléico e linolênico são os principais precursores de compostos de aroma, sendo que sua oxidação pode resultar em um grande número de compostos voláteis, como alcoóis, aldeídos, ácidos, ésteres e outros.^{72, 88}

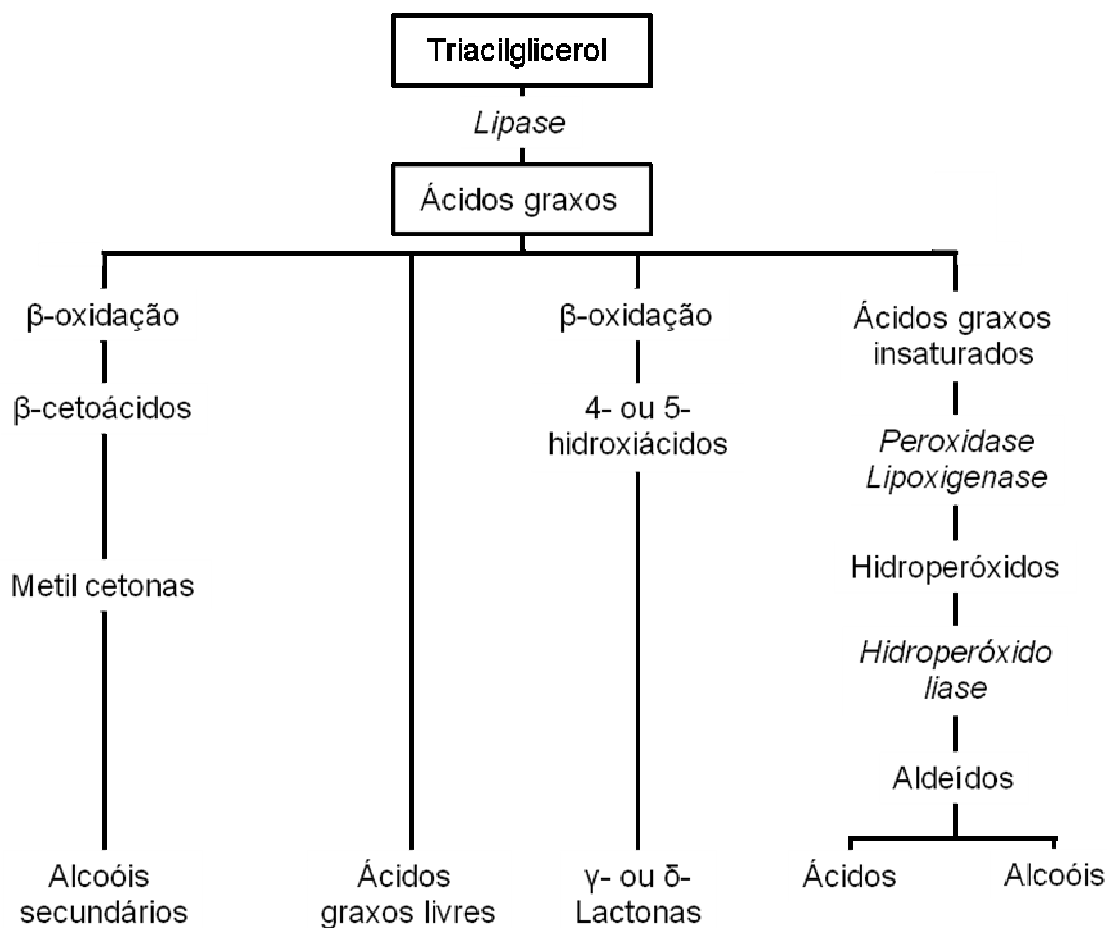


Figura 3 – Formação de compostos de aroma através do metabolismo de lipídios (adaptado de: Molimard & Spinnler, 1996; Feron & Waché, 2005).

Formação de compostos de aroma pelo metabolismo de aminoácidos

O metabolismo de aminoácidos é responsável pela obtenção de diferentes classes de compostos de aroma, como ésteres, alcoóis de cadeia ramificada, compostos sulfurados, aminas e mesmo alguns ácidos orgânicos, importantes para o sabor de diversos alimentos.^{120,121}

Os aminoácidos resultantes da degradação de peptídeos, por enzimas peptidases, estão sujeitos a reações de transaminação, desidrogenação, descarboxilação e redução, contribuindo diretamente para o aroma de alimentos fermentados.⁶²

Aminoácidos aromáticos, principalmente tirosina e fenilalanina, podem ser precursores importantes para a formação de compostos de aroma, com odores semelhantes ao de especiarias.⁸⁸

Além disso, outros compostos de aromas importantes, como as pirazinas, por exemplo, são sintetizadas a partir da treonina, por uma série de reações bioquímicas (redução, descarboxilação e hidratação).⁵⁶

A Figura 4 exemplifica as vias metabólicas envolvidas na obtenção de compostos de aroma, a partir de proteínas e aminoácidos como substratos.

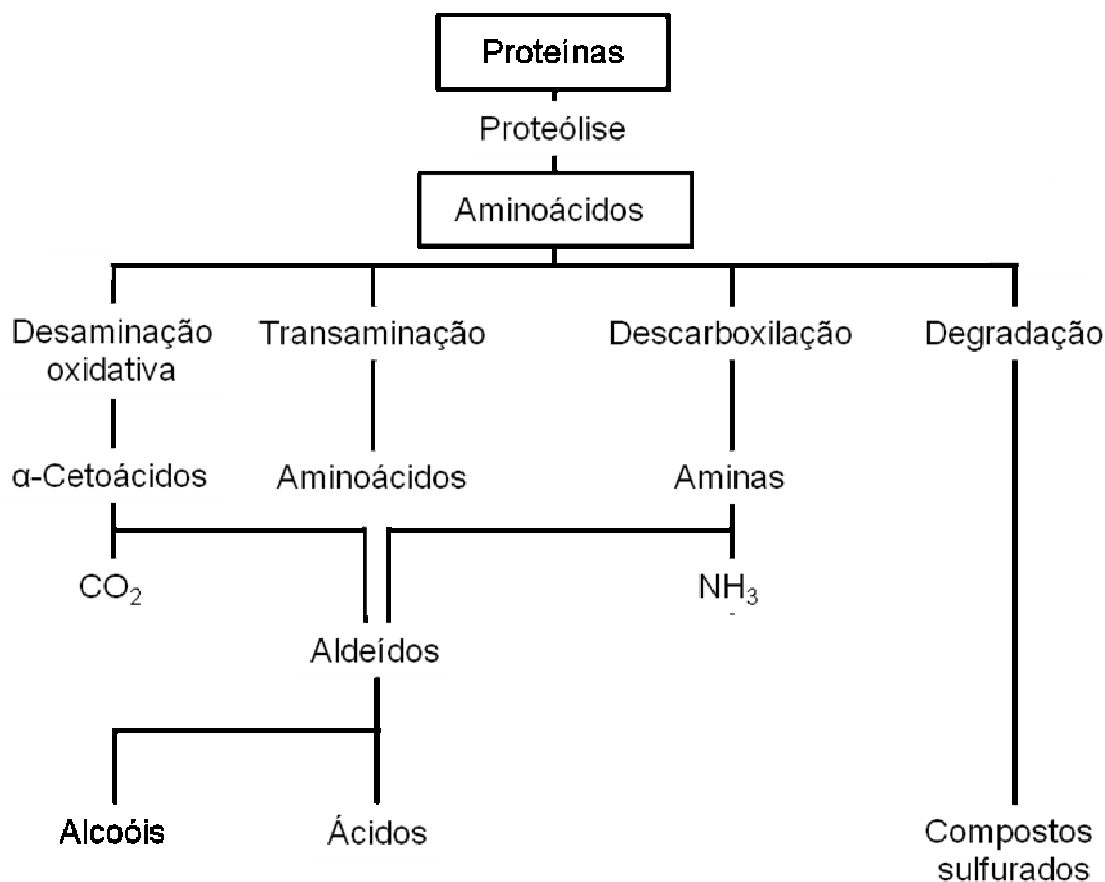


Figura 4 – Formação de compostos de aroma a partir do metabolismo de proteínas e aminoácidos (adaptado de: Molimard & Spinnler, 1996; Feron & Waché, 2005).

Principais classes de compostos de aroma

Ésteres

Os ésteres compreendem um dos mais importantes grupos de aroma e destacam-se por possuir um aroma frutal como de abacaxi, morango, pêra, pêssego, banana entre outros, floral, vinho e conhaque. São encontrados naturalmente em abacaxi, morango, maçã, kiwi, laranja, manga, mamão, figos,

uva, cacau, queijos, bebidas alcoólicas, manteiga, vinagre, leite, feijão, soja, milho, trigo, cogumelo, shoyo, carne curada, azeitona, Fenaroli, s handbook. Estes compostos podem ser empregados em diversos produtos como doces, geléias, compotas, produtos de panificação, saquê, vinho, gelatinas, balas, produtos de confeitaria, gomas de mascar, pudins, bebidas não alcoólicas, laticínios (manteiga, coalho, iogurte, queijo).^{16, 60} Além disso, têm um importante papel na formação do *bouquet* de bebidas alcoólicas, como vodka³⁵, cerveja²⁸ e vinho²⁸ sendo também importante para o aroma de frutas e chocolate.⁷

A produção biotecnológica de ésteres pode ocorrer por alcoolise de compostos acil-coA ou por esterificação de um ácido com um álcool.^{2, 7}

Alguns micro-organismos já foram relatados pela capacidade de produzir aromas frutais como o de maçã, provavelmente devido a formação de 3-metilbutil-3-metil butirato, um éster de forte aroma frutal.⁴⁷ A produção de hexanoato de etila por *Neurospora* foi explorada por diferentes grupos de pesquisa, destacando-se a produção através do uso do meio de cultura extrato de malte onde detectou-se forte aroma frutal.^{15, 81, 118, 119}

Ésteres de cadeia curta podem ser produzidos através da bioconversão de precursores apropriados. A conversão de 3-metilbutanol e 2-metilbutanol, por *Hansenula miakii*, nos seus acetatos correspondentes com alto rendimento, sendo o produto final usado como aroma natural de banana.^{39, 47, 122}

A levedura *Williopsis saturnus* mostrou-se capaz de sintetizar alguns ésteres (como por exemplo, ésteres voláteis de cadeia ramificada), utilizando precursores de custo acessível, como é o caso do álcool amílico, para melhoria do

processo de fermentação.¹¹⁴ Além deste biocatalisador, diversas outras linhagens de levedura são relatadas como produtoras de ésteres.⁴⁷

Soares *et al.* (2000) verificaram que, quando o meio de fermentação foi enriquecido com leucina, os voláteis resultantes revelaram um aroma intenso de banana, evidenciado principalmente pela presença de ésteres como acetato de isoamila. Além destes compostos, os autores identificaram uma grande diversidade de aldeídos e alcoóis, que colaboraram para o perfil aromático do produto.

A produção microbiana de diversos outros ésteres foi recentemente descrita em uma revisão como a produção de acetato de etila, acetato de propila, acetato de isobutila por *Ceratocysis moniliformis*.⁸³ e ésteres como butirato de etila, isovalerato de etila e hexanoato de etila, responsáveis por aromas frutais, podem ser produzidos por micro-organismos do gênero *Pseudomonas*.⁴⁷

Lactonas

As lactonas, ésteres cíclicos, são compostos com aromas agradáveis e de grande interesse industrial, geralmente associadas a odores descritos como frutal, coco, amanteigado, doce ou nozes.

Estes compostos podem ser produzidos pela síntese química, mas as diversas vantagens associadas a produção biotecnológica têm encorajado a sua produção por métodos fermentativos, empregando fungos e leveduras.⁴⁷

Diversos micro-organismos são capazes de produzir lactonas quando dispõem de um meio de cultura com nutrientes necessários. A levedura *Sporobolomyces odorus* (atualmente reconhecida como *Sporidiobolus*

salmonicolor) foi descrita como produtora de lactonas com notas aromáticas semelhantes ao aroma de pêssago. O composto majoritário responsável pelo aroma foi identificado como γ -decalactona, sendo que sua produção foi de 1,6 mg.L⁻¹ (cis-6-dodecen-4-olide).¹⁰⁸ Esta lactona é muito empregada em aromas e fragrancias devido ao seu aroma frutal, com threshold variando de 1 a 11 ppb.¹⁶

A linhagem fúngica *Trichoderma viridae*, por exemplo, foi catalisador da produção do composto 6-pentil-2-pirona, que alcançou cerca de 170 mg.L⁻¹. Esta lactona é caracterizada por um aroma intenso e semelhante ao de coco.¹²² Em concentrações elevadas, foi observado que este composto era capaz de inibir o micro-organismo empregado no processo e, desta forma, os autores propuseram um sistema de pervaporação, com membrana seletiva, para extrair continuamente a lactona do meio de cultura, evitando este fenômeno de inibição.⁴³

Sarris & Latrasse (1985) relataram que o micro-organismo *Fusarium poae* foi capaz de produzir uma lactona com aroma semelhante ao de pêssago, caracterizado predominantemente pelo composto cis-6-dodecen-4-olide.

Além disso, micro-organismos do gênero *Ceratocystis* e a levedura *Kluyveromyces lactis* ainda são capazes de produzir uma grande diversidade de terpenos e lactonas, com aroma frutal e floral de grande impacto.⁷⁸ Enquanto isso, *Candida* sp., *Saccharomyces* sp., *Penicillium notatum*, *Cladosporium butyri*, *Cl. suaveolens* e *Sarcina lutea* produziram lactonas quando cultivadas em meio contendo ceto-ácidos.⁴⁹

Sabe-se que a composição do meio de cultura e idade do inóculo geralmente influenciam a formação de compostos de aroma na síntese *de novo*. Lee *et al.* (1999) reportaram a formação de γ -decalactone, quando a cultura

Sporidiobolus salmonicolor cresceu em um meio suplementado com diversos nutrientes.

A produção de lactonas voláteis tem provado ser bem sucedida industrialmente¹⁸ e alguns exemplos incluem γ -nonalactona, γ -decalactona and δ -decalactona (que apresentam um consumo anual de aproximadamente 16.5 toneladas), γ -undecalactona and β -metil- γ -octalactona (lactona de whiskey), e outras.

Álcoois

Embora os alcoóis normalmente contribuam menos para o aroma, em concentrações adequadas podem contribuir significativamente para o perfil aromático do produto.⁶⁵ Podem conferir aroma de cogumelo, lavanda, terra, herbáceo e rosa.¹⁶

São encontrados naturalmente em cogumelos, lavanda, vinhos, maçã, damasco, suco de laranja, berries, tomate, folhas, batatas, gengibre, mel, café, cacau, manteiga, queijos, pães, uísque, rum, cerveja, cidra, conhaque e saquê, azeitona, trufas, vinagre, etc...)¹⁶

Podem ser utilizados em perfumes, bebidas em geral, gelatinas, balas, óleos, produtos de panificação, gomas de mascar e cosméticos.¹⁶

Alcoóis podem ser formados, a partir da via metabólica primária de um micro-organismo ou pela redução de uma carbonila ao álcool correspondente. Produção de álcool através do metabolismo de aminoácidos pode ocorrer por transaminação, descarboxilação e redução ou por desaminação seguida da descarboxilação e redução.⁴⁴

Berger (2009) relatou que estes compostos podem ser produzidos biotecnologicamente para gerar aromas naturais de caráter comercial. Desta forma, a produção de diversos alcoóis como, por exemplo, 1-octen-3-ol, composto de impacto do cogumelo,^{15, 112} tem sido relatado em diversos estudos.^{81, 118, 119}

Um dos mais importantes alcoóis é o 2-feniletanol, que possui aroma de rosa. Huang *et al.*, (2001) estudaram o efeito da temperatura, pH e agitação na produção de feniletanol por *Pichia fermentans*. Neste trabalho foi observado que a máxima produção ocorreu em torno de 16 horas de fermentação sendo esta informação muito útil em termos de economia de processo. Linhagens de *Kluyveromyces* também são conhecidas pela produção deste composto, sendo muito utilizado como aromatizante na indústria de alimentos e como fragrância na indústria de cosméticos e perfumes. É um composto que apresenta considerável interesse industrial,³⁶ podendo ser utilizado para modificar a composição do aroma de sorvete, balas, gelatinas, pudins, goma de mascar etc.^{36, 45, 112}

Além da sua importância como composto de aroma, os alcoóis também são importantes como precursores de ésteres e aldeídos que, por sua vez, colaboram com o perfil aromático de diversos compostos.

Ácidos e Aldeídos

Os ácidos são encontrados naturalmente em frutas como por exemplo maçã, uvas, abacaxi, abacate, mamão entre outras, em óleos de menta e hortelã¹⁶

A produção de ácidos por síntese *de novo* é muito visada comercialmente, tendo em vista que os produtos originados podem colaborar tanto com o aroma do produto quanto atuar como intermediário para a produção de novos compostos de

aroma. Como exemplo, algumas linhagens de *Acetobacter* sp. são capazes de sintetizar ácido metilbutírico, um precursor importante para a obtenção de ésteres.¹¹⁵

Armstrong *et al.* (1989) reportaram altos rendimentos de ácido cítrico, considerado um dos produtos mais empregado industrialmente como acidulante, conferindo sabor ácido e refrescante para alimentos e bebidas, produzido por linhagens de *Aspergillus niger*. A levedura *Geotrichum klebahnii* foi capaz de produzir uma mistura de ácidos carboxílicos e ésteres, que colaboraram com um aroma frutal agradável.^{46, 47}

O ácido metilbutírico pode ser encontrado na composição de diversos óleos, como de menta e hortelã, e frutas (como maçã, uva, mamão e abacaxi). Este ácido possui um threshold entre 10 e 60 ppb, com notas de abacaxi fermentado.¹⁶ Foi reportado que linhagens de *Acetobacter* são capazes de sintetizar o ácido metilbutírico. Apesar do seu interesse industrial, ele ainda pode ser utilizado como material de partida para a obtenção de outros ésteres aromáticos.¹¹⁵

Os aldeídos são encontrados naturalmente em produtos como queijo, pêssego, chá preto, amêndoa, damasco entre outros. São amplamente utilizados na indústria alimentícia e de perfumaria.¹⁶

Os aldeídos usualmente são formados *via* degradação de Strecker, no envolvimento de aminoácidos na reação de Maillard, contendo um átomo de carbono a menos que o aminoácido original.⁷³ Entretanto, algumas linhagens fúngicas têm o potencial de produzir quantidades significativas destes compostos,

onde se destacam o benzaldeído (aroma de amêndoas) e vanilina (aroma de baunilha) como os mais interessantes e empregados industrialmente.

A vanilina (3-metoxi-4-hidroxibenzaldeído) é um composto amplamente utilizado na indústria de alimentos e na preparação de algumas fragrâncias. Embora a extração da vanilina seja possível a partir das favas de baunilha (*Vanilla planifolia*), a vanilina sintética abastece a grande maioria do mercado, principalmente pela grande diferença observada no custo destes produtos, enquanto a vanilina produzida por síntese química é comercializada por US\$ 15 kg, a extraída naturalmente chega a US\$ 4000 kg.⁵⁹ Uma alternativa promissora para sua obtenção é pela *vía* biotecnológica através de extratos enzimáticos ou enzimas purificadas, micro-organismos e cultura de células de planta. Embora as maiores produções de vanilina natural estejam relacionadas a processos patenteados de biotransformação/bioconversão de precursores como ácido ferúlico e eugenol,²⁹ alguns processos descrevem sua obtenção a partir da síntese *de novo*.

Alguns autores propuseram a obtenção de vanilina a partir de glicose. Li e Frost (1998) mediram a transformação de D-glicose em ácido vanílico utilizando *Escherichia coli* recombinante, entretanto, precisaram adicionar uma enzima (aldeído desidrogenase) para reduzir este composto. Posteriormente, linhagem de *Schizosaccharomyces pombe* foi utilizada para obtenção de vanilina a partir da glicose mediante o emprego da engenharia genética.⁴²

O benzaldeído (odor de amêndoa) pode ser considerado como um composto aromático comercial muito importante para a indústria de alimentos, bebidas, aromas e cosméticos. Devido ao seu potencial aromático, com

características florais e doce, este composto é muito empregado como material de partida para a produção de um grande número de fragrâncias.¹⁶

O benzaldeído pode ser obtido de fontes naturais, como a extração e destilação de fontes botânicas, ou sintetizado a partir do cloreto de benzila. Além destas alternativas, diversas linhagens de basidiomicetos foram reportadas como produtoras deste composto por síntese *de novo*, como *Pleurotus sapidus*, *Polyporus* sp., e outros.⁵⁹ Berger et al. 1987 estudou a formação de um metoxi-benzaldeído pela linhagem *Ischnoderma benzoicum*.

Terpenos

Terpenos e seus derivados representam uma das classes de substâncias mais diversas na natureza, extensivamente aplicados em indústrias como compostos de aroma e de fragrâncias.⁹⁷ São freqüentemente os mais importantes componentes responsáveis pelo aroma característico dos óleos essenciais. Esses compostos apresentam interessantes descritores aromáticos, sendo: floral, fresco e frutado.

A grande maioria dos terpenos é produzida por Ascomicetos e Basidiomicetos, que são adequados aos processos biotecnológicos devido ao fato de crescerem tanto em meios sólidos como em meios líquidos, ambos de composição simples.⁴⁷

Micro-organismos como *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Aspergillus* e *Penicillium*, possuem grande capacidade de biotransformação e bioconversão de precursores de terpenos.⁹⁷ Por sua vez, *Ceratocystis* representa o gênero de micro-organismos de grande destaque para a produção de terpenos por síntese

de novo, como por exemplo, na produção de citrionelol, geraniol, linalol, nerol e α -terpineol.^{12, 55}

Cetonas

Butanona

Diversos compostos do tipo butanona são empregados na indústria de aromas, como por exemplo, a fenil 2-butanona (odor de flor), 1- 4-metóxfenil-2-propanona (aroma de gengibre, comumente reconhecida como gingerona) e a 4-hidróxfenil-2-butanona (aroma de framboesa, ou reconhecida como framboesa cetona). Embora esta última cetona possa ser sintetizada quimicamente, sua produção biotecnológica pode ser significativa quando mediada por espécies de *Nidularia* sp, cultivadas em meio adequado e preferencialmente rico em peptona.⁴¹

Outros compostos produzidos pela síntese *de novo* são diacetil e pentan-2,3-diona (dicetonas vicinais), que apresentam descritores de aromas característicos de amanteigado, mel ou café, e podem ser percebidos entre a concentração de 0,1-0,14 mg.L⁻¹.⁶⁶

Metil cetonas

Esta classe de compostos é de grande importância para o aroma de alimentos fermentados e, em especial, de algumas variedades de queijos. *Penicillium roqueforti* é um dos micro-organismos mais empregados para a formação de voláteis em queijos e, aparentemente, desenvolveu um mecanismo de detoxificação, capaz de converter ácidos graxos em metil cetonas, consideradas essenciais para o aroma de queijos como *blue cheese*.²⁷

Outros compostos

Pirazinas

As pirazinas estão presentes em produtos de soja, fermentados, cogumelo, cacau, amendoim, queijo, feijão e café. Conferem aroma de batata, terra, noz, produto fermentado, café, Estes compostos têm importância para as indústrias de bebidas, produtos assados, produtos cárneos, sobremesas lácteas geladas¹⁶

Do ponto de vista industrial, as pirazinas produzidas biotecnologicamente são de grande interesse, uma vez que as mudanças no processamento de alimentos influenciam diretamente na formação destes compostos e, desta forma, a adição de pirazinas naturais pode colaborar com o aroma do produto final.⁴⁷

Alguns micro-organismos são capazes de sintetizar esses compostos, como *Bacillus subtilis*⁵¹ e *Corynebacterium glutamicum*.³¹ Um mutante desta última linhagem foi capaz de converter certos aminoácidos, incluindo leucina, isoleucina e valina, em quantidades importantes de tetrametilpirazina, obtendo cerca de 3,0 g.L⁻¹ em 5 dias de fermentação, enquanto sua produção foi observada por *Bacillus subtilis* em meio rico em asparagina.³⁹ Este composto apresenta um odor de café fermentado e está presente em diversos tipos de queijo (suíço, camembert e gruyère), amendoim torrando, produtos à base de soja, cacau, café e outros.

A produção de outras pirazinas, como 2,5-dimetilpirazina (aroma semelhante ao de batata), 2,6-dimetilpirazina (semelhante ao de café) ou trimetilpirazina, foi relatada por linhagens de *Bacillus cereus*. A concentração destes compostos no meio foi inferior a 4 mg.L⁻¹, sendo que sua produção foi dependente das condições de temperatura e composição do meio de cultivo.³⁷

Compostos sulfurosos

Compostos sulfurosos normalmente com baixos limiares de detecção determinam o sabor de certas variedades de queijo, especialmente cheedar,⁸⁸ mas também são de interesse para aroma de alimentos e bebidas como carne, café, milho, laranja, maracujá, trufa, alho, cerveja, batata, frutas, gomas de mascar, sopas, balas, cerveja tipo lager, bolachas, condimentos e produtos derivados de carne.^{6, 16, 71, 112}

Compostos voláteis como 4-mercapto-4-metilpentan-2-ona, 3-mercapto-hexanol e 3-mercapto-hexil acetato influenciam a característica fruto-tropical do vinho *Sauvignon blanc*. Swiegers *et al.* (2009) estudaram diferentes linhagens de *Sacharomyces cerevisiae* frente a capacidade de produzir compostos de aroma com grupos tióis no vinho *Sauvignon blanc*. Os resultados demonstraram que vinhos com maior concentração de tióis apresentaram maior intensidade de aroma frutado e estes foram preferidos pela equipe de análise sensorial. Portanto, a escolha da linhagem oferece um grande potencial para modular perfis de aroma de vinho para estilos e especificações definidas pelo mercado de consumo pré-determinado.

Na tabela 3 é possível visualizar alguns compostos químicos com seus respectivos descritores sensoriais bem como os micro-organismos capazes de produzi-los.

Ciência, mercado e patentes: presente e futuro

Aromas e fragrâncias têm uma ampla aplicação nos setores de alimentos, alimentação, química, cosmética e farmacêutica.¹¹⁴ Hoje em dia, o mercado total de aromas e fragrâncias nos Estados Unidos da América é estimado em US\$ 18 bilhões, com oito grandes empresas globais, que partilham cerca de 60% do mercado mundial.⁴¹ Os maiores mercados encontram-se na Europa (36%) e América do Norte (32%), seguido pela região Ásia-Pacífico (26%).⁹⁸

No mercado mundial de aromas e fragrâncias movimenta um valor em torno de US\$ 20 bilhões onde menos de 10% da oferta é oriunda de bioprocessos.⁶ Entretanto, o mercado de aromas naturais vem ganhando espaço, devido ao fato principal dos produtos serem considerados naturais, vindo de encontro com uma tendência de mercado ávido por produtos naturais e saudáveis. Além da busca por produtos naturais, o consumidor também almeja produtos que sejam ecologicamente corretos. Neste sentido, um dos grandes problemas atuais é a geração de resíduos da agroindústria, que representa um importante problema ambiental.^{78,104} De acordo com Timofiecsyk e Pawlowsky (2000), o termo resíduo é utilizado em sentido amplo, englobando não somente sólidos como também os efluentes líquidos e os materiais presentes nas emissões atmosféricas.

Tabela 3- Classes químicas, alguns aromas produzidos por via biotecnológica, com a respectiva descrição aromática.

Classe química	Composto químico	Descritor aromático	Micro-organismos produtores	Referências
Ácidos	Ácidos carboxílicos	Frutal	<i>Geotrichum klebahnii</i>	46, 47
			<i>Hansenula anomala</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> ,	
Alcoóis	2-feniletanol	Rosa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Pichia fermentans</i> L-5	36, 45, 60
Alcoóis	1-octen-3-ol	Cogumelo, terra, herbácio, lavanda	<i>Neurospora</i> sp	15, 16, 81, 82, 118, 119
Ésteres	Hexanoato de etila	Frutal: morango, banana, butiá, abacaxi, pêssego, pêra	<i>Neurospora</i> sp. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15, 80, 81, 82, 118, 119
	Acetato de etila	Frutal, solvente, balsâmico, abacaxi	<i>Saccharomyces</i> SP. <i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Geotrichum fragans</i>	28, 69
Aldeídos	Vanilina	Baunilha	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	58
Cetonas	4-hidróxifenil-2-butanona	framboesa	<i>Nidularia</i> sp,	59
Terpenos	Citronelol	Floral	<i>Penicillium</i> sp	97

O resíduo industrial, depois de gerado, necessita de destino adequado, pois não pode ser acumulado indefinidamente no local em que foi produzido. A disposição destes no meio ambiente deve ocorrer após os resíduos serem tratados e se enquadrarem nos padrões estabelecidos na legislação ambiental.⁸⁴

El-Gohary e Abo-Elela (1987) realizaram um trabalho de monitoramento de efluentes de um complexo industrial que inclui indústrias de alimentos e concluíram que estes possuíam alta carga orgânica, segundo os resultados de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO) obtidos. Dessa forma, a preocupação com o meio ambiente leva a viabilização de projetos que levam a sustentabilidade do sistema de produção industrial.⁸⁴ Nos últimos anos o uso de resíduos em processos tem se tornado alvo de estudo em diversificadas linhas de pesquisa, como no uso em rações animais,^{11, 54, 66, 93, 117} re-utilização para elaboração de novos produtos, como ingredientes para a produção de alimentos como pão⁶⁸ e suco¹⁰, ou como meio de cultura ou substrato para processos biotecnológicos, visando a obtenção de produtos de maior valor agregado como enzimas^{26, 48} ácidos¹¹⁶, aromas, penicilina,⁶ proteína,⁹⁵ biofertilizante,²¹ biogás,^{53,110} bioinseticida,⁸⁴ biodiesel¹⁹ além de ajudar na redução do impacto ambiental.¹⁰⁴ Apesar das inúmeras utilizações de resíduos agroindústrias, focaremos, neste artigo, a produção de bioaromas.

Os resíduos podem ser sólidos ou líquidos, e a fermentação pode ser realizada em ambos, porém apresentam denominações distintas. O termo fermentação no estado sólido (FES), tradução do inglês "solid state fermentation", pode ser definido como a fermentação na qual o crescimento do micro-organismo

em substratos sólidos ocorre na ausência de líquido na forma livre. A água livre, indispensável ao crescimento dos micro-organismos, encontra-se adsorvida num suporte sólido ou complexada no interior de uma matriz sólida. A técnica de FES é conhecida pela sua produção de metabólitos, na maioria dos casos em níveis muito maiores que a fermentação submersa. Na fermentação submersa, o micro-organismo produtor se desenvolve no interior do meio de fermentação, geralmente sob agitação.⁸⁵ A FES é, geralmente, caracterizada por processos mais baratos e com uma ampla possibilidade de aproveitamento de resíduos agroindustriais, celulósicos ou amiláceos, como casca de café, bagaço de mandioca, entre outros.^{76,77}

Soccol e colaboradores (1997) depositaram uma Patente Industrial, demonstrando que a mistura de casca de café e bagaço de mandioca é uma alternativa viável para a produção de ácido giberélico por fermentação em estado sólido.^{4,22,101,102}

Recentemente, Pastore e colaboradores (2011) entraram com pedido de patente junto ao Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) onde utilizaram manipueira e bagaço de malte como substrato para a produção de hexanoato de etila demonstrando que a utilização desses resíduos para a produção de aroma frutal é factível.

Medeiros *et al.* 2000 utilizaram como substrato bagaço de mandioca e farelo de palma para o cultivo *Kluyveromyces marxianus* com o objetivo de produzir compostos de aroma. Ambos substratos foram viáveis sendo que no primeiro, suplementado com glicose, a produção de acetato de etila, responsável pelo

aroma frutal, foi maior alcançando uma produção de 1395 $\mu\text{mol/Lg}$, após 72 horas de fermentação.

Ceratocystis fimbriata tem potencial para sintetizar ésteres, possui crescimento rápido e produz uma variedade de aromas (pêssego, abacaxi, banana, citrus e rosa), dependendo da linhagem e das condições de cultivo. Soares *et al.*, 2000 utilizaram casca de café suplementado com glicose e obtiveram a produção de forte aroma de abacaxi utilizando *Ceratocystis fimbriata* e quando suplementaram com leucina obtiveram a produção de forte aroma de banana. Polpa cítrica, resíduo da indústria de suco cítrico, foi adequada como substrato para a produção de aroma por *Ceratocystis fimbriata* sendo o acetato de isoamila, aroma de banana de alto valor agregado para a indústria de alimentos, o composto majoritário, alcançando uma concentração de 1.66 $\mu\text{mol/L g}$.⁸⁹

Bramorski *et al.* (1998), empregando a linhagem *C. fimbriata*, compararam a produção de aromas frutais em diversos resíduos agroindustriais como meio de cultura (bagaço de mandioca, maçã, amaranto e soja). Quando os autores empregaram uma mistura entre os resíduos encontraram um aroma frutal intenso e, embora os compostos identificados fossem majoritariamente ésteres e álcoois, ainda foram identificados menores quantidades de aldeídos, ácidos e cetonas. O mesmo micro-organismo utilizando como substrato farelo de trigo, bagaço de mandioca e de cana de açúcar com uso de precursores (glicose, leucina e valina) produziram aroma frutal de banana, maçã, pêra.²⁴ De forma semelhante, o micro-organismo *Rhizopus oryzae* produziu diversos compostos voláteis em uma mistura de meios alternativos, sendo que em torno de 80% foi etanol e pequenas concentrações de aldeídos, ésteres e outros alcoóis.²³

Geotrichum fragans foi isolado de manipueira, resíduo líquido da indústria de mandioca, e utilizado para produção de aroma frutal. Dentre os compostos identificados estão 1-butanol, 3-metil 1-butanol (álcool isoamílico), fenil etanol, 2-metil 1-butanol, 1-3 butanodiol, acetato de etila e propionato de etila.²⁸

Pandey *et al.* (2000) cita o trabalho realizado por Soares, M. *et al.* (1999) onde foram utilizados resíduos do processamento de café como substrato para a produção de compostos de aroma por *Pachysolen tannophilus*. Esta levedura foi capaz de produzir um forte aroma alcoólico com nuances frutais. Juntamente com o etanol, composto majoritário, acetaldeído, acetato de etila, isobutanol, acetato de isoamila, etil-3-hexanoato, acetato de isobutila também foram produzidos dando um forte aroma de abacaxi.

Cinco resíduos agroindustriais (maçã, mandioca, girassol, cana de açúcar e palma grande) foram testados por fermentação em estado sólido, empregando ferramentas estatísticas para avaliar a produção de compostos voláteis. A linhagem *Kluyveromyces marxianus* produziu uma diversidade de compostos importantes, principalmente acetaldeído, etanol e acetato de etila.⁶⁹

Como citado anteriormente e discorrido ao longo desta revisão a aplicação de resíduos de agroindústrias em bioprocessos é uma forma de utilizar substratos alternativos e minimizar problemas de poluição que possam causar.⁷⁹ Além de processos utilizando resíduos agroindustriais o interesse na produção de aromas naturais via síntese *de novo* vem sendo demonstrada pelas patentes depositadas nos últimos anos. Desta forma, foi realizada uma busca nos bancos de patentes Derwent, Espacenet e USPTO a partir do ano 2000 visando um panorama do interesse por produção de aroma via síntese *de novo*. Existem patentes com o

objetivo de melhorar produtos como a depositada na Derwent por Enomoto *et al.* 2009, que descreve a forma de produzir cerveja adicionando glicogênio em um líquido constituído majoritariamente por glicose e sacarose obtendo-se um produto com excelente gosto e aroma e baixo conteúdo de carboidrato.

Rudometova & Nikiforova (2009) depositaram na mesma base a produção de coalho onde cloreto de cálcio e *Lactobacillus delbruckii* são adicionados ao leite pasteurizado e após a formação do coalho, uma suspensão de esporos de *Aspergillus niger*, ou *Penicillium notatum* ou *Penicillium roqueforti* é adicionada e fermentado por 2 a 7 dias e posteriormente seco. O uso deste produto permite produzir alimentos com intenso sabor de queijo.

Lopes *et al.*, 2005 patentearam o uso de linhagens *Saccharomyces cerevisiae* isoladas para a produção de rum branco com altas concentrações de álcool isoamílico, ácido capróico e etil hexanoato. As cepas isoladas possuem boa fermentação e conferem o aroma e sabor de aguardente de cana.

Dias & Loh, (2005) depositaram a invenção onde a partir da fermentação do soro de leite se obtém compostos estáveis ao calor podendo ser utilizados como aromatizante de queijo no preparo de alimentos.

Segundo Costa *et al.* (1999), a engenharia genética, conhecida como "nova ou moderna biotecnologia" é uma tendência tecnológica bastante atual, utilizada principalmente na agricultura e para o meio ambiente. Na área de alimentos, técnicas de engenharia genética são bastante comuns na manipulação de micro-organismos envolvidos principalmente em processos fermentativos da produção de pães, cerveja, vinho, iogurte, queijo, molhos de soja, entre outros. Embora exista preocupação dos consumidores a respeito do uso da engenharia genética

em alimentos, o conhecimento da influência da expressão gênica de diversos precursores e enzimas utilizadas na indústria de alimentos têm gerado excelentes perspectivas sobre a nova geração de bioprocessos relacionados a síntese de compostos de aroma.⁶ Por exemplo, existe especulação de que o uso de engenharia genética para a remoção do diacetil na cerveja, responsável por *off flavour*, através da inserção do gene que codifica a enzima α -aceto-lactato descarboxilase eliminaria a produção do precursor deste composto e o tempo de maturação não seria tão longo.³⁸

Enquanto a linhagem *Saccharomyces cerevisiae* produz poucos compostos derivados de precursores (cisteína, cistationina e metionina), outra linhagem na qual o gene de uma enzima triptofanase, obtido a partir de *E. coli*, foi inserido, utilizou os precursores produzindo aroma adicional de maracujá, oferecendo o potencial para melhorar os aromas em vinhos.¹⁰⁵

Uma enzima liase de *Lactococcus lactis* foi identificada em nível molecular, e clonada em *Escherichia coli*.⁶⁷ Esta enzima mostrou atividade com a L-metionina desempenhando um papel significativo no desenvolvimento de uma série de compostos responsáveis pelo aroma de queijo.

Uma linhagem de levedura recombinante expressando o gene que codifica para a β -(1,4) endoxilânase a partir *Aspergillus nidulans* foi comparada com linhagem controle e foi constatado que a levedura modificada foi capaz de secretar a enzima xilânase no meio de cultura. Não houve diferenças nas características físico-químicas, embora um aumento no aroma frutado tenha sido detectado no vinho produzido pela levedura recombinante. Além disso, um aumento na

concentração de alguns ésteres, alcoóis superiores e terpenos foi observado no caso da linhagem modificada.²⁰

Considerações finais

A produção biotecnológica de aromas por síntese *de novo* pode colaborar diretamente para a expansão do mercado de aromas naturais, tendo em vista que o estudo de novos compostos de aroma é de grande importância para permitir inovações no mercado e conferir maior valor agregado aos mais diversos produtos.

Neste intuito, a produção 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, como por exemplo a otimização do processo fermentativo utilizando planejamento experimental, 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. Este último exemplo pode ser responsável pela melhoria considerável na eficiência do processo de síntese *De novo* e as vias metabólicas alcançadas podem levar a obtenção de novos compostos de aroma.

Referências bibliográficas

1. Aditivos & Ingredientes. Produção biotécnica de aromas. http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/95.pdf, acessada em novembro de 2010.
2. Armstrong, D.W.; Brown, L.A. Aliphatic, aromatic and lactone compounds. In: Bioprocess production of flavor, fragrance and color ingredients. Ed. Alan Gabelman, 1994.
3. Armstrong D.W.; Gillies B.; Yamazaki H. Natural flavors produced by biotechnological processing. In: Teranishi R, Buttery RG, Shahidi F eds. Flavour Chemistry, Trends and Developments. Washington, DC: Amer. Chem. Soc. 1989.
4. Ayala, L.; *Dissertação de mestrado*, Universidade Federal do Paraná, Brasil, 1996.
5. Barana, A. C. *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de São Paulo, Brasil, 2000.
6. Barrios-González, J.; Tomasini, A.; Viniegra-González, J.; López, J. Biotechnol. Lett., **1988**, 10, 11, 793.
6. Berger, R. G. Biotechnol. Lett. **2009**, 31, 1651.
7. Berger, R.G. Aroma biotechnology. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag., 1995.
8. Bicas, J. L.; Dionísio, A. P.; Pastore, G. M. Chem. Rev. **2009**, 109, 9, 4518.
9. Bicas, J. L.; J. C. Silva; Dionísio, A.P.; Pastore, G.M. Ciênc. Tecnol. Aliment. **2010**, 30, 7.
10. Borges, C. D.; Chim, J. F.; Leitão, A. M.; Luvielmo, M. M. CEPPA, **2004**, 22, 1, 23.

11. Bourscheidt, C. T.; Oliveira, B. H.; Silva, G. M. C. Anais do II Encontro de Divulgação científica e tecnológica, **2010**, 41.
12. Bluemke, W.; Schraderb, J. Biomol. Eng. **2001**, 17, 137.
13. Bramorski, A.; Soccol, C. R.; Christen, P.; Revah, S. Rev. Microbiol. **1998**, 28, 3, 208.
14. BRASIL. Resolução nº 104, 14/05/1999 da ANVISA. Regulamento técnico sobre aditivos aromatizantes / aromas. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, seção 1, n.92, p.43, 17 de maio 1999. Seção 1.
15. Brigido, B. M.; *Dissertação de mestrado*. Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2000.
16. Burdock, G.A., Fenaroli, G. (2010). Fenaroli's handbook of flavor ingredients, 6th ed., CRC Press, Boca Raton.
17. Cabral Filho, S. L. S. *Dissertação de mestrado*. Universidade de São Paulo, Brasil, 1999.
18. Cardillo, R., Fungarnti, C., Sacerdote, G., Barbeni, M., Cabella, P., and Squarcia, F. Eur. Pat. No 356,291. **1990**.
19. Canakci, M. Bioresor. Tecnol., **2007**, 98, 183.
20. Canga, M. A.; Pinãga, F.; Vallés, S.; Ramón, D., Querol, A. Int. J. Food Microbiol. **1999**, 47, 171.
21. Cardoso, E. ; *Dissertação de mestrado*. Universidade do Extremo Sul Catarinense, Brasil, 2005.
22. Carta, F. S.; *Dissertação de mestrado*. Universidade Federal do Paraná, Brasil, 1999.

23. Christen, P.; Bramorski, A.; Revah, S.; Soccol, C. R. *Bioresour. Technol.*, **2000**, 71, 211.
24. Christen, P.; Meza, J. C.; Revah, S. *Micol. Res.* **1997**, 101, 8, 911.
25. Christen P and Rainbault M. *Biotechnol Lett.*, **1991**, 13, 521.
26. Coelho, M. A. Z.; Leite, S. G. F.; Rosa, M. F.; Furtado, A. A. L. *CEPPA*, **2001**, 19, 1, 33.
27. Costa, M. C., Deliza, R., Rosenthal, A. B. *CEPPA*, **1999**, 17, 2, 187.
28. Damasceno, S.; Cereda, M. P., Pastore, G. M.; Oliveira, J. G. *Process Biochem.* **2003**, 39, 411.
29. Daugsch, A; Pastore, P. *Quim. Nova*, **2005**, 28, 4, 642.
30. De Carvalho, C. C. C. R.; Da Fonseca; M. M. R. *Biotechnol. Adv.* **2006**, 24, 2, 134.
31. Demain, A. L.; Jackson, M.; Trenner, N. R. *Journal of Bacteriology*, **1967**, 94, 2, 323.
32. Dias, B. E.; Loh, J. P.; USPTO. 11/217, 830, 2005.
33. Duetz, W. A.; Bouwmeester, H.; Van Beilen, J. B.; Witholt, B. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, 61, 4, 269.
34. El-Gohary, F. A.; Abo-Elela, S.I. *The Science of Total Environment.*, **1987**, 66, 203.
35. Enomoto, K.; Itakura, K.; Okane, O.; Takada, M.; Uehara A.; Wakui, K.; Yamamoto, K.; Ogane, O.; Itakura, T.; Yamamoto, T. Derwent JP4260207-B1; WO2009069317-A1 ; JP2009131202-A 2009.
36. Fabre, C. E.; Blanc, P. J.; Goma, G. *Biotechnol. Prog*, **1998**, 14, 270.

37. Feron, G., Waché, Y. In: Food Biotechnology (Eds: Shetty K., Paliyath G., Pometto A., Robert R.E.). 2 ed. CRC Press, 2005.
38. Gabelman, A. Bioprocess production of flavor, fragrance, and color ingredients. Wiley, New York. 1994.
39. Gatfield, I. L. Food Technol. **1988**, 42, 10, 110.
40. Gatfield, I. L. Perfumer & Flavorist. **1995**, 20, 5.
41. Guentert, M.. In Flavors and Fragrances (Berger, R.G., ed). Berlin: Springer, 2007.
42. Hansen, E. H.; Møller, B. L.; Kock, G. R., Bünner, C. M., Kristensen, C., Jensen, O. R., Okkels, F. T., Olsen, C. E., Motawia, M. S., Hansen, J. Appl. Environ. Microbiol. **2009**, 2765.
43. Häusler, A., Münch, T., ASM News, **1997**, 63, 551.
44. Heath, H. B.; Reineccius, G. Flavor chemistry and Tecnology. 1986
45. Huang, C.-Jr; Lee, S.-L.; Chou, C.-C. Food Res. Int. **2001**, 34, 277.
46. Janssens L, Depooter HL, De Mey L, Vandamme EJ and Schamp NM, Med Fac Landbouwwet, Rijksuniv Gent, 1989, 54(4a), 1387.
47. Janssens, L., Pooter, H. L. De; Schamp, N. M.; Vandamme, E. J. Process Biochem. **1992** , 27, 195.
48. Katapodis, P.; Christakopoulos, V.; Kekos, D.; Christakopoulos, P. Biochem. Eng. J. **2007**, 35,136.
49. Kempler, G. M. Adv. Appl. Microbiol. **1983**, 29, 29.
50. Kłosowski and Czuprynski, 2006. J. Food Eng. **2006**, 72, 242.
50. Kosuge, T.; Kamiya, H. Nature, **1962**, 193, 776.
52. Krings, U.; Berger, R.G. Appl Microbiol Biotechnol, **1998**, 49, 1.

53. Kuczman, O.; Gomes, S. D.; Tavares, M. H. F.; Torres, D. G. B.; Alcântara, M. S. Eng. Agríc., **2011**, 31, 1, 143.
54. Lallo, F.H.; Prado, I. N.; Nascimento, W. G.; Zeoula, L. M.; Moreira, F. B.; Wada, F. Y. R. Bras. Zootec., **2003**, 32, 3, 719.
55. Lanza, E.; Ko, K. H.; Palmer, J. K. J. Agric. Food Chem. **1976**, 24, 6, 1247.
56. Larroche, C., I. Besson, J.-B. Gros. H. Proc. Biochem., **1999**, 34, 667.
57. Lee S. L., Chou C. C. J Ferment Bioeng. **1994**, 78, 114.
58. Liu, K.; Frost, J.; J. Am. Chem. Soc. **1998**, 120, 10545.
59. Lomascolo, A.; Stentelaire, C.; Asther, M.; Lesage-meessen, L. Trends in Biotechnol. **1999**, 17, 282.
60. Longo, M. A.; Sanromán, M. A. Food Technol. Biotechnol. **2006**, 4, 3, 335.
61. Lopes, B. R.; de Miranda, C. I.; Gomes I.; Coutrim M. X.; de Araujo V. M. Derwent. BR200304436-A. 2005.
62. Marilley, L., M.G. Casey. Int. J. Food Microbiol., **2004**, 90, 139.
63. Maróstica Junior, M.R. *Tese de doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2006.
64. Marostica Junior, M.R. Pastore, G. M. Food Science Biotechnol., **2007**, 16, 1, 37.
65. Marques, D. B.; Pastore, G. M. Bol. SBCTA. **1999**, 33, 1, 80.
66. Marques, J. A.; Prado, I. N.; Zeoula, L. M.; Alcade, C. R. Rev. Bras. Zootec., **2000**, 29, 5, 1528.
67. Martinez-Cuesta, M.C.; Pelaez, C.; Eagles, J.; Gasson, M.J.; Requena, T.; Hanniffy, S. B.; Appl. Environ. Microbiol. **2006**, 72, 4878.

68. Mattos, C. *Monografia*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2010.
69. Medeiros, A. B. P.; Pandey, A.; Freitas, R. J. S.; Crhisten, P.; Soccol, C. R. *Biochem. Eng. J.* **2000**, 6, 33.
70. Mello, E. T.; Pawlowsky, U. 2003. *Engenharia Sanitária e Ambiental*. 8, 4, 249
71. Mestres, M.; Bristo, O.; Guash, J., *J. Chromatogr. A.* **2000**, 881, 569.
72. Molimard, P., H.E. Spinnler. *J. Dairy Sci.*, **1996**, 79,169.
73. Mottram, D. Washington, DC: Blackie Academic and Professional. 1994.
74. Nitskie, M.. *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2004.
75. Paillard, N.M., In *Food Flavours Part C: The Flavour of Fruit*, A.J. McLeod, Ed., Elsevier, Amsterdam, 1990.
76. Pandey, A.; *Process Biochem.* **1992**, 27, 109.
77. Pandey, A.; Soccol, C. R.; Rodriguez-Leon, J. A; Nigram, P. Asistech Publishers Inc., 2001.
78. Pandey, A; Soccol, C.R.; Mitchell, D. *Process Biochem.* **2000**, 35,1153.
79. Pandey, A.; Soccol, C.R.; Nigam, P.; Brand, D.; Mohan, R.; Roussos S.. *Biochem. Eng. J.* **2000**, 6, 153.
80. Pastore, G. M., Carvalho, D. S. de; Molina, G., Dionisio, A.P. INPI, nº protocolo: 018110015038, Brasil, 2011.
81. Pastore, G. M.; Park, Y. K.; Min, D. B. *Mycol. Res.* **1994**, 98, 11, 1300.
82. Pastore, G. M.; Pinheiro, D.M. In: Maria Regina Bueno Franco. Varella: São Paulo, 2004.

83. Park, Y. C.; Shaffer , C. E. H.; Bennett, G. N; Appl. Microbiol. Biotechnol. **2009**, 85, 13.
84. Pelizer, L. H.; Pontieri, M. H.; Moraes, I. de O. J. Technol. Manag. Innov., **2007**, 2, 1, 118.
85. Pereira, D.C. *Dissertação de mestrado*, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 2007.
86. Petersen, R. Z. *Tese de doutorado*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2006.
87. Pinheiro, D. M., *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2004.
88. Reineccius, G. Flavor Chemistry and Technology. 2 edição. CRC Press, 2005.
89. Rossi, S. C.; Vandenberghe, L. P. S.; Pereira, B. M. P.; Gago, F. D.; Rizzolo, J. A.; Pandey, A.; Socool, C. R.; Medeiros, A. B. P. Food Res. Int., **2009**, 42, 484.
90. Rowan, D., J.M. Allen, S. Fielder, Hunt, M., J. Agric. Food Chem., **1999**, 47, 2553.
91. Rudometova, N. V., Nikiforova, T. A. RU2341094-C2 , 2009
92. Salunkhe, D.K., J.Y. Do, Crit. Reviews Food Sci. Nutrit.,**1976**, 8, 2, 161.
93. Santos, G. T.; Ítavo, L. C. V.; Modesto, E. C.; Jobim, C. C.; Damasceno, J. C. Anais do Simpósio sobre Produção e Utilização de forragens conservadas. **2001**, 262.
94. Sarris, J. & Latrasse, A. Agric. Biol. Chem. **1985**, 49, 3227.
95. Shojaosadati, S. A.; Faraidouni, R.; Madadi-Nouei, A.; Mohamadpour, I. Resour. Conserv. Recycl., **1999**, 27, 1, 73.

96. Scharpf, J.G.; Seitz, E.W.; Morris, J.A., Farbood, M.I. In: Biogenesis of aromas, Washington, DC, ACS Symposium Series, 317, p. 323-346, 1986.
97. Schrader, J.; Berger, R. G. Biotechnological production of terpenoid flavor and fragrance compounds. Wiley – VCH, 2001.
98. Schwab, W.; Davidovich-Rikanati, R.; Lewinsohn, E. The Plant Journal, **2008**, 54,4, 712.
99. Smogroviková, D.; Domény, Z. Process Biochem. **1999**, 34, 785-794.
100. Soares, M.; Christen, P.; Pandey, A. Process Biochem. **2000**, 35, 857-861.
101. Soccol, C. R. In: International Training Course – Solid State Fermentation. Curitiba, 1997.
102. Soccol, C. R. In: International Training Course – Solid State Fermentation. Curitiba, 1997.
103. Soccol, C. R.; Machado, C. M. M.; Oliveira, H. Patente Industrial no 525-8, Brasil, 2000.
104. Soccol, C. R.; Vandenberghe, L. P. S. Biochem. Eng. J. **2003**, 13, 20.
105. Swiegers, J. H.; Capone, D. L.; Pardon, K. H.; Elsey, G. M.; Sefton, M. A., Francis, I. L.; Pretorius, I. S. Yeast, **2007**, 24, 561.
106. Swiegers, J. H.; Kievit, R. L.; Siebert, T.; Lattey, K. A. ; Bramley, B.R.; Francis, I. L.; King, E. S.; Pretorius, I. S. Food Microbiol. **2009**, 26, 204.
107. Tahara S.; Fujiwara K.; Ishizaka H.; Mizutani J.; Obata Y. Agric Biol Chem **1972**, 37, 2585.
108. Tahara, S.; Mizutani, J. Agric. Biol. Chem., **1975**, 39, 1, 281.
109. Timofiecsyk, F.R. ; Pawlowsky, CEPPA, **2000**, 18, 2, 221.

110. Toledo, A. R. C.; Miranda, R. M. B.; Santos, M. B.; Farias, E. D.; Cezar, V. R. Anais do 1º Simpósio Alagoano de Gestão Ambiental, **2010**, 51.
111. Tressl, R., Holzer, M., Apetz, M., In Aroma Research, H. Maarse, P.J. Groenen, Eds., Wageningen, Netherlands, 1975, p. 41.
112. Uenojo, M. *Dissertação de mestrado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2003.
113. Valduga, E. *Tese de doutorado*, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 2005.
114. Vandamme, E. J. Fungal Diversity, **2003**, 13, 153.
115. Vandamme, E. J.; Soetaert, W. J. Chem. Technol. Biotechnol. **2002**, 77, 1323.
116. Vandenberg, L. P. S.; Soccol, C. R., Pandey, A., Lebeault, J. M. Bioresour. Technol., **2000**, 34, 175.
117. Vieira, A. A.; Braz, J. M. Ver. Eletr. Nutritime, **2009**, 6, 3, 973.
118. Yamauch, H.; Obata, T.; Amachi, T.; Hara, S. Agric. Biol. Chem, **1991**, 55, 12, 3115.
119. Yoshizawa, K.; Yamauchi, H.; Hasuo T.; Akita, O.; Hara, S. Agric. Biol. Chem, **1988**, 52, 8, 2129.
120. Yu, M.H., Olson, L.E., Salunkhe, D.K., Phytochem., **1968**, 7, 561.
121. Yu, M.H., Olson, L.E., Salunkhe, D.K., Plant Cell Physiol., **1968**, 9, 633.
122. Welsh F.W.; Murray W.D.; Williams R.E. Crit Rev Biotechnol **1989**, 9, 105.

CAPÍTULO 2

Este artigo sera submetido ao periódico Food Chemistry

CAPÍTULO 2

PRODUCTION OF ETHYL HEXANOATE BY *Neurospora* SPECIES ISOLATED FROM BEIJU IN DIFFERENT CULTURE MEDIUM

ABSTRACT

The genus *Neurospora* is reported as a producer of ethyl hexanoate, an ester characterized by their pleasant and strong fruity aroma and that is applied in diverse food products. Four strains of *Neurospora* sp (LB12DSC, LB13DSC, LB23DSC and LB26DSC) isolated from beiju, a naturally fermented cassava mass, were evaluated for the production capacity of aroma in different culture medium. Moreover, some validation parameters were evaluated. The fruity aroma was identified as ethyl hexanoate by GC-MS. The results confirmed that the extraction method was adequate to determinate the target compound in culture medium with *Neurospora* sp. The results shown that the best medium for the production of fruity aroma was malt extract and the concentration reached up to 8 mg.L⁻¹ in 24 hours of fermentation. The strain LB23DSC showed the best yields of ethyl hexanoate, and was identified as *Neurospora sitophila* FGSC1135.

Keywords: frutal aroma, *de novo* syntheses, malt extract.

1. Introduction

The biotechnological generation of natural aroma compounds is rapidly expanding (Krings, Berger, 1998). More recently, the field was stimulated by the increasing preference of consumers for products bearing the label “natural”, and by the vivid discussion on healthy and “function” food ingredients (Berger, 2009). Biotechnological production is an attractive alternative for the production of flavors, since it occurs at mild conditions, presents high regio- and enantio-selectivity, does not generate toxic wastes and the products obtained may be labeled as “natural”. In this sense, biotechnology is an interesting approach for the production of bioflavors, since these compounds are defined as “natural” flavors (Bicas, *et al.* 2010), and encouraged companies to direct their attention towards flavor compounds of biological origin (Janssens *et al.*, 1992).

Several articles focused in the exploitation of the microbial capacity to produce aroma compounds by biotransformation or *de novo* synthesis. The last one represents an important strategy to produce fruit aroma compounds, mostly represented by esters, which is appreciated in the flavor industry (Longo, Sanromán, 2006 and Gatfield, 1988). The application of these compounds are diversity, such as in fruit-flavored products (*i.e.* beverages, candies, jellies, and jams), baked goods, wines, and dairy products - *i.e.* cultured butter, sour cream, yogurt, and cheese (Longo, Sanromán, 2006).

Different groups of fungi have been reported as producers of volatile fruity aromas during growth in culture medium (Pastore, *et al.* 1994). Among them, the genus *Neurospora* have received extensive attention due to their powerful production of a pleasant and fruity odour, subsequently identified as ethyl hexanoate by Pastore *et*

al. (1994), Yamauchi *et al.* (1989; 1991) and Yoshizawa *et al.* (1988). However, there is little information in the literature regarding some parameters of validation and ethyl hexanoate production using different culture medium. In this work, four fungal strains were evaluated under four different carbon sources to produce ethyl hexanoate, and analytical method for the volatile extraction was developed and validated. Thus, the best producer strain was identified using molecular tools.

2. Materials and methods

2.1 Standards and reagents

Diethyl ether, dichloromethane, hexane and glucose were purchased from Merck (Germany); ethyl acetate, sucrose, fructose, NaCl, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KCl, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ from Synth (Brazil); aliphatic hydrocarbons standards ($\text{C}_5\text{--C}_{20}$) from PolyScience (USA); malt extract broth, peptone, yeast extract from Oxoid (England); 2-heptanol from Aldrich Chemical Company (USA) and ethyl hexanoate (ethyl caproate) from Acros Organics (USA) were used.

2.2 Isolation of Neurospora sp. from beiju

Samples of beiju were collected in regions of the state of Maranhão, Brazil. Approximately 10 g of beiju were crushed and 1 g of powder was suspended in 100 mL of sterile water. An inoculum of 0.1 mL of suspension was transferred to Petri dishes containing potato dextrose agar (PDA) medium. After 24 h-incubation at 30 °C, the spores of *Neurospora* sp. were transferred for other petri dishes PDA medium until completely isolated. The cultures isolated were transferred to a slant

tube of the same culture medium and were deposited in the Bioflavours Laboratory culture collection, State University from Campinas, Brazil.

2.3 Culture mediums

Four culture medium were used for aroma production: **(1)** malt extract broth (50 g.L⁻¹ of malt extract); **(2)** yeast malt broth (YM: 10 g.L⁻¹ of glucose, 5 g.L⁻¹ of peptone, 3 g.L⁻¹ of yeast extract and 3 g.L⁻¹ of malt extract); **(3)** fructose (50 g.L⁻¹) and yeast extract (5 g.L⁻¹); and **(4)** Czapeck medium standard, with some modifications (40.6 g.L⁻¹ of NH₄H₂PO₄, 10g.L⁻¹ of K₂HPO₄, 5 g.L⁻¹ of MgSO₄.7H₂O, 5 g.L⁻¹ of KCl, 0.01 g.L⁻¹ of FeSO₄.7H₂O and 30 g.L⁻¹ of sucrose). (Brigido, 2000)

2.4 Preparation of pre-inoculum and fermentation

Neurospora sitophila was inoculated into a slant tube of Potato Dextrose agar (PDA) at 30°C for 72h. After fungal growth, a spore suspension was prepared by adding 10 mL of sterile water into the tube and scraping the mycelia. All its volume was transferred for 250 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of Yeast Malt Broth (YM: 10g.L⁻¹ glucose, 5g.L⁻¹ peptone, 3g.L⁻¹ yeast extract, 3g.L⁻¹ malt extract). This flask was subsequently transferred to an orbital shaker operating at 30°C and 200 rpm for 24 h for fungal growth. After this period the culture broth was filtered through a membrane of acetate filter (pore size: 0.45µm - Sartorius) and the mycelia were washed with sterile water before being used as inoculum in the fermentation experiments.

The inoculum consisted of 1 g. of the biomass added in a flask containing 50 mL of each medium described above and homogenized under sterile conditions using

an Ultra-Turrax ® T18 (Ika, Wilmington, NC, USA). The flasks were incubated on a rotary shaker at 30 °C for until 144 h under agitation (200 rpm). Samples were extracted using solvent and analyzed in gas chromatography (GC-FID) after 24, 48, 72, 96, 120 and 144 hours.

2.5 Liquid-liquid extraction

For the analysis of the volatile compound, 5 mL of cultured broth were collected into tube with 0.1g NaCl. After agitation in vortex (10 s.) they were extracted with 1 mL of diethyl ether containing 0.003% of 2-heptanol as an internal standard. The mixture was agitated in vortex for 30 seconds and one microliter of the organic extracts was analyzed by GC-FID. In this work, different solvents and volumes of solvents, weigh or volume of sample, and salt amounts were analyzed to develop the liquid-liquid extraction procedure for analysis of ethyl hexanoate in culture medium with *Neurospora* sp.

2.6 GC-FID conditions

The volatile compound was analyzed using an Agilent GC (Model 7890A) equipped with a flame ionization detector (FID) and a HP-5 column (Agilent Technologies, 30 m x 0.320 mm i.d, x 0.25 µm film thickness). The injection was performed in the splitless mode for 1 min at 250 °C. Oven temperature was programmed at 50 °C for 1 min, then increase to 150 °C at 10 °C.min⁻¹ and held for 1 min and finally raised to 200 °C at 20 °C.min⁻¹ and held for 3 min at the final temperature. Nitrogen was used as the carrier gas with a flow-rate of 1 mL.min⁻¹. Injector and detector were kept at 250 °C.

2.7 GC-MS conditions

GC-MS analyses were carried out in a Shimadzu GC-17A/QP-5000 high performance quadrupole, (Japan) under the following instrumental conditions: column: HP-5 MS fused silica capillary column (30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 μ m) from J&W Scientific (EUA), injector mode and temperature: splitless, 250 $^{\circ}$ C; purge time: 1 min., purge flow: 20 mL.min⁻¹; helium flow rate: 1.0 mL.min⁻¹, oven: 50 $^{\circ}$ C (1 min.); 10 $^{\circ}$ C.min⁻¹ up to 150 $^{\circ}$ C; 20 $^{\circ}$ C.min⁻¹ up to 200 $^{\circ}$ C for 3min; transfer line temperature: 240 $^{\circ}$ C, energy of impact: +70 eV, 35-3 50m/z). A mixture of aliphatic hydrocarbons (C₅-C₂₀) was injected under the above temperature program to calculate the retention index (I) of ethyl hexanoate. The identification of components was made by mass spectrum a retention index agreed with standards and comparing spectra with Adams (2007) and NIST 2005 mass spectral database libraries, with similarity higher than 90% and supported by retention index data.

2.8 Statistical analysis

The data obtained were analyzed using ANOVA/Tukey (p<0.05). The statistical package used was StatisticaTM 8.0 data analysis software by Statsoft, Inc.,USA.

3. Results and discussion

3.1 Liquid-liquid extraction

3.1.1 Selection of type of solvent and the volume

In this work, dichloromethane, ether diethyl, and different proportions of ether diethyl and hexane (9:1; 7:1; 5:1) and ethyl acetate were evaluated to determine their effectiveness in extraction of aroma compound from culture medium with

Neurospora sp. The response evaluated was the peak area ratio (volatile compound/internal standard) obtained for ethyl hexanoate in the matrix (malt extract, standard and *Neurospora* sp autoclaved after 24 hours in YM). Table 1 shows the relative area of ethyl hexanoate using different solvents. Table 2 shows the area relative when it was used 1, 3 and 5 mL of solvent to 5 mL of the sample matrix to extract what is the best. After these results the solvent chosen was diethyl ether and the volume was 1 mL, that obtained greater relative area. The next step were tested whether there were differences between weigh or measure the volume of the sample (table 2). No significant difference ($p>0.05$) was found between the volatile extraction yields obtained by weigh and measure the volume. So, for analysis convenience, we chose to use in volume (Table 2).

Table 1- Relative area of ethyl hexanoate using different types of solvents

Solvent	Relative area of ethyl henatoate in the matrix
dichoromethane	0.5437
ether diethyl	0.8375
ether diethyl:hexane (9:1)	0.0617
ether diethyl:hexane (7:1)	0.0678
ether diethyl:hexane (5:1)	0.0871
ethyl acetate	0.4393

Table 2- Response of relative area using different volumes of ether diethyl and weigh of sample

Volume (mL)	Weigh (g)	Relative area
1	-	0.8375
3	-	0.2532
5	-	0.1254
-	5	0.1431

3.1.2 Effect of amount of NaCl

The influence of the ionic strength of the sample matrix was studied by addition of different amount of NaCl (0; 0.1; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5 and 3.0 g) to 5 mL of the sample matrix. An increase of salt presented no significant difference ($p > 0.05$) between the volatile extraction yields. However, significant difference was found between the volatile extraction yields obtained by adding NaCl. According to this, 0.1g/5mL of sample was used for all the experiments. Table 3 shows the relative area obtained using different amounts of NaCl.

3.1.3 Summary of the set up conditions

To sum up, the optimized liquid-liquid extraction method can be described using the following parameters: 5 mL of cultured broth were collected into tube with 0.1g NaCl and were vortexed for 10 seconds. After, were extracted with 1 mL of ether diethyl containing 0.003% of 2-heptanol as an internal standard. Thus, the mixture was shaken for 30 seconds in the vortex, and one microliter of the organics extracts was analyzed by GC-FID.

Table 3- Relative area of ethyl hexanoate using different amounts of NaCl.

NaCl (g)	Relative area of ethyl hexanoate
0	0.3056
0.1	0.3368
0.5	0.2988
1.0	0.2408
1.5	0.2385
2.0	0.2139
2.5	0.2112
3.0	0.2068

3.2 Performance characteristics

In this study, some validation parameters were evaluated by determining linearity, recovery, reproducibility, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) for ethyl hexanoate. The performance was determined, according to the optimized conditions described, by using standard solution added in the matrix (culture medium and *Neurospora* sp autoclaved after 24 hours in YM).

3.2.1 Calibration

3.2.1.1 Linearity: Six levels of concentration of analyte were prepared for plotting standard calibration curves, which were constructed to test the linearity range. The peak area ratio obtained was interpolated into the calibration curves. In this study, 0.003% of 2-heptanol (internal standard) was mixed with ether diethyl. The concentration ranges, regression equations, R^2 values, recoveries, RSDs (relative

standard deviation) and LODs, LOQs for target aroma are shown in Table 4. The method showed linear behavior in the concentration ranges studied.

3.2.2 Precision

The repeatability was determined to check the precision of method. This was evaluated at six concentration levels by calculating the relative standard deviation (RSD) of three replicates of each concentration level among three different days (interdays) and three concentration levels of three replicates during the same day (intraday). The RSDs results are summarized in Table 1. The average RSD % for ethyl hexanoate ranged from 0.37 to 10.08 for the same day and from 0.57 to 16.89 for different days. The low average RSDs for this compound indicated that the analytical conditions were found to be acceptable for these matrixes. This difference among matrixes may be probably because the composition of each medium.

3.2.3 Recovery (%)

Recovery tests were performed to study the accuracy of the method. As shown in Table 4, known quantities of the standard solution were added to the matrix (culture broth, microorganisms autoclaved after pre-inoculum, to eliminate any possibility to produce the compound during the analysis). The slope of the calibration curves obtained for target volatile compound was compared with the corresponding slope obtained with standards in the solvent. Moreover, the average recoveries of volatile compound ranged from 53% to 113%. These values are

acceptable within the parameters of validation. (referencias) and demonstrated that the method was applicable for analysis of ethyl hexanoate.

Table 4- The concentration range, regression equations, R^2 , recovery, LOD, LOQ and RSD for the ethyl hexanoate in each matrix

Matriz	Conc. range (mg.L ⁻¹)	Regression equation	R ²	Recovery (%)	RDS range %	LOD (mg.L ⁻¹)	LOQ (mg.L ⁻¹)
Malt extract	1-60	Y=0.0652x+0.396	0.9975	53.57	3.82-16.74 ^a 0.37-6.78 ^b	0.50	1.65
YM	1-60	Y=0.0358x-0.248	0.9997	86.45	1.55-8.27 ^a 0.67-10.08 ^b	0.69	2.28
Fructose/ yeast extract	1-60	Y=0.0268x+0.112	0.9986	112.35	0.57-16.89 ^a 0.37-4.97 ^b	0.42	1.38
Czapeck	1-60	Y=0.0585x-0.0862	0.9975	53.82	5.68-10.51 ^a 0.45-5.99 ^b	0.67	2.24

Where: Y: The (volatile compound/internal standard) peak area ratio.

X: The (volatile compound/internal standard) concentration ratio.

^a: RDS (relative standard deviation) inter day.

^b: RDS intraday

3.2.4 Limit of detection (LOD) and Limit of quantification (LOQ)

The LOD was calculated from the calibration curves constructed for each volatile compound. LODs (3 x the RDS of the analytical blank values) was calculated from the calibration curve (Table 4). LOQs is almost 3.33 times LOD. The results show that the LOD and LOQ were low enough to determinate the target compound in culture medium with *Neurospora* sp. The detection limit LOD ranged from 0.42 to

0.69 and the limit of quantification ranged from 1.38 to 2.28 in the equipment used for data analysis.

3.3 Quantification of the target compound in different culture medium and different periods of fermentation

Table 3 shown the maximum production of ethyl hexanoate in each culture medium, that is described in the literature like pineapple, apple, peaches and pears (Brigido, 2000; Park *et al*, 1982; Pastore *et al*, 1995; Yamauchi *et al*, 1991 and Yoshizawa, *et al*, 1988).

Table 5 - Maximum production of ethyl hexanoate in different culture medium.

Culture broth	Strain	Time of fermentation (h)	Ethyl hexanoate (mg.L ⁻¹)
Malt extract	LB23DSC	24 ^a	8.07 ± 0.06
Fructose/ yeast extract	LB13DSC	72 ^b	6.20 ± 0.31
YM	LB13DSC	24 ^b	7.27 ± 0.09
Czapeck	-	-	ND*

Different letters indicate significant differences between treatments by Tukey test (p < 0.05).

*ND: Not detectable

As shown in table 5, the malt extract broth was the most adequate medium for production of ethyl hexanoate, with the highest production of 8.07 mg.L⁻¹ by LB23DSC strain, which differed statistically, at 95% confidence level, from the others concentrations. Yoshizawa and co-workers (1988) tested three different culture medium to produced volatile compounds by *Neurospora* sp ATCC 46892.

As a result, the predominant component was found to be ethyl hexanoate, with the maximal production occurring using malt extract medium, as found in the present paper.

The volatiles constituents of the cultured medium of *Neurospora* strains were analyzed by gas chromatography, and the figure 1 show the production of ethyl hexanoate to the different strains in malt extract broth during the period of fermentation. The highest production of ethyl hexanoate was obtained by LB23DSC strain, which was identified using molecular methods, as *Neurospora sitophila* FGSC1135.

Several studies have been carried out to find the best fermentation time of maximum production of this compound as well as different fermentation parameters with the aim of improving the production.

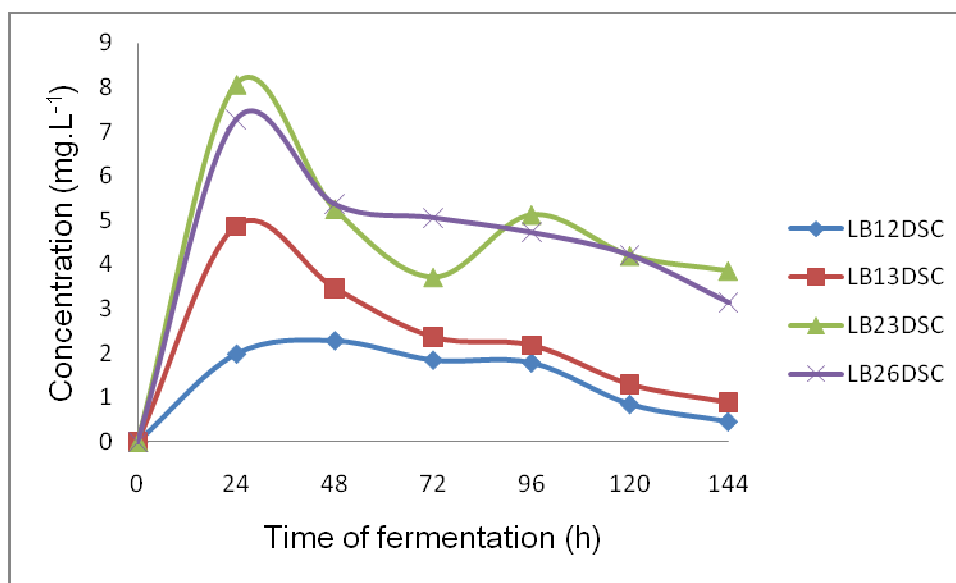


Figure 1. Production of ethyl hexanoate in malt extract broth for different strains of *Neurospora* sp.

3.4 Identification of ethyl hexanoate

The identification was made by comparing mass spectrums a retentions index with Adams (2007) and NIST 2005 mass spectral database libraries, with similarities higher than 90% and supported by retention index data. The reliability of the identification proposal is indicated by mass spectrum and linear retention index agree with standards. For ethyl hexanoate the retention index calculated (I Cal) and retention index to literature (I Lit) was I Cal=998 and I Lit 998 (Maia *et al.* 2000). Figure 3 shows the chromatogram and the mass spectra of the ethyl hexanoate produced by LB23DSC strain in the malt extract medium.

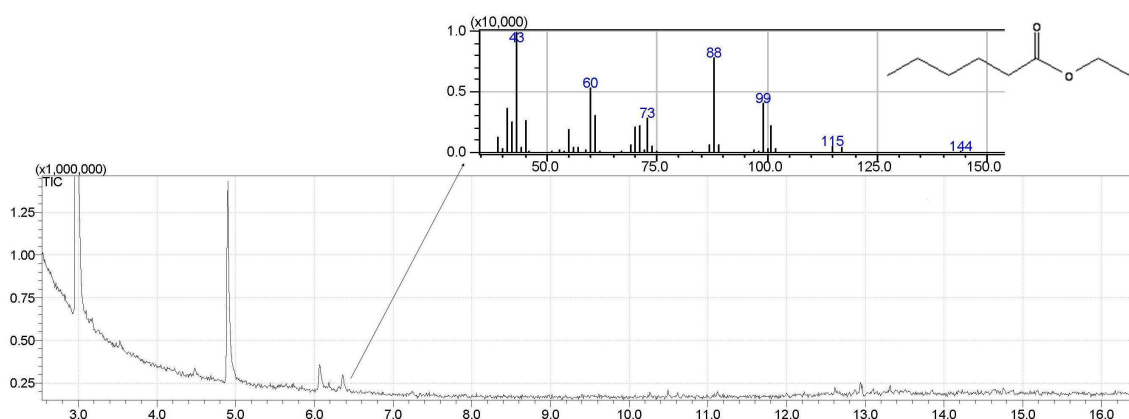


Figure 2. GC-MS Chromatogram and spectra of the ethyl hexanote produced by LB23DSC strain.

4. Conclusion

The validation results showed that the method developed was adequate for the quantification of ethyl hexanoate in the matrixes tested. The results shown that the best medium for the production of fruity aroma was malt extract and the maximum

production (8.07 mg.L⁻¹) was in 24 hours of fermentation. The higher strain producer was identified as *Neurospora sitophila* FGSC1135.

References

- Adams, R. P. (2007). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectrometry, Allured Publishing Corp.: Carol Stream, Illinois, USA.
- Berger, R. G., (2009). Biotechnology of flavours - the next generation. Biotechnological Letters, 31, 1651-1659.
- Bicas, J. L.; Silva, J. C.; Dionísio, A. P.; Pastore, G. M. (2010) Biotechnological production of bioflavors and functional sugars. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 30, 1, 7-18.
- Brigido, B. M. Produção de compostos voláteis de aroma por novas linhagens de *Neurospora*. Campinas, 2000. 148p. Tese (Mestre em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- Gatfield, I. L. (1988). Production of Flavor and Aroma Compounds by Biothechnology, Food Technology, 110-169.
- Janssens, L.; Pooter, H. L. De; Schamp, N. M.; Vandamme, E. J. (1992). Production of flavours by microorganisms. Process Biochemistry, 27, 195-215.
- Krings, U.; Berger, R.G. (1998). Biotechnological production of flavours and fragrances. Applied Microbiology Biotechnology, 49, 1-8.
- Longo, M. A.; Sanromán, M. A. (2006). Production of food aroma compounds: microbial and enzymatic methodologies. Food Technological Biotechnological, 4(3), 335-353.

- Maia, J.G.S. Andrade, E.H.A.; Zoghbi, M.G.B. Volatile constituents of the leaves, fruits and flowers of cashew (*Anacardium occidentale* L.) (2000) Journal of Food Composition and Analysis, 13, 227-232.
- Park, Y. K.; Zenin, C. T.; Ueda, S.; Martins, C. O.; Neto, J. P. M. (1992). Microflora in beiju and their biochemical characteristics. Journal of Fermentation Technology, 60 (1), 1-4.
- Pastore, G. M.; Park, Y. K.; Min, D. B. (1995). Production of fruity aroma by *Neurospora* species isolated from Beiju. Revista de Microbiologia, 26 (1), 55-58.
- Pastore, G. M.; Park ,Y. K.; Min, D. B. (1994). Production of fruity aroma by *Neurospora* from beiju. Mycological Research, 98 (11), 1300-1302.
- Yamauchi, H.; Hasuo, T.; Amachi, T.; Akita, O.; Hara, S.; Yoshizawa, K. (1989). Purification and characterization of acyl coenzyme A: alcohol acyltransferase of *Neurospora* sp. Agricultural and Biological Chemistry, 53(6), 1551-1556.
- Yamauchi, H.; Obata, T.; Amachi, T.; Hara, S. (1991). Production of characteristic odors by *Neurospora*. Agricultural and Biological Chemistry ,55 (12), 3115-3116.
- Yoshizawa, K.; Yamauchi, H.; Hasuo T.; Akita, O.; Hara, S. (1988). Production of a fruity odor by *Neurospora* sp. Agricultural and Biological Chemistry, 52(8), 2129-21.

CAPÍTULO 3

Este artigo sera submetido ao periódico *Analytical Methods*

CAPÍTULO 3

ANALYTICAL METHOD VALIDATION AND OPTIMIZATION OF SPME EXTRACTION CONDITIONS OF ETHYL HEXANOATE PRODUCED BY *Neusporora sitophila*

Summary

A headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and gas chromatography method was developed and applied for the quantitative determination of the ethyl hexanoate produced by *Neurospora sitophila* in malt extract medium. Headspace SPME experimental conditions, such as fiber coating, equilibrium time and extraction time were optimized in order to improve the extraction process. Polydimethylsiloxane (PDMS), carboxen-polydimethylsiloxane (CAR/PDMS) and polydimethylsiloxane-divinylbenzene (PDMS/DVB) SPME fibers were tested in this study. The best results were obtained using a 65 μm PDMS/DVB fiber for headspace extraction at 30°C without equilibrium time, and a constant stirring for 10 minutes. Optimized analytical methodology was used to investigate the production of ethyl hexanoate by *Neurospora sithophila* and the highest concentration was reached in 24 hours of fermentation with maximum production of 8.04 mg.L^{-1} . The identification of the compound produced was done by mass spectrometry.

Introduction

Flavors and fragrances are key impact substances in the food and fragrance industry, with a world market estimated in U\$ 18.6 billion in 2008.^{6, 26} The food flavoring compounds are produced, principally *via* chemical synthesis or extraction from natural materials.¹⁴ The disadvantages involving both methods, *i.e.*, low concentrations of the product of interest, climatic and political features and possible ecological problems involved with the extraction turn the biotechnological procedure an important alternative to obtain aroma compounds. This procedure occurs at mild conditions, presents high regio- and enantio-selectivity, does not generate toxic wastes and the products obtained are recognized as natural which represents an important market strategy.^{14,18} Moreover, biotechnological production of aroma compounds may be performed using two different strategies: *de novo* synthesis and biotransformation. In the *de novo* synthesis, a production of complex substances from simple molecules through complex metabolic pathways occurs, and the products formed include *i.e.* esters, lactones and oxygenated terpenes. On the other hand, the process of biotransformation involves single reactions catalyzed enzymatically using specific precursors, generally terpenes.

13,14,22

In general, product recovery is often a difficult step in bioprocesses, especially for flavor compounds because of their volatility and low water solubility.^{7,26}–Solid-Phase Micro Extraction (SPME) is a solvent free extraction method that is fast, economical and versatile and was introduced in the early 1990s.³ In this technique, a small amount of the sorbent dispersed on a solid support is exposed to the sample for a well defined period of time and has the advantages of solvent free

extraction, concentration, and introduction in one step thus generally reducing preparation time and simultaneously increasing sensitivity over other extraction methods.¹⁶ In addition, this extraction technique can be easily coupled to gas chromatography (GC).³

The static headspace (HS) SPME is an equilibrium technique that requires a previous optimization of the extraction parameters that can affect extraction efficiencies. Some of these sampling conditions are fiber sorbent (absorbent/adsorbent) phase, extraction temperature and extraction time. For these reasons, SPME has been investigated recently for the extraction of the volatile compounds produced in biotechnological processes, *i.e.* the metabolites formed when the limonene, citronellol and linalool were used as substrate in biotransformation assays.^{12,13,19,120}

Neurospora sp. has the potential for synthesizing aroma compounds, especially esters.^{8,9,10,11,17} To date, no studies have focused on analytical methods to extract the aroma compounds produced by this filamentous fungus. Considering that, the development and optimization of the main parameters involved in the extraction of the aroma compounds using SPME are necessary, including the selection of fiber coating, extraction and equilibrium time. The aim of this study was to optimize the SPME conditions for quantitative and qualitative analyses of ethyl hexanoate produced by *Neurospora sitophila* in malt extract medium.

Experimental

Standard

Ethyl hexanoate (ethyl caproate) 99.9% was purchased from Acrós Organics (USA).

SPME fiber coatings

The use of a specific fiber is very important for achieving good selectivity for the target analytes. In this context, the SPME fibers tested in this work were: 100 μm polydimethylsiloxane (PDMS); 75 μm carboxen/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS) and 65 μm divinylbenzene/polydimethylsiloxane (DVB/PDMS) on a 1 cm StableFlex fiber, recommended for flavors (volatiles and semivolatiles). All the fibers and the SPME holder for manual sampling were purchased from Supelco (Bellefonte, PA, USA). The fibers were conditioned prior to use according to the instructions of manufacturer by inserting them into the GC injector port. Before the first daily analysis the fibers were conditioned for 15 min at 250 $^{\circ}\text{C}$. In this experiment, the conditions used in the SPME were equilibrium time (10 min), and the extraction time (30 min) in agitation. A blank test was performed to check possible carry-over. The results were analyzed by Tukey using significance level set at $p < 0.05$.

Optimization of HS-SPME procedure

Extraction time and equilibrium time

Since SPME is based on an equilibrium distribution process, the maximum amount of analyte would be extracted at the equilibrium time. Stirring the sample reduces

the time needed to reach equilibrium because it enhances the diffusion of analytes towards the fiber. The extraction temperature has two opposing effects on the SPME process. An increase in temperature during extraction enhances the diffusion of analytes towards the fiber and decreased distribution constant, both leading to faster equilibration time. However, in this case, the temperature does not use because the fermentation was conducted at 30 °C. For SPME analysis, 20 mL of the culture broth was transferred into a 100 mL serum vial containing a microstirring bar. The vial was sealed with a Teflon-lined septa and screw cap, and then immersed in a water bath at 30 °C. The SPME fiber coated with DVB/PDMS was manually exposed to the sample headspace for 10 min. The sample was continuously agitated with a magnetic stirring during the extraction process to allow faster equilibrium condition. Finally, the fiber was withdrawn into the needle holder and immediately introduced into the GC injection port and held for 10 min to completely desorb the volatile compound. In this work, three different fibers, five equilibrium times (0, 3, 5, 7, 10 min) and four extraction times (10, 20, 30, 40 min) were tested to develop the SPME procedure for headspace analysis of ethyl hexanoate into malt extract broth.

Method validation

The method was validated under the optimized conditions by determining the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), the inter- and intra-day precisions (RSD), the linearity and the relative recovery at different levels of fortification.

Preparation of pre-inoculum and fermentation

Neurospora sitophila was inoculated into a slant tube of Potato Dextrose agar (PDA) at 30°C for 72h. After fungal growth, a spore suspension was prepared by adding 10 mL of sterile water into the tube and scraping the mycelia. All its volume was transferred for 250 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of Yeast Malt Broth (YM: 10g.L⁻¹ glucose, 5g.L⁻¹ peptone, 3g.L⁻¹ yeast extract, 3g.L⁻¹ malt extract). This flask was subsequently transferred to an orbital shaker operating at 30°C and 200 rpm for 24 h for fungal growth. After this period the culture broth was filtered through a membrane of acetate filter (pore size: 0.45µm - Sartorius) and the mycelia were washed with sterile water before being used as inoculum in the fermentation experiments. The inoculum consisted of 0.2 g of biomass added in a flask containing 20 mL of malt extract medium.

The flasks were incubated on a rotator shaker (New Brunswick Scientific) at 30 °C for until 72 h under agitation (200 rpm). Samples were collected, each 24 h extracted by HS-SPME and analyzed by gas chromatography using different fibers, as described before. The aroma compounds were extracted from the 100 mL flasks using a PTFE septum containing 20 mL of fermented medium. The best conditions found in the optimization were used (fiber: DVB/PDMS, extraction time: 10 min, constant agitation, temperature: 30°C)

GC-FID conditions

The volatile compounds were analyzed using an Agilent GC 7890A equipped with a flame ionization detector (FID) and a HP-5 (5% phenyl 95% dimethylpolysiloxane) column (Agilent Technologies i.d. = 0.320 mm, length = 30

m, film thickness = 0.25 μm , USA). Desorption of SPME fiber was done in the injection port of the gas chromatograph for 0.75 min at 250 $^{\circ}\text{C}$ in a splitless mode. Oven temperature was programmed at 50 $^{\circ}\text{C}$ for 1 min, then increased to 150 $^{\circ}\text{C}$ at 10 $^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ and held for 1 min and finally raised to 200 $^{\circ}\text{C}$ at 20 $^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ and held for 3 min at the final temperature. Nitrogen was used as the carrier gas with a flow-rate of 1 $\text{mL}.\text{min}^{-1}$. Detector was 250 $^{\circ}\text{C}$. After desorption, the fiber remained further 10 min in the injector port to eliminate the possibility of any carry-over of analyte between samples.

GC-MS conditions

GC-MS analyses were carried out in a Shimadzu GC-17A/QP-5000 high performance quadrupole (Japan), under the following instrumental conditions: the column was HP-5 MS (5% phenyl 95% dimethylpolysiloxane) fused silica capillary column (30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 μm) from J&W Scientific (EUA), injector mode and temperature: splitless, 250 $^{\circ}\text{C}$; purge time: 1 min., purge flow: 20 $\text{mL}.\text{min}^{-1}$; helium flow rate: 1.0 $\text{mL}.\text{min}^{-1}$, oven: 50 $^{\circ}\text{C}$ (1 min.); 10 $^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ up to 150 $^{\circ}\text{C}$; 20 $^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ up to 200 $^{\circ}\text{C}$ for 3 min; transfer line temperature: 240 $^{\circ}\text{C}$, energy of impact: +70 eV, 35-350 m/z). A mixture of aliphatic hydrocarbons ($\text{C}_5\text{--C}_{20}$) (PolyScience, Illinois, EUA) was loaded onto the vial and submit at HS-SPME extraction and injected under the above temperature program to calculate the retention index (I) of ethyl hexanoate.

Quantification

Quantification was performed using the external calibration curve, with the following concentrations of ethyl hexanoate: 1, 5, 10, 15, 20 e 25 mg.L⁻¹. The ethyl hexanoate standard was directly diluted in the artificial matrix, which containing 0.4 g of the inoculums autoclaved and malt extract broth, all carried out in triplicate. The recovery was carried out during the time of fermentation, where concentrations of ethyl hexanoate (1, 5, 10, 15 e 20 mg.L⁻¹) was added into the vial contain the fermentation broth.

Statistical analysis

The data obtained were analyzed using ANOVA ($p < 0.05$). The statistical package used was StatisticaTM 7.0 data analysis software by Statsoft, Inc., USA.

Results and Discussion

SPME fiber coatings

According to Figure 1, the results clearly show that the chromatographic areas obtained were statistically different (Tukey $p < 0.05$) when we used PDMS (100 μm), PDMS/DVB (65 μm) and CAR/PDMS (75 μm) for the analyte recovery. The PDMS/DVB fiber has mainly mesoporous, which are ideal for trapping low molecular weight (C₆-C₁₅) analytes. Figure 1 shows experimental results which clearly demonstrates that PDMS/DVB is adequate for analytes like ethyl hexanoate probably due to their low vapor pressure.^{15, 16} Based in that, the fiber PDMS/DVB was chosen since it presented a greater total area of ethyl hexanoate.

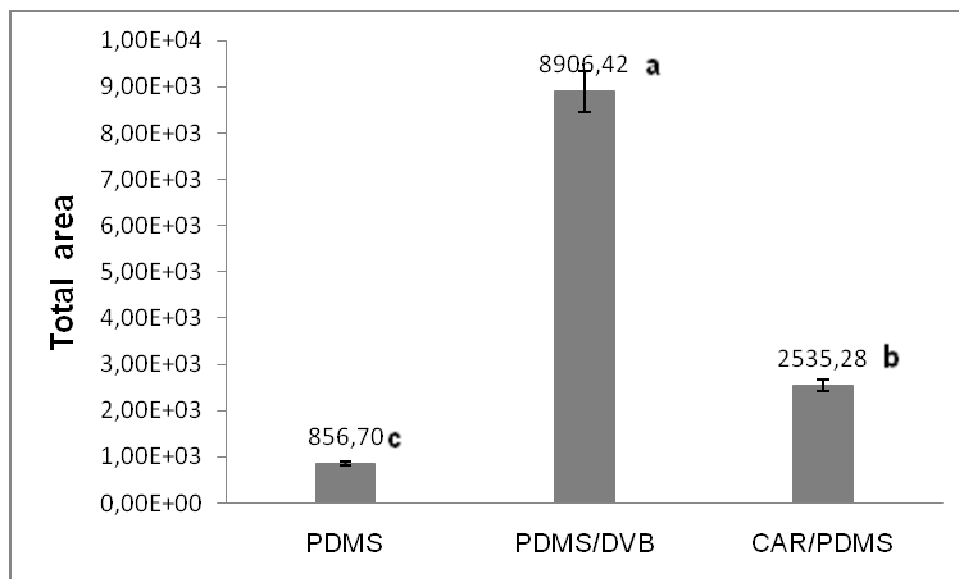


Figure 1. Efficiency of coating of SPME fibers for extraction of ethyl hexanoate by HS-SPME. Results expressed as mean of triplicates of the ethyl hexanoate area of chromatograms by GC-FID. Means followed by different letters differ by Tukey test ($p < 0.05$).

Effect of equilibrium time and extraction time

The effects of equilibrium time and extraction time are shown in Figures 2 and 3, respectively. According to the results shown, it can be concluded that, for the matrix studied, the equilibrium time is not necessary to recover the specific analyte. It is probably because there is a high affinity of ethyl hexanoate by the fiber material, and at the temperature used for the assays (30°C), the equilibrium of the analyte with the gas phase had reached. In figure 3, it is shown that the amount of the compound extracted increased in the first 10 minutes of exposure and it decreases afterwards. The results showed that at 30°C, 10 minutes of extraction,

without equilibrium time, are sufficient to achieve the larger area of the analyte.

Hence, the extraction time for subsequent analyses was then fixed at 10 min

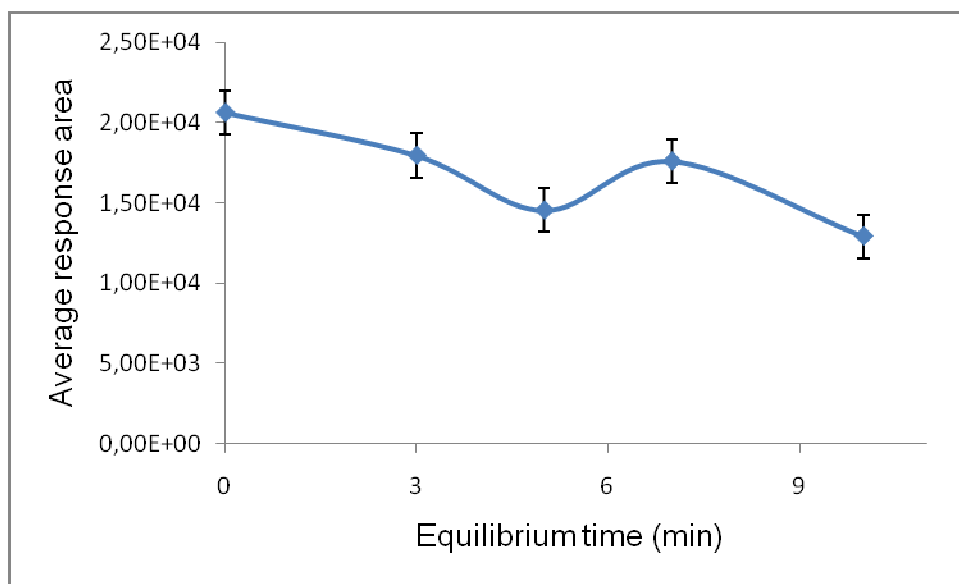


Figure 2. Influence of equilibrium time on extraction recovery of ethyl hexanoate, produced by *Neurospora sitophila*, in malt extract 5% by HS-SPME.

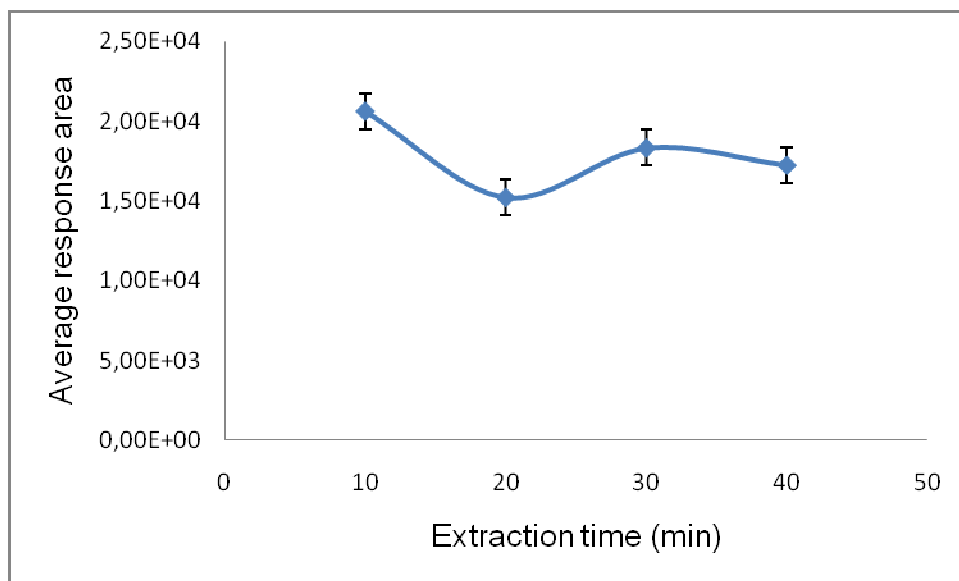


Figure 3. Influence of exposure time on extraction recovery of ethyl hexanoate, produced by *Neurospora sitophila*, in malt extract 5% by HS-SPME.

Method validation

Calibration equation, Recovery range, RSD, LOD and LOQ are presented in Table 1. The external standard calibration curve was constructed with 6 concentrations, each of which was analyzed in triplicate in the artificial matrix. The standard deviations indicated that the dispersion of analysis was independent of the concentration of sample, and the developed method presents a linear behavior on the range of concentrations evaluated. This method also proved to be linear for ester concentrations between 1 and 25 mg.L⁻¹ with R² values greater than 0.9, which is perfectly acceptable for biological systems.¹³

The LOD was calculated from the calibration curves constructed for ethyl hexanoate. LODs (3 x the RDS of the analytical blank values) were calculated from the calibration curve (Table 1). LOQs are almost 3.33 times LOD. The results confirmed that the LOD and LOQ were low enough to determinate the concentrations of ethyl hexanoate in real culture medium with *Neurospora sitophila*. The LOD and LOQ ranges were 0.31 mg.L⁻¹ and 1.01 mg.L⁻¹, respectively.

Table 1 - The concentration range, regression equations, R^2 , recovery, LOD, LOQ and RSD for the ethyl hexanoate.

Conc. range (mg.L ⁻¹)	Calibration equation	R^2	Recovery range %	RSD range %	LOD (mg.L ⁻¹)	LOQ (mg.L ⁻¹)
1-25	$Y = 472.28x + 2702.5$	0.99	35.39 – 82.83	Intra: 4.78-8.28 Inter: 2.79-15.34	0.32	1.01

HS-SPME conditions: Equilibrium Time: 0 min; Extraction time: 10 min, under constant agitation and temperature: 30°C
Where Y= the ethyl hexanoate peak area; x = the concentration

The precision of the method was evaluated based on its repeatability, which was ascertained by performing intra-day repeatability from nine sample extractions analyzed on the same day by the same analyst and using the same instrument and inter-day repeatability from the variation in results of six analyses performed on three different days (n=3) by the same analyst and using the same instrument. For this purpose, artificial matrix samples were spiked with analyte to result final concentrations of 1, 5, 10, 15, 20 and 25 mg.L⁻¹. Accuracy was evaluated by recovery tests by analyzing the samples spiked with the analyte. The results were expressed as the percentage of the expected concentrations (the amounts initially added) of the analytes. The results for accuracy and precision were in accordance with the EU decision n° 2002/657. The average recovery of the analyte from the system were between 35 and 83%. Four different concentrations (1, 5, 10 and 20 mg.L⁻¹) in each time were determined to evaluate this parameter. The recoveries ranged from 38.55 to 72.49% at 24 hours, 35.39 to 74.83% at 48 hours and from

69.03 to 82.33% at the 72 hours. The relative standard deviations in the intra-day repeatability were below 6.0% and the inter-day, below 16%.

Identification

The identification of the ethyl hexanoate was done by mass spectrum and retention index agreed with standard and comparing spectra with Adams (2007) and NIST 98 mass spectral database libraries, with similarities higher than 90% and supported by retention index data.

Analysis of fermentation samples

To test its applicability, the method was employed to determine the concentrations of ethyl hexanoate produced in malt extract broth by *Neurospora sitophila*. Fermentation took place on a shaker at 30 °C for 72 h under agitation (200 rpm). Each 24 h, the samples were extracted using SPME fiber and analyzed in gas chromatography following the above described procedure. Analysis were made in triplicate and, between two samples, a fiber blank was carried out in order to check for the absence of carry over effects. According to Figure 4, a decrease occurred in the amount of the ethyl hexanoate along the fermentation. Because the production of ethyl hexanoate was decreased after 48 hours, the experiment was stopped after 72 hours. After 24h, the ethyl hexanoate were detected in all the samples, at concentrations of 1.21-8.04 mg.L⁻¹ and the highest concentration (8.04 mg.L⁻¹) was detected in the first 24 hours of the experiment. The production of ethyl hexanoate by *Neurospora* was investigated by different research groups, especially using malt extract as culture medium.^{5,8,9,11,16} However, at the moment,

the production obtained for all research groups are not sufficient for an industrial application. Several researches have pointed that simple modification on processes conditions, like the change of culture medium, temperature, pressure, agitation or pH could significantly improved productivity. The use of statistical models, like Response Surface Methodology helps in reducing the number of experiments required in multi-factorial systems.^{13,21,22} In this way, the next step of this study was to evaluate the conditions of the fermentation, to provide an increasing on the fermentation yields. Likewise, the use of non-conventional medium are an important alternative, considering that the culture medium represent about 30% of the costs of the biotechnological process.²⁵ Cassava wastewater, a liquid residue from the cassava industry,²⁴ and solid wastes, as husk coffee,² cassava bagasse, apple pomace and soya bean¹ are some examples of alternative substrates in fermentative procedure to produce aroma compounds. Some experiments about the use of residues to produce ethyl hexanoate are now being carried out by us and the results will be launched soon.

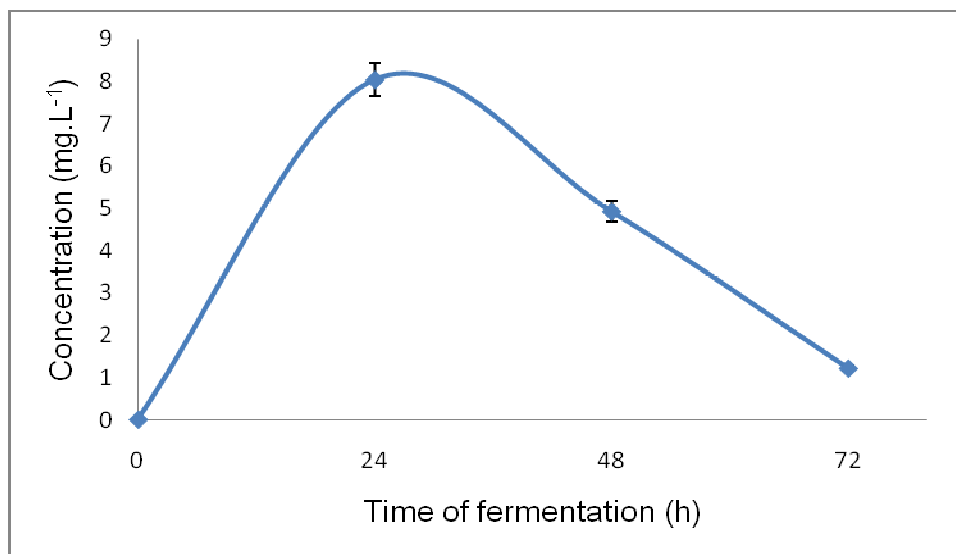


Figure 4- Production of ethyl hexanoate by *Neurospora sitophila* in malt extract broth at 30°C and 200 rpm.

Conclusion

The validation results showed that the method developed was adequate for the quantification and confirmation of ethyl hexanoate produced by *Neurospora sitophila* in malt extract broth. The highest concentration occurred in 24 hours of fermentation with maximum production of 8.04 mg.L⁻¹.

References

- 1 A. Bramorski, C.R. Soccol, P. Christen, S. Revah. *Rev. Microbiol.*, 1998, **28**, 3, 208-212.
- 2 A. Pandey, C. R. Soccol, P. Nigam, D. Brand, R. Mohan, S. Roussos *Biochem. Eng. J.*, 2000, **6**, 2, 153-162.
- 3 A. S.Yazdi, H. P. Moghadam, Z. Es'haghib, S. Sepehr, *Anal. Methods*, 2010, **2**, 746–752.

- 4 A.B.P. Medeiros, A. Pandey, L. P. S. Vandenberghe, G. M. Pastore, C. R. Soccol, *Food Technol. Biotechnol.*, 2006, **44**, 47–51.
- 5 B. M. Brigido, Msc Thesis, Universidade Estadual de Campinas, 2001.
- 6 C.R. Soccol, A.B.P. Medeiros, L.P.S. Vandenberghe, M. Soares and A. Pandey, *Production of aroma compounds, Current developments in solid-state fermentation*, Springer Asiatech Publishers Inc., New Delhi, 2008, pp. 357–372.
- 7 Commun. L 224, n.1, 1990. Comunidade Européia - Comissão Regulation (EEC) 2377/ 90. Off. J. Eur.
- 8 G. M Pastore, Y. K. Park, D. B Min, *Mycol. Res.*, 1994, 98, 1300-1302.
- 9 G. M Pastore, Y. K. Park, D. B Min, *Rev. Microbiol.*, 1995, 26, 55-58.
- 10 H. Yamauchi, T. Hasuo, T. Amauchi, *Agric. Biol. Chem.*, 1989, **53**, 1551-1556.
- 11 H. Yamauchi, T. Obata, T. Amauchi, S. Hara, *Agric. Biol. Chem.*, 1991, **55**, 3115-3116.
- 12 J. C. R. Demyttenaere, J. Vanoverschelde, N. Kimpe, *J. Agric. Food Chem.*, 2008, **56**, 3287-3296.
- 13 J. L. Bicas, F. F. C. Barros, R. Wagner, H. T. Godoy, G. M. Pastore, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, **35**, 1061-1070.
- 14 J. L. Bicas, J. C. Silva, A. P. Dionísio, G. M. Pastore, *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 2010, **30**, 7-18.
- 15 J. Pawliszyn, in *Applications of solid phase microextraction*. RSC, Letchworth, 1999.
- 16 J. Pawliszyn, in *Solid phase microextraction: theory and practice*. Wiley–VCH, New York , 1997.

- 17 K.Yoshizawa, H. Yamauchi, T. Hasuo, O. Akita, S. Hara, *Agric. Biol. Chem.*, 1988, **52**, 2129-2130.
- 18 M. A. Longo, M. A. Sanromán, *Food Technol. Biotechnol.*, 2006, **44**, 335-353.
- 19 M. R. Maróstica Junior, N. Mota, Nathalie Baudet, G. M. Pastore, *Food Sci. Biotechnol.*, 2007, **16**, 37-42.
- 20 M. A. Mirata, M. Wüst, A. Mosandl, J. Schrader. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, **56**, 3287-96.
- 21 P. Barghini, D. Di Gioia, F. Fava, M. Ruzzi. *Microb. Cell Fact* , 2007, **6**, 13-20.
- 22 R. G. Berger, *Biotechnol. Lett.*, 2009, **31**, 1651-1659.
- 23 R. P. Adams, 2007. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectrometry*, Allured Publishing Corp.: Carol Stream, Illinois, USA.
- 24 S. Damasceno, M.P. Cereda, G. M. Pastore, J. G. Oliveira. *Process Biochem.*, 2003, **39**, 4, 411-414.
- 25 S. S. Cameotra, , R. S. Makkar, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1998, **50**, 520-529.
- 26 S.C. Rossi, L.P.S. Vandenberghe, B.M.P. Pereira, F.D. Gago, J.A. Rizzolo, A. Pandey, C.R. Soccol, A.B.P. Medeiros, *Food Res. Int.*, 2009, **42**, 484-486.
- 27 W. Bluemke, J. Schrader. *Biomol. Eng.* ,2001, **17**, 137–142.

CAPÍTULO 4

Este artigo sera submetido ao periódico Food Chemistry

CAPÍTULO 4
OPTIMIZATION OF ETHYL HEXANOATE PRODUCTION BY *Neurospora*
***sitophila* FGSC1135**

ABSTRACT

Esters are qualitatively and quantitatively one of the most important classes of volatiles in fruit aroma and ethyl hexanoate is one of the most prominent example in food industry. The production of this compound by *Neurospora sitophila* has already been reported, although the influence of the parameters on the process has not yet been evaluated. A Plackett-Burnan screening design was used to define the effects of the medium composition (malt extract, glucose, soybean oil, ethanol and glycerol), the cultivation conditions (temperature and agitation) and the inoculum size (inoculum/culture medium ratio) on the production of ethyl hexanoate by *Neurospora sitophila*.. The process conditions were further optimized applying response surface methodology (RSM). This aroma compound was extracted using diethyl ether and was subsequently quantified by GC-FID and identified by GC-MS. The best results were obtained using 10 g.L⁻¹. soybean oil in 50g.L⁻¹ of malt extract as the culture medium with 30 g.L⁻¹ of inoculum cultivated at 30°C and 200rpm. Under these conditions the concentration of ethyl hexanoate in the culture medium reached 45.37 mg.L⁻¹ after 24h, a production almost six times greater than earlier trials.

Keywords *Neurospora sitophila*, Plackett-Burnan, experimental design, fruity, flavor

1. Introduction

Nowadays, flavors represent over 25% of the world market for food additives and most of the flavoring compounds are produced *via* chemical synthesis or by extraction from natural materials (Longo & Sanromán, 2006). However, recent market surveys have shown that consumers prefer foodstuff that can be labelled as “natural”. Therefore, biotechnological processes represents an attractive alternative for the production of flavors, since it occurs at mild conditions, presents high regio- and enantio-selectivity, does not generate toxic wastes and the products obtained may be labeled as "natural" (Bicas *et al.*, 2009; Bicas *et al.*, 2010).

Production of volatile fruity aromas occurs during the growth of several microbial species in different culture media (Pastore *et al.*, 1994). Esters are the most important group involved in the fruity flavor and they are employed in fruit-flavored products and dairy products (Gatfield, 1988; Longo & Sanromán, 2006). One of most important ester, ethyl hexanoate, is characterized by having strong fruity aroma like pineapple, peaches, butia, strawberry, banana and pears, apples (Yoshizawa, *et al.*, 1988; Liu, *et al.*, 2004; Sumby, *et al.*, 2010), and it is an important commercial product that is used in chinese liquor, japonese sake, ice cream, baked goods, jams and jellies (Brigido, 2000; Han *et al.* 2009). The biotechnological production of fruity aroma compounds was studied for some research groups, especially by *Neurospora* sp. Pastore and co-workers (1994) obtained 59 mg.L⁻¹ of ethyl hexanoate using malt extract broth as culture medium after 3-4 days of fermentation while Yamauchi *et al.* (1989), using pregelatinized rice impregnated with 5% malt broth as solid culture medium, obtained around 180 mg.L⁻¹.

The classical optimization method consists of varying the parameters one-at-a-time, maintaining the other variables constant. This strategy is usually time-consuming, requires a large number of experiments and does not consider the effects of interaction between the factors. It is thus an inadequate method for a full understanding of the process (Bicas, *et al*, 2008, Bicas *et al.*, 2010, Seitz, 1994). The Plackett-Burnan design is a screening approach used to statistically select the significant variables of numerous factor-experiments, focusing on a reduction in the number factor-experiments, and a reduction in the number of trials in the final design. The central composite design is a statistical methodology used to analyze the effects and interactions of the variables studied. This technique allows for the proposal of a mathematical model that describes the behavior of the factors analyzed and establishes their optimal values (Rodrigues and lemma, 2005).

Optimization of the production of natural aroma compounds using response surface methodology has already been published (Bicas *et al.*, 2008, Celik *et al.*, 2004; Mello, *et al.*, 2005). However, as mentioned before, there are no references in the literature describing the use this method as optimization of production of ethyl hexanoate. This paper describes the optimization of some main process variables involved in the production of ethyl hexanoate by *Neurospora sitophila* using a Plackett-Burnan matrix with 12 assays for the screening of variables, followed by central composite design methodology.

2. Material and methods

2.1 Microorganism and chemical

The filamentous fungus employed in this study was isolated from the beiju, and was identified as *Neurospora sitophila*. Ethyl hexanoate and 2-heptanol were purchased from Acrós Organics and Sigma-Aldrich Chemical, respectively, and diethyl ether from Merk. All of chemicals and solvents were analytical grade.

2.2 Inoculum

Neurospora sitophila was inoculated into a slant tube of Potato Dextrose agar (PDA) at 30°C for 72h. After fungal growth, a spore suspension was prepared by adding 10 mL of sterile water into the tube and scraping the mycelia. All its volume was transferred for 250 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of Yeast Malt Broth (YM: 10g.L⁻¹ glucose, 5g.L⁻¹ peptone, 3g.L⁻¹ yeast extract, 3g.L⁻¹ malt extract). This flask was subsequently transferred to an orbital shaker operating at 30°C and 200 rpm for 24 h for fungal growth. After this period the culture broth was filtered through a membrane of acetate filter (pore size: 0.45µm - Sartorius) and the mycelia were washed with sterile water before being used as inoculum in the fermentation experiments. The inoculum consisted of different quantities of biomass added in a flask containing 50 mL of culture medium (variable composition, as shown in Tables 1 and 4) and homogenized under sterile conditions using an Ultra-Turrax[®]T18 (Ika, Wilmington, NC, USA).

All flasks were incubated on a rotary shaker under their respective conditions (see Tables 1 and 4).

2.3 Optimization experiments

An extensive study was carried out in order to define the effects of the medium composition, the cultivation conditions and the inoculum size on the aroma production (area ethyl hexanoate peak in GC) by *N. sitophila*. Thus, the strategy used was to run a Plackett-Burnan screening design (Bicas, *et al.*, 2008; Rodrigues and lemma, 2005) with 12 experiments (PB-12) and three center points to define the effects and select the main parameters involved in such process (Tables 1, 2). A central composite design using the parameters selected was then carried out to define the optimal process conditions (Tables 4, 5).

In order to define the highest production of ethyl hexanoate the kinetics was monitored every 24 hours (datas no shown). As the highest production reached its maximum at 24 hours, it was decided to carry out the optimization trials considering this fermentation interval.

2.4 Quantification and identification of ethyl hexanoate

For the analysis of the volatile compounds, 5 mL of cultured medium were collected into tube with 0.1g NaCl. After agitation with vortex (10 sec), ethyl hexanoate was extracted with 1 mL of diethyl ether containing 0.003% of 2-heptanol as an internal standard. The mixture was agitated again by vortex for 30 seconds and one microliter of the organic extract was analyzed by GC-FID.

Analyses were performed using an Agilent GC 7890A equipped with a flame ionization detector (FID) and a HP-5 column (Agilent Technologies i.d. = 0.320 mm, length = 30 m, film thickness = 0.25µm, USA). The injection was performed in the splitless mode for 1 min at 250°C. Oven temperature was programmed at 50°C

for 1 min, then ramped to 150°C at 10°C.min⁻¹ and held for 1 min and finally raised to 200°C at 20°C.min⁻¹ and held for 3 min at the final temperature. Nitrogen was used as the carrier gas with a flow-rate of 1mL.min⁻¹. Detector temperature was kept at 250°C. Quantification was performed using the external calibration curve of ethyl hexanoate, with different concentrations of ethyl hexanoate (1, 10, 20, 30, 40 and 50 mg.L⁻¹), all carried out in triplicate.

For the identification of ethyl hexanoate, GC-MS analyses were carried out in a GC-MS system (Agilent 5975C, inert MSD) in the same conditions described above (GC-FID). The transfer line temperature: 250° C, energy of impact: +70 eV, 35-350m/z). A mixture of aliphatic hydrocarbons (C₅–C₂₀) (PolyScience, Illinois, EUA) was injected under the above temperature program to calculate the retention index (I) of compound.

2.5 Data analysis

The results were analyzed by the software STATISTICA[®] 7.0 A. A significance level of 10% ($p < 0.1$) was considered for the variables screened and 5% ($p < 0.05$) for the central composite design.

3. Results and discussion

Table 1 Variables and levels evaluated in the screening design

Variables	-1	0	+1
Glucose (g.L ⁻¹)	0	5.0	10.0
Soybean oil (g.L ⁻¹)	0	5.0	10.0
Ethanol (g.L ⁻¹)	0	5.0	10.0
Glycerol (g.L ⁻¹)	0	5.0	10.0
Malt Extract (g.L ⁻¹)	50	100	150
Agitation (rpm)	0	150	300
Temperature (°C)	25	30	35
Inoculum/medium (g.L ⁻¹)	10	20	30

3.1 Screening of the variables

The levels of the variables tested in the screening design are described in Table 1. These codified values were applied in the PB-12 Plackett-Burnan matrix and relative area obtained in each experiment are show in Table 2. In this paper, a *p* value of 0.1 was used because it is more conservative and lowers the risk of false-excluding statistically significant parameters (Rodrigues and lemma, 2005). The table 3 shows estimates of the effects of the parameters analyzed after 24 h of fermentation.

Table 2 Plackett-Burnan screening design matrix (PB- 12) and the ethyl hexanoate area after 24h of fermentation.

Trial	Glu	Soy	Ethanol	Gly	M	A	T	I/M	Area
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	0.01406
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	0.03922
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	0.01091
4	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	0.06390
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	0.07245
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	0.04140
7	-1	1	1	1	1	1	1	-1	0.13053
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	0.01218
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	0.01345
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	0.02624
11	-1	1	-1	-1	1	1	1	1	0.27401
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0.00699
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0.03956
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0.03503
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0.03962

Where: Glu (glucose); Soy (soybean oil); Gly (glycerol); M (malt extract); A (agitation); T (temperature); I/M (inoculums/medium) and Area (area ethyl hexanoate/ area 2-heptanol peak).

Table 3 Estimates of the effects of the parameters analyzed after 24 h of fermentation.

	Effect	Std.Err.	t(6)	p
Mean/Interc.	0.054638	0.010852	5.03502	0.002369
Glucose	-0.031800	0.024265	-1.31054	0.237941
Soybean oil	0.071947	0.024265	2.96504	0.025118
Ethanol	-0.026563	0.024265	-1.09472	0.315628
Glycerol	-0.006978	0.024265	-0.28756	0.783358
Malt extract	0.013884	0.024265	0.57220	0.587970
Temperature	-0.058677	0.024265	-2.41815	0.051994
Agitation	0.065620	0.024265	2.70431	0.035372
Inoculum/medium proportion	0.058935	0.024265	2.42879	0.051247

Parameters in bold are statistically significant ($p < 0.10$).

3.1.1 Effect of the medium composition

It was demonstrated that, considering the ranges tested, glucose, ethanol, glycerol and malt extract concentration presented any statistical effects on the response, (at $p < 0.1$) to this process (Table 3). Therefore, these variables were kept at their lower value (−1) during the optimization trials, *i.e.*, glucose, ethanol and glycerol were no longer used (0.0 g.L^{-1}) while malt extract concentration was always 50 g.L^{-1} in the subsequent experiments. Soybean oil presented a positive effect, showing an increase of the production of the compound when the oil was used. For optimization trials, was used 50 g.L^{-1} of extract malt.

3.1.2 Effect of the cultivation conditions

Bicas *et al.* (2008) mentioned that the medium temperature directly influences biological reactions and the medium agitation promotes development of the microorganism and cell-substrate interaction. However the higher temperature showed a negative effect ($p < 0.1$) on the *de novo* process, which means that, considering the ranges tested, an increase in temperature reduce the amount of ethyl hexanoate produced (Table 3). Agitation, on the other hand, showed a positive effect in the ethyl hexanoate area (Table 3), probably related to the increase in cell-substrate contact. Hence, the optimum agitation may be situated at values above the maximum value tested in the screening (300 rpm), and ampler range was suggested for the optimization trials.

3.1.3 Effect of the inoculums size

The size of inoculum is an important factor in a fermentation process, as it has a considerable effect on the subsequent stages. In industrial fermentation processes, it is a well-known fact that the age and density of the inoculum used directly influences the duration of the lag phase, specific growth rate, biomass yield, sporulation and quality of the final product, and hence the production costs (Bicas, *et al.*, 2008; Sen and Swaminathan, 2004). It was also suggested that the use of mycelium concentrates, as applied in this study, might significantly enhance the yield (Bicas, *et al.*, 2008; Krings, *et al.*, 2006). This variable had a positive effect in the response, indicating that higher amounts of biomass would be beneficial for ethyl hexanoate production.

3.2 Optimization using a central composite design

According to the variables screened, the significant factors ($p < 0.1$) for the process under study considering the levels tested, were soybean oil, agitation, temperature and inoculum size. For this reason, these four variables, which were analyzed at the levels described in Table 4, were optimized using a 2^4 central composite design with three center points, as shown table 5.

Table 4 Variables and levels evaluated in the central composite design

Variables	Levels				
	-2	-1	0	+1	+2
Soybean oil (g.L ⁻¹)	0.0	10.0	20.0	30.0	40.0
Inoculum/medium (g.L ⁻¹)	10.0	20.0	30.0	40.0	50.0
Agitation (rpm)	80	140	200	260	320
Temperature (°C)	20	25	30	35	40

Table 5 2⁴ Central composite design matrix and the ethyl hexanoate GC-FID area after 24h fermentation.

	Soy	I/M	A	T	Area
1	-1	-1	-1	-1	0.43852
2	+1	-1	-1	-1	0.17501
3	-1	+1	-1	-1	0.29650
4	+1	+1	-1	-1	0.37060
5	-1	-1	+1	-1	0.43114
6	+1	-1	+1	-1	0.48190
7	-1	+1	+1	-1	0.53224
8	+1	+1	+1	-1	0.37554
9	-1	-1	-1	+1	0.35106
10	+1	-1	-1	+1	0.17954
11	-1	+1	-1	+1	0.19807
12	+1	+1	-1	+1	0.34720
13	-1	-1	+1	+1	0.51348
14	+1	-1	+1	+1	0.52122
15	-1	+1	+1	+1	0.75974
16	+1	+1	+1	+1	0.94405
17	-2	0	0	0	0.57480
18	+2	0	0	0	0.50053
19	0	-2	0	0	0.52386
20	0	+2	0	0	0.57234
21	0	0	-2	0	0.21953
22	0	0	+2	0	0.66662
23	0	0	0	-2	0.22379
24	0	0	0	+2	0.21991
25	0	0	0	0	0.90394
26	0	0	0	0	0.90973
27	0	0	0	0	0.89343

Where: Soy (soybean oil); I/M (inoculums/medium); A (agitation); T (temperature); Area (area ethyl hexanoate / area 2-heptanol peak).

These data were treated by the software STATISTICA ® v. 7.0, which generated the regression coefficients and respective statistical analysis of the parameters considered (Table 6).

Table 6- The least- squares and significances of the regression coefficients of the model parameters.

Parameter	RC	SE	t (12)	<i>P value</i>
Mean	0.902	0.053	16.90	<0.0001
Soy	-0.011	0.0189	-0.61	0.5561
Soy²	-0.092	0.0200	-4.60	0.0006
I/M	0.034	0.0189	1.83	0.0922
I/M²	-0.089	0.0200	-4.47	0.0008
A	0.129	0.0189	6.84	<0.0001
A²	-0.116	0.0200	-5.78	<0.0001
T	0.029	0.0189	1.56	0.1455
T²	-0.171	0.0200	-8.54	<0.0001
Soy x I/M	0.039	0.0231	1.70	0.1156
Soy x A	0.019	0.0231	0.81	0.4362
Soy x T	0.029	0.0231	1.26	0.2326
I/M x A	0.037	0.0231	1.61	0.1333
I/M x T	0.040	0.0231	1.72	0.1115
A x T	0.070	0.0231	3.03	0.0104

Where: RC (Regression coefficient), SE (standard error), Soy (soybean oil), I/M (inoculums/medium), A (agitation), T (temperature), Area (area ethyl hexanoate / area 2-heptanol peak). Parameters in bold are statistically significant for the model ($p < 0.05$)

Table 7 ANOVA of the quadratic model

Variation source	SS	df	SM	F value	P value
Regression	1.20	6	0.20	20	< 0.001
Residues	0.25	20	0.01		
Total	1.45	26			
R ² = 0.83			F _{0.95 (6,20)} = 2.60		
SS Sum of squares, df degrees of freedom, SM mean square					

The ANOVA table (Table 7) demonstrated that the quadratic model adjusted for the process responses was satisfactory. The calculated F value was higher than the respective listed value, while the *p* value of the model was lower than 0.001. Although it is not ideal, a value for $R^2 = 0.83$ is a perfectly acceptable value for biological systems (Bicas *et al.*, 2008). Consequently, it is possible to define valid model ($p < 0.05$), given by Eq. 1:

$$\text{Area} = 0.90 - 0.092\text{Soy}^2 - 0.089 \text{I/M}^2 + 0.129 \text{A} - 0.116 \text{A}^2 - 0.171\text{T}^2 + 0.07 \text{A}^*\text{T} \quad (1)$$

where area, Soy, T, I/M, A are, respectively, the relative area between ethyl hexanoate and 2-heptanol, soybean oil, temperature, inoculums/medium (g.L^{-1}) and in codified values.

This equation is graphically represented by the temperature x I/M (g.L^{-1}) (Figure 1), agitation x temperature (Figure 2) and I/M x Soybean concentration (Figure 3) contour curves.

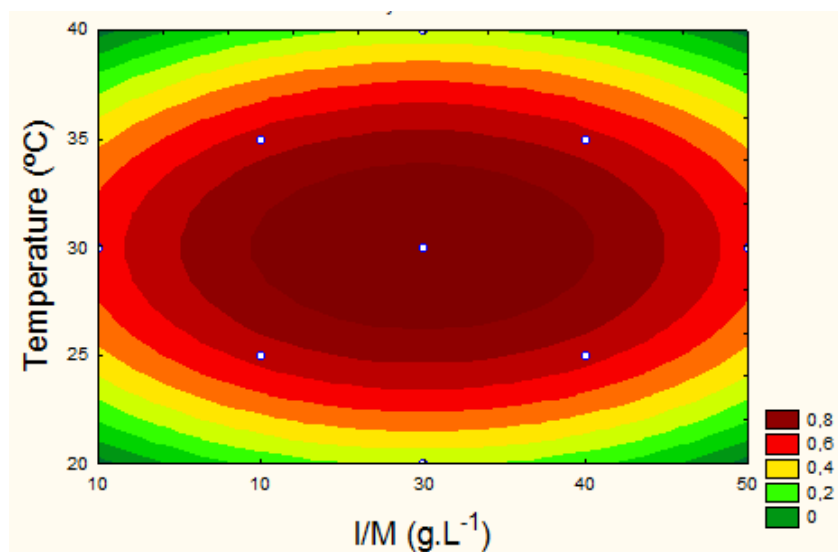


Figure 1 - Contour plot of the Ethyl hexanoate area as a function of temperature and I/M (g.L⁻¹). Agitation was fixed in 200 rpm and soybean concentration in 20 g.L⁻¹.

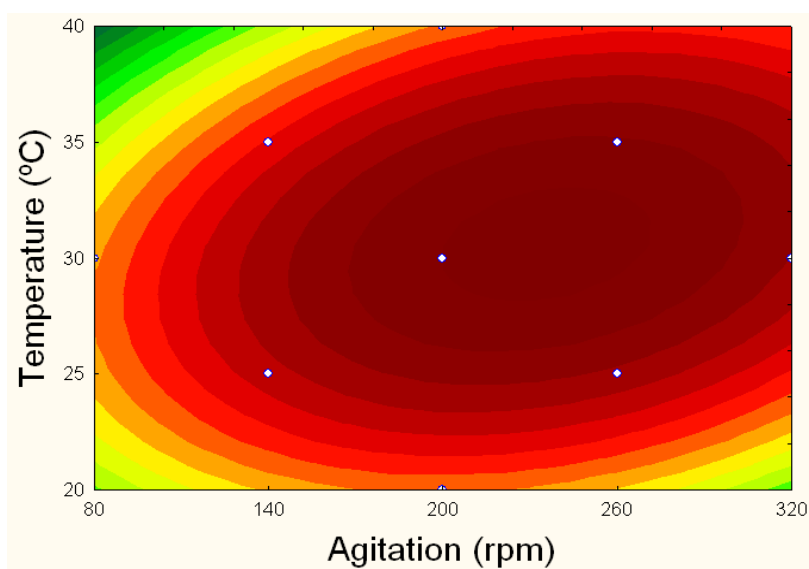


Figure 2 - Contour plot of the Ethyl hexanoate area as a function of temperature and agitation (rpm). The inoculums/medium was fixed in 30 g.L⁻¹ and soybean concentration in 20g.L⁻¹

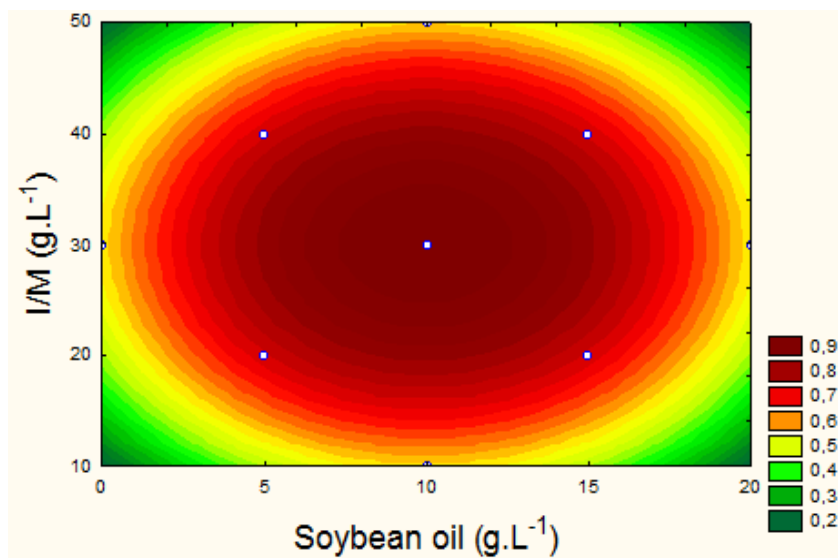


Figure 3 - Contour plot of the Ethyl hexanoate area as a function of soybean oil concentration and I/M (g.L⁻¹). The temperature was fixed in 30°C and agitation in 200 rpm.

According to the contour plots, the best conditions for the highest ethyl hexanoate recovery were 10.0 g.L⁻¹ of soybean oil with 50 g.L⁻¹ of malt extract, 30°C temperature and 200/250 rpm agitation and 30 g.L⁻¹ of inoculum/ culture medium.

4. Conclusion

For the first time a variable screening followed by a central composite design was described to optimize the main parameters involved in the *de novo* syntheses. These optimization techniques were very useful for a full understanding of the process. According to the contour plots, the best conditions for the highest ethyl hexanoate recovery were 10 g.L⁻¹ of soybean with 50.g.L⁻¹ of malt extract, 30°C temperature and 200 rpm agitation and 30g.L⁻¹ inoculum/culture. The following stage of this research should be work a scale up. In the future, a possible genetic manipulation of the microorganism should be considered to increment the yields.

References

- Bicas, J. L., Barros, F. F. C., Wagner, R., Godoy, H. T., Pastore, G. M. (2008). Optimization of R- (+) – α – terpineol production by the biotransformation of R – (+) – limonene. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* , 35, 1061-1070.
- Bicas, J. L.; Dionísio, A. P.; Pastore, G. M. 2009. Bio-oxidation of terpenes: an approach to flavor industry. *Chem. Rev.*, 109, 9, 4518-4531.
- Bicas, J. L., Silva, J. C., Dionísio, A. P., Pastore, G. M. (2010). Biotechnological production of bioflavors and functional sugars. *Ciência Tecnologia de Alimentos*, 30 (1): 7-18.
- Brigido, B. M.; Produção de compostos voláteis por novas linhagens de *Neurospora*, Universidade Estadual de Campinas, 2000, 148p.
- Çelik, D.; Bayraktar, E.; Mehmetoglu, Ü. (2004). Biotransformation of 2-phenylethanol to phenylacetaldehyde in a two-phase fed-batch system. *Biochemical Engineering Journal*, 17, 5-13.
- Gatfield, I. L. (1988) Production of flavor and aroma compound by biotechnology. *Food Technology*, 42,10,110-169.
- Han, S. Y.; Pan, Z. Y.; Huang, D. F.; Ueda, M. (2009). Highly efficient synthesis of ethyl hexanoate catalyzed by CALB-displaying *Saccharomyces cerevisiae* whole-cells in non-aqueous phase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 59, 168-172.
- Krings, U.; Hardebusch B.; Albert, D.; Berger, R. G. Maróstica, M. R. Jr.; Pastore, G. M. (2006). Odor-active alcohols from the fungal transformation of α -farnesene. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54, 9019-9084.

- Maróstica, M. R. Jr.; Pastore, G. M. (2007). Production of R – (+)- α -terpineol by the biotransformation of limonene from orange essential oil, using cassava waste water as medium. *Food Science*, 101, 345-350.
- Mello, L. L. M. M.; Pastore, G. M.; Macedo, G. A. (2005). Optimized synthesis of citronellyl flavour esters using free and immobilized lipase from *Rhizopus* sp. *Process Biochemistry*, 40, 3181-3185.
- Liu, S. Q.; Holland, R.; Crow, V. L. (2004). Esters and their biosynthesis in fermented dairy products: a review. *International Dairy Journal*, 14, 923-945.
- Longo, M.A.; Sanromán, M.A. (2006). Production of food aroma compounds. *Food Technology and Biotechnology*, 44 (3), 335–353.
- Pastore, G. M.; Park, Y. K.; Min, D. B. (1994). Production of fruity aroma by *Neurospora* from beiju. *Mycological Research*, 98, 11, 1300-1302
- Rodrigues, M.I, lemma, A F (2005) Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos. Editora Casa do Pão, Campinas, Brazil.
- Seitz, E. W. (1994). Fermentation production of pyrazines and terpenoids for flavor and fragrances. In: Gabelman A (ed). *Bioprocess production of flavor, fragrance, and color ingredients*. Wiley, New York, pp 95-134.
- Sen, R.; Swaminathan, T. (2004). Response surface modeling and optimization to elucidate and analyse the effects of inoculums age and size on surfactin production. *Biochemical Engineering Journal*, 21,141-148.
- Sumby, K. M.; Grbin, P. R.; Jiranek, V. (2010). Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects. *Food Chemistry*, 121, 1-16.

Yoshizawa, K.; Yamauchi, H.; Hasuo T.; Akita, O.; Hara, S. (1988). Production of a fruity odor by *Neurospora* sp. Agricultural Biological & Chemistry, 52, 8, 2129-2130.

CAPÍTULO 5

Este artigo será submetido ao periódico Bioresource Technology.

CAPÍTULO 5

FRUITY FLAVOR PRODUCTION BY *Neurospora* SP. GROWN ON CASSAVA WASTE WATER AND MALT BAGASSE

ABSTRACT

Application of agro-industrial residues in bioprocesses could be used as alternative substrates in fermentation. Cassava wastewater is originated from the pressing of cassava roots and malt bagasse is a residue of brewery. Although cassava wastewater is considered a pollutant, it can be used along malt bagasse as substrate for fermentative processes. Three strains of *Neurospora* sp grown, on these residues, developed a strong fruity aroma. Ethyl hexanoate produced in the culture broth was extracted using headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and analyzed by using GC-FID. The higher production occurred after 24 hours the fermentation (10.35 mg.L^{-1}) in malt bagasse while the highest yield in cassava wastewater was 5.25 mg. L^{-1} in 48 hours of fermentation.

Keywords: agro-industrial residue, ethyl hexanoate, *Neurospora* sp.

1.Introduction

The biotechnological production of natural flavors has been driven by consumer demand for natural and healthier products. This interest has increased the number of researches on microbial production of the bioflavors, that may be performed in two basic ways: through *de novo* synthesis or by biotransformations (Demyttenaere, *et al.*, 2008; Bicas *et al.*, 2009; Bicas *et al.*, 2010). *De novo* synthesis refers to the production of complex substances from simple molecules through complex metabolic pathways. This technique is particularly interesting because unlike traditional chemical processes, the aroma compounds as considered as “natural”, the biotechnological process occurs under mild conditions and do not generate toxic wastes, and diverse compounds, *i.e.* ester, alcohol and aldehydes, can be produced (Krings & Berger, 1998, Vandamme & Sotaert, 2002).

Application of agro-industrial residues in bioprocesses provides alternative substrates, and helps solving pollution problem, which otherwise their disposal may cause (Pandey *et al.*, 2000). Berger (2009) recently mentioned the use of unconventional culture media as one of the points to be considered for the biotechnological production of aroma compounds, considering the attractiveness of lower production costs of these ingredients. The use of industrial residue as culture medium is a feasible alternative, since the raw material represents 30% of total costs in a biotechnological process (Cameotra *et al.*, 1998).

Cassava pulp is the solid waste generated as a consequence of starch production and its serves as substrate for microorganism growth in bioconversion processes (Pandey *et al.*, 2000). On the other hand, cassava wastewater is

quantitatively the most important liquid residue of the cassava industry (generated at the rate of 250L per ton of cassava) (Damasceno, Cereda & Pastore, 1999) and represents a substrate with a high content of carbon source (Barros *et al.*, 2008). This effluent is usually discharged into the environment, resulting in a major environmental problem, because it has a large load of organic materials dispersed and in solution. The use of the cassava wastewater has been reported in many studies, especially for the production of surfactants (Barros *et al.*, 2010; Nitschcke and Pastore, 2006).

On the other hand, the malt bagasse is a brewery industry by product, being a feed ingredient that may be supplied in pig rations. There is not enough experimental data available related with its use in biotechnological experiments to produce aroma compounds.

Neurospora sp. has the potential to produce aroma compounds, especially esters, responsible for the fruity flavor of diverse foods and beverages (Pastore *et al.*, 1994, Pastore *et al.*, 1995, Yamauchi *et al.*, 1991; Yamauchi *et al.*, 1989, Yoshizawa *et al.* 1988). In this context, the aim of this study was to check the ability of *Neurospora* sp., already reported as potential to produce ethyl hexanoate, in cassava wastewater and malt bagasse. The solid-phase micro extraction (SPME), a sensitive, simple, fast, inexpensive, and reliable method for headspace analysis (Pawliszyn, 1997, Wang *et al.*, 2004) was employed to extract the compounds in the culture medium.

2. Methods

2.1. Preparation and characterization of the substrates

Cassava wastewater was collected from a cassava flour factory and transported to the place of processing at room temperature. It was homogenized, boiled, cooled, centrifuged at 3.500 g for 10 minutes in a pilot-scale basket centrifuge and stored frozen until used.

Bagasse malt was collected from a brewery industry and transported to the place of processing frozen. It was dried at 60 °C until 5 % of humidity. It was further stored at room temperature.

The substrate were characterized by analyses for total nitrogen (AOAC, 2005) total (Daniels *et al.*, 1994) and reducing (Somogyi, 1945) carbohydrates, the mineral fraction - P, K, Ca, Mg, S, Al, B, Cu, Fe, Mn, Zn, Cd, Cr, Ni and Pb - (Maróstica and Pastore, 2007), ammonia, nitrate (Bremer and Keeney, 1965) and pH. All experiments were carried out with the same substrate.

2.2 Preparation of pre-inoculum and fermentation

Three strains of *Neurospora* sp. (LB12DSC, LB23DSC and LB26DSC) inoculated into slant tube of Potato Dextrose agar (PDA) at 30°C for 72 h. After fungal growth, a spore suspension was prepared by adding 10 mL of sterile water into the tube and scraping the mycelia. All its volume was transferred for 250 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of Yeast Malt Broth (YM: 10g.L⁻¹ glucose, 5g.L⁻¹ peptone, 3g.L⁻¹ yeast extract, 3g.L⁻¹ malt extract). This flask was subsequently transferred to an orbital shaker operating at 30°C and 200 rpm for 24 h for fungal growth. After this period the culture broth was filtered through a membrane of

acetate filter (pore size: 0.45 μ m - Sartorius) and the mycelia were washed with sterile water before being used as inoculum in the fermentation experiments. The inoculum consisted of 0.2 gram of biomass added in a flask containing 20 mL of each agro-industrial residue. The flasks were incubated on a rotary shaker (New Brunswick Scientific) at 30°C for until 72 h under agitation (200 rpm). Each 24 h, samples were collected and analyzed in HS-SPME gas chromatography.

2.3 Extraction procedure

For SPME analysis, 20 mL cassava wastewater and in another vial, 20 mL consisting of 5% malt bagasse, diluted in water distilled, were transferred into a 100 mL serum vial containing a microstirring bar. The vial was sealed with a Teflon-lined septa and screw cap, and then immersed in a water bath at 30°C. The SPME fiber coated with DVB/PDMS was manually exposed to the sample headspace for 10 min. The sample was continuously agitated with a magnetic stirring bar during the extraction process to allow faster equilibrium condition. Finally, the fiber was withdrawn into the needle holder and immediately introduced into the GC injection port and held for 10 min to completely desorb the volatile compounds.

2.4 GC-FID conditions

The volatile compounds were analyzed using an Agilent GC 7890A equipped with a flame ionization detector (FID) and a HP-5 column (Agilent Technologies i.d. = 0.320 mm, length = 30 m, film thickness = 0.25 μ m, USA). Desorption proceeded in the injection port of the gas chromatograph for 0.75 min

at 250°C with the purge valve off (splitless mode). Oven temperature was programmed at 50°C for 1 min, then ramped to 150°C at 10°C.min⁻¹ and held for 1 min and finally raised to 200°C at 20°C.min⁻¹ and held for 3 min at the final temperature. Nitrogen was used as the carrier gas with a flow-rate of 1mL.min⁻¹. Detector was 250°C. After desorption, the fiber remained a further 10 min in the injector port to eliminate the possibility of any carry-over of analyte between samples.

2.5 GC-MS conditions

GC-MS analyses were carried out in a GC-MS system (Agilent GC 7890A) under the following instrumental conditions: HP-5 column (5% phenyl 95% dimethylpolysiloxane) fused silica capillary column (Agilent Technologies i.d. = 0.320 mm, length = 30 m, film thickness = 0.25µm, USA), injector mode and temperature: splitless, 250°C; purge time: 1 min., purge flow: 20 mL.min⁻¹; helium flow rate: 1.0 mL.min⁻¹, oven: 50°C (1 min.); 10°C.min⁻¹ up to 150°C; 20°C.min⁻¹ up to 200°C for 3 min; transfer line temperature: 240°C, energy of impact: +70 eV, 35-350m/z). A mixture of aliphatic hydrocarbons (C₅–C₂₀) (PolyScience, Illinois, EUA) was loaded onto the vial and submitted at HD-SPME extraction and injected under the above temperature program to calculate the retention index (I) of ethyl hexanoate.

2.6 Quantification

Quantification was performed using the external calibration curve, with the following concentrations of ethyl hexanoate: 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 mg.L⁻¹.

2.7 Statistical analysis

The data obtained were analyzed using ANOVA ($p < 0.05$). The statistical package used was StatisticaTM 7.0 data analysis software by Statsoft, Inc., USA.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Cassava wastewater and malt bagasse composition

The composition of the cassava wastewater and malt bagasse is shown in Table 1. The cassava wastewater is rich in sugars (sucrose, glucose, fructose and maltose) nitrogen and mineral salts, and the presence of C-source turns this residue into a suitable medium for the cultivation of microorganisms, contributing to make this a feasible industrial biotechnological process (Cameotra and Makkar, 1998, Maróstica and Pastore, 2007). The presence of high levels of several important micronutrients for microbial development makes it an important and promising substrate, since it does not require supplementation (Barros *et al.*, 2008). Furthermore, the malt bagasse represent, in the same way, a promissory residue to use in biotechnological process and, in both cases, was not necessary supplementation of the culture medium.

Table 1 Physicochemical composition of cassava wastewater and malt bagasse.

Components (Units)	Cassava waste water	Malt bagasse
Total carbohydrates (g.L ⁻¹)	28.5	62.3
Reducing sugars (g.L ⁻¹)	12.5	10.9
Lipids (g.L ⁻¹)	1.4	9.87
Humidity (%)	95.42	5.14
Ash (%)	0.44	1.99
Total nitrogen (g.L ⁻¹)	1.0	39.6
Phosphorous (mg.L ⁻¹)	0.2	4.1
Potassium (mg.L ⁻¹)	1.9	0.6
Calcium (mg.L ⁻¹)	0.2	1.9
Magnesium (mg.L ⁻¹)	0.5	2.0
Sulfur (mg.L ⁻¹)	0.1	3.1
Iron (mg.L ⁻¹)	4.3	378.8
Boron (mg.L ⁻¹)	0.3	3.8
Copper (mg.L ⁻¹)	0.6	21.3
Manganese (mg.L ⁻¹)	3.3	64.5
Zinc (mg.L ⁻¹)	2.2	120.9
Ammonia [NH ₄ ⁺] (mg.L ⁻¹)	79.6	12.3
Nitrate [NO ₃ ⁻] (mg.L ⁻¹)	11.6	5.1
pH	6.1	4.0
Organic Carbon (g/Kg)	18.6	480.7
Carbon/ Nitrogen Ratio	18.6	12.1

The major differences in composition of the waste were total of carbohydrates, total nitrogen and organic carbon, where the highest concentrations were found in bagasse malt. Regarding the micronutrients, all showed differences in residues,

3.2 Identification

The identification of ethyl hexanoate was made by mass spectrum and retention index agreed with standards and comparing spectra with Adams (2007) and NIST 98 mass spectral database libraries, with similarities higher than 90% and supported by retention index data.

3.3 Validation method and aroma production

The method was validated under the optimized conditions by determining the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), the inter-and intra-day precisions (RSD), the linearity and relative recovery at different levels of spiked. The results are presented in Table 2. The external standard calibration curve was constructed with 6 concentrations in aqueous matrix (water and standard).

The precision of the method was evaluated based on its repeatability, which was ascertained by performing intra-day repeatability from nine sample extractions analyzed on the same day by the same analyst and using the same instrument and inter-day repeatability from the variation in results of nine analyses performed on three different days (n=3) by the same analyst and using the same instrument. For this purpose, artificial matrix samples (agro-industrial residue, microorganisms

autoclaved after pre-inoculum) were spiked with analyte at 1, 10, 20 mg.L⁻¹.

Accuracy was evaluated by recovery tests, analyzing samples spiked with the same concentration levels used in the precision tests. The results were expressed as the percentage of the expected concentrations (the amounts initially added) of the analytes. The relative standard deviations (RDSs) results are summarized in Table 2. The standard deviations indicated that the dispersion of analysis was independent of the concentration of sample, and the developed method presents a linear range inside the concentrations evaluated. The average RDS % for ethyl hexanoate ranged from 0.56 to 8.27 for the same day and from 1.64 to 12.15 for different days. The low average RDSs for this compound indicated that the analytical conditions were found to be acceptable for these matrixes.

As shown in Table 2, the average recoveries of volatile compound ranged from 29% to 95%. The biggest difference between these matrixes is probably besides composition to physical state, where cassava wastewater is a liquid without suspended materials and malt bagasse contains a solids particules. SPME is a technique based on a equilibrium extraction and the complexity of matrix, directly interfere in the analysis.

The results for accuracy and precision were in were in accordance with the EU decision nº 2002/657. The relative standard deviations in the intra-day repeatability were below 8.27 % and the inter-day were below 12.15%.

This method also proved to be linear for ester concentrations between 1 and 30 mg.L⁻¹ with R² values greater than 0.99. The LOD was calculated from the calibration curves constructed for ethyl hexanoate. LODs (3 x the RDS of the

analytical blank values) were calculated from the calibration curve (Table 2). LOQs are almost 3.33 times LOD. The results confirmed that the LOD and LOQ were low enough to determinate the ethyl hexanoate in real culture medium with *Neurospora sitophila*. The LOD and LOQ ranged, respectively, 0.46 mg.L⁻¹ and 1.41 mg.L⁻¹. Therefore, the results demonstrated that the method was applicable for the analysis of ethyl hexanoate.

Table 2 - The concentration range, regression equations, R², recovery, LOD, LOQ and RSD for the ethyl hexanoate

Matriz	Concentrate range (mg.L ⁻¹)	Regression equation	R ²	Recovery (%)	RDS range %	LOD (mg.L ⁻¹)	LOQ (mg.L ⁻¹)
Cassava waste water	1-30	y = 546.71x + 3885.7	0.9951	94.96	0.56- 6.78 ^a 1.64-7.94 ^b	0.46	1.41
Malt bagasse	1-30	y = 546.71x + 3885.7	0.9951	28.52	1.59 -8.27 ^a 2.64-12.15 ^b	0.46	1.41

Where: ^a: RDS (relative standard deviation) intraday; ^b: RDS inter day; LOD: limits of detection and LOQ limits of quantification.

The identification of ethyl hexanoate was made by comparing mass spectrums and retentions index with Adams (2007) and NIST 2005 mass spectral database libraries, with similarities higher than 90% and supported by retention index data.

According to Figure 1, a decrease occurred in the amount of the ethyl hexanoate along the fermentation. The results show the higher production, for both residues, malt bagasse (10.35 mg.L⁻¹) and in cassava wastewater (6.08 mg.L⁻¹) was with 24 hours of fermentation by strain LB23DSC (see Figure 1 and 2). In the

malt bagasse, the production of this compound was higher, and it could be explained by the differences of composition of each residue (Table 1).

The production of ethyl hexanoate by *Neurospora* sp. was explored by different research groups, especially using malt extract as culture medium (Brigido, 2000; Pastore *et al.* 1995; Pastore, *et al.* 1994; Yamauchi *et al.* 1991; Yoshizawa, *et al.* 1988). However, the production of ethyl hexanoate by *Neurospora* sp. in cassava wastewater and bagasse malt are reported by the first time, representing a promissory alternative to produce this aroma compound.

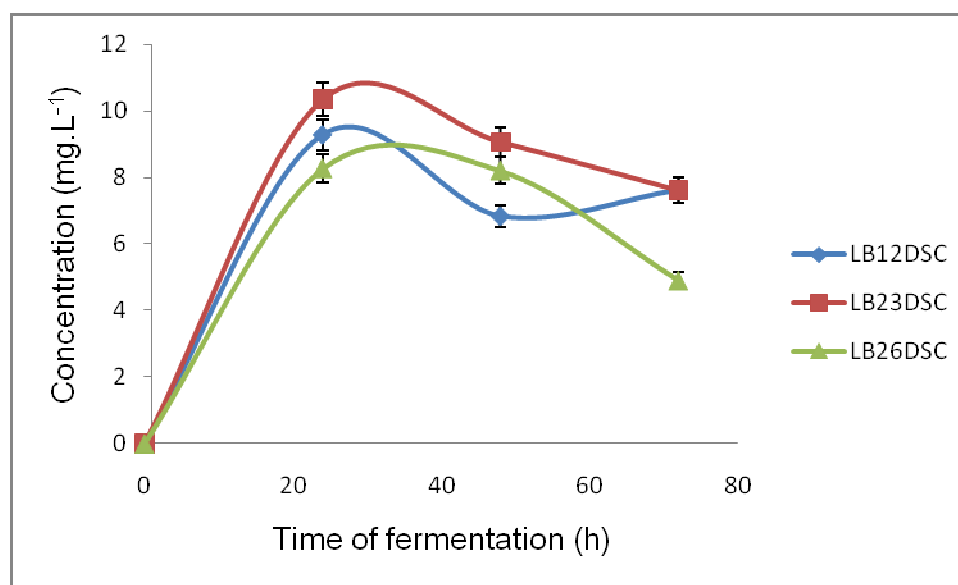


Figure 1- Production of ethyl hexanoate by *Neurospora* sp. in bagasse malt at 30°C under agitation 200 rpm.

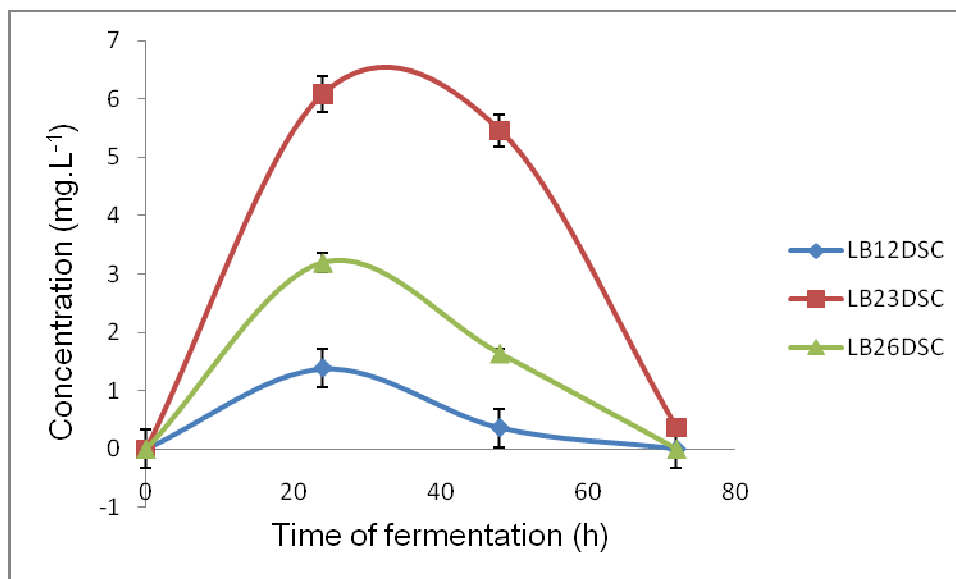


Figure 2- Production of ethyl hexanoate by *Neurospora* sp. in cassava wastewater 30°C under agitation 200 rpm.

4. CONCLUSION

This paper shows the application of two agro-industrial residues as alternative substrates in bioprocesses. The both residues, cassava wastewater and malt bagasse, are an adequate substrate for frutal aroma by *Neurospora* sp. This is interesting because the raw material represents 30% of total costs in biotechnological process, and helps overcoming environmental problems as a result of their disposal. This fact opens new perspectives for this process. Thus, more studies are in course at our lab to increase the yields and the production rates to provide a industrial application.

References

- Adams, R. P. (2007). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectrometry, Allured Publishing Corp.: Carol Stream, Illinois, USA.
- AOAC 1995. Oficial method of analysis, 16th edn. AOAC International, Arlington
- Barros, F. F. C., Ponezi, A. N., Pastore, G. M. 2008. Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* LB5a on a pilot scale using cassava wastewater as substrate. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 35, 1071–1078.
- Berger, R. G. 2009. Biotechnology of flavours—the next generation. Biotechnol. Lett., 31, 1651-1659.
- Bicas, J. L.; Dionísio, A. P.; Pastore, G. M. 2009. Bio-oxidation of terpenes: an approach to flavor industry. Chem. Rev., 109, 9, 4518-4531.
- Bicas, J. L.; Silva, J. C.; Dioniso, A. P.; Pastore, G. M. 2010. Biotechnological production of bioflavours and functional sugars. Ciênc. Tecnol. Aliment. 30,7-18.
- Bremmer J. M.; Keeney, D. R. 1965. Steam-distillation methods for determination of ammonium, nitrate and nitrite. Anal. Chim. Acta 32, 485–495.
- Brigido, B. M. Produção de compostos voláteis de aroma por novas linhagens de *Neurospora*. Campinas, 2000. 148p. Tese (Mestre em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- Cameotra, S. S., Makkar, R. S. 1998. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. Appl. Microbiol. Biotechnol. 50, 520–529.
- Damasceno, S.; Cereda, M. P.; Pastore, G. M. 1999. Desenvolvimento de *Geotrichum fragans* em manipueira. Energia na Agricultura, 14 (2), 7-14.

- Daniels L.; Hanson R.; Phyllips J.A. 1994. Chemical analysis. In: Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, Krieg NR (eds) Methods for general and molecular bacteriology. American Society for Microbiology, Washington
- Demyttenaere, J. C. R., Vanoverschelde, J., Kimpe, N. 2008. Biotransformation of (S)-(+)-Linalool by *Aspergillus niger*: an investigation of the culture conditions. J. Agric. Food. Chem. 49, 5895-5901.
- Krings, U.; Berger, R.G. 1998. Biotechnological production of flavours and fragrances. Appl. Microbiol. Biotechnol. 49, 1-8.
- Maróstica, M. R.; Pastore, G. M. 2007. Production of R- (+) – α - terpeniol by the biotransformation of limonene from orange essential oil, using cassava wastewater as medium. Food Chem., 101, 345-350.
- Nitschke, M.; Pastore, G.M. 2006. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* using cassava wastewater. Bioresour. Technol. 97(2), p. 336-341.
- Pandey, A.; Soccol, C. R.; Nigam, P.; Brand, D.; Mohan, R.; Roussos, S. 2000. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. Biochem. Eng. J. 6 (2), 153-162.
- Pastore, G. M.; Park, Y. K.; Min, D. B. 1994. Production of fruity aroma by *Neurospora* from beiju. Mycol. Res. 98, 1300-1302.
- Pastore, G. M.; Park, Y. K.; Min, D. B. 1995. Production of fruity aroma by *Neurospora* species isolated from beiju. Rev. Microbiol. 26 (1), 55-58.
- Pawliszyn, J. 1997. Solid phase microextraction: theory and practice. Wiley–VCH, New York.

- Somogyi, M. 1945. A new reagent for determination of sugars. J. Biol. Chem. 160, 61–68.
- Vandamme, E. J.; Soetaert, W. 2002. Bioflavours and fragrances via fermentation and biocatalysis. J. Technol. Biotechnol. 77, 1323-1332.
- Yamauchi, H.; Hasuo, T.; Amauchi, T. 1989. Cell-free synthesis of ethyl hexanoate by extract from *Neurospora* sp., containing a novel acyl coenzyme A: Alcohol acyltransferase. Agric. Biol. Chem. 53 (3), 1551-1556.
- Yamauchi, H.; Obata, T.; Amauchi, T.; Hara, S. 1991. Production of characteristic odors by *Neurospora*. Agric. Biol. Chem. 55, 3115-3116.
- Yoshizawa, K.; Yamauchi, H.; Hasuo, T.; Akita, O.; Hara, S. 1988. Production of a fruity odor by *Neurospora* sp. Agric. Biol. Chem. 52 (8), 2129-2130.
- Wang, L.; Xu, Y.; Zhao, G.; Li, J. 2004. Rapid analysis off flavor volatiles in apple wine using headspace solid-phase microextraction. J. Inst. Brew. 110 (1), 57-65.

CAPÍTULO 6

Artigo a ser submetido no periodic Bioresource Technology

CAPÍTULO 6

USE OF EXPERIMENTAL DESIGN FOR ETHYL HEXANOATE

PRODUCTION BY *Neurospora sitophila* GFSC1135 IN MALT BAGASSE

Abstract

Advances in industrial biotechnology offer potential opportunities for economic utilization of agro-industrial residues. Malt bagasse is a fibrous material being considered a waste product obtained from processing of brewery. It is rich in organic nature, which makes it an ideal substrate for microbial process for production of value-added products. Factorial design experiments offer useful information for the process optimization. The influence of the medium composite (glucose, soybean oil, ethanol and glycerol), the cultivation production (temperature and agitation), the substrate concentration and the inoculums/ culture medium on the increase of the relative area of ethyl hexanoate were studied. The compound was extracted using a diethyl ether and was subsequently quantified by GC-FID and identified by GC-MS. The best results were obtained using 4 g.L⁻¹ of ethanol in 50 g of malt bagasse in 1 liter of pure distilled water as the culture medium with 10 g.L⁻¹ of inoculum at 30 °C /150rpm. Under these conditions the concentration of ethyl hexanoate in the culture medium reached 44.73 mg.L⁻¹, a production almost five times greater than earlier trials. The soybean oil levels tested during the process did not influence ethyl hexanoate production significantly.

Keywords *Neurospora sitophila*, experimental design, ethyl hexanoate, bagasse malt

1. Introduction

The consumer's preferences for natural foods have motivated the biotechnological development of alternative aromas (Krings and Berger, 1998;. Bio-aroma production can include the culture of plant cells, microorganisms and enzymes (Janssens *et al.*, 1992; Damasceno *et al.*, 2003). Consequently, aroma production by microorganisms has been the focus of several studies. This is the result of secondary metabolism and labeled as *natural* aroma (Damasceno *et al.*, 2003).

Brazilian economy is one of the most important agricultural-based economies in the world, producing coffee, sugarcane, soybeans, cassava, fruits, etc. Almost every product is exported, which is definitely an excellent contribution for economical development. However, this great production is responsible for the generation of very high amounts of residues that cause serious environmental problems (Pandey and Soccol, 1998; Pandey *et al.*, 2000; Soccol and Vandenberghe, 2003). Not only the application of agro-industrial residues in bioprocess provides alternative substrates, but also helps solving pollution problems (Soccol and Vandenberghe, 2003).

Malt bagasse is a residue produced in large quantities by brewery industry. According to Cabral Filho (1999) and Mello and Pawlowsky (2003) 100 liters of beer generates about 20 kg of bagasse. Optimization of the production of natural aroma compounds using response surface methodology has already been published (Bicas *et al.*, 2008; Celik *et al.*; 2004; Mello, *et al.*, 2005). However, there are no references in the literature describing the use this method as optimization of

production of this compound. This paper describes the optimization of the eight main process variables involved in the production of ethyl hexanoate by *Neurospora sitophila* using a Plackett-Burnan matrix with 12 assays for variables screened, followed by central composite design methodology.

2. Methods

2.1 Microorganism

The microbial strain employed in this study was isolated from the beiju, and was identified as *Neurospora sitophila*.

2.2 Inoculum

Neurospora sitophila was inoculated into a slant tube of Potato Dextrose agar (PDA) at 30°C for 72h. After fungal growth, a spore suspension was prepared by adding 10 mL of sterile water into the tube and scraping the mycelia. All its volume was transferred for 250 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of Yeast Malt Broth (YM: 10g.L⁻¹ glucose, 5g.L⁻¹ peptone, 3g.L⁻¹ yeast extract, 3g.L⁻¹ malt extract). This flask was subsequently transferred to an orbital shaker operating at 30°C and 200 rpm for 24 h for fungal growth. After this period the culture broth was filtered through a membrane of acetate filter (pore size: 0.45µm - Sartorius) and the mycelia were washed with sterile water before being used as inoculum in the fermentation experiments.

2.3 Optimization experiments

As no information was available on the influence of the main parameters involved in the production of ethyl hexanoate using *Neurospora sitophila*. So, an extensive study was carried out in order to define the effects of the medium composition, the cultivation conditions, and the inoculums/culture medium rate, on the response (area ethyl hexanoate peak in GC). The strategy used was a Plackett-Burnan screening design (Bicas *et al.*, 2008; Rodrigues and lemma, 2005) with 12 experiments (PB-12) and three center points to estimate the experimental error and select the main parameters (Tables 1 and 2). A central composite design using the parameters selected was the carried out to define the optimal process conditions (Tables 4 and 5).

2.4 De novo procedure

The inoculum consisted of different quantities of the biomass added in a flask containing 50 mL of different composition of malt bagasse medium and homogenized under sterile conditions using an Ultra-Turrax[®] T18 (Ika, Wilmington, NC, USA).

The flasks were incubated on a rotary shaker under their respective conditions (see Tables 1 and 4). In order to define the highest production of ethyl hexanoate the kinetics was monitored every 24 hours (datas no shown), based on this information, the experiment was conducted at this time of fermentation.

2.5 Quantification and identification of ethyl hexanoate

For the analysis of the volatile compound, 5 mL of malt bagasse were collected into tube with 0.1g NaCl. After agitation vortex (10 sec) they were extracted with 1 mL of diethyl ether containing 0.003% of 2-heptanol as an internal standard. The mixture was agitated vortex for 30 seconds and one microliter of the organics extracts was analyzed by GC-FID.

Analyses were performed using an Agilent GC 7890A equipped with a flame ionization detector (FID) and a HP-5 column (Agilent Technologies i.d. = 0.320 mm, length = 30 m, film thickness = 0.25 μ m, USA). The injection was performed in the splitless mode for 1 min at 250°C. Oven temperature was programmed at 50°C for 1 min, then ramped to 150°C at 10°C.min⁻¹ and held for 1 min and finally raised to 200°C at 20°C.min⁻¹ and held for 3 min at the final temperature. Nitrogen was used as the carrier gas with a flow-rate of 1mL.min⁻¹. Detector was 250°C. Quantification was performed using the external calibration curve of ethyl hexanoate, with concentrations of ethyl hexanoate (1, 10, 20, 30, 40 and 50 mg.L⁻¹), all carried out in triplicate.

For the identification of ethyl hexanoate GC-MS analyses were carried out in a GC-MS system (Agilent 5975C, inert MSD) under the same conditions of run chromatography describe above. The transfer line temperature: 250° C, energy of impact: +70 eV, 35-350m/z). A mixture of aliphatic hydrocarbons (C₅–C₂₀) (PolyScience, Illinois, EUA) was injected under the above temperature program to calculate the retention index (I) of compound.

2.6 Data analysis

The results were analyzed by the software STATISTICA® 7.0 A. A significance level of 10% ($p < 0.1$) was considered for the variables screened and 5% ($p < 0.05$) for the central composite design.

Table 1 Variables and levels evaluated in the screening design

Variables	-1	0	+1
Glucose (g.L ⁻¹)	0	5.0	10.0
Soybean oil (g.L ⁻¹)	0	5.0	10.0
Ethanol (g.L ⁻¹)	0	5.0	10.0
Glycerol (g.L ⁻¹)	0	5.0	10.0
Malt Bagasse (g.L ⁻¹)	50	100	150
Agitation (rpm)	0	150	300
Temperature (°C)	25	30	35
inoculum:medium (g.L ⁻¹)	10.0	20.0	30.0

3. Results and discussion

3.1 Screening of the variables

The levels of the variables tested in the screening design are described in Table 1. These codified values were applied in the PB-12 Plackett-Burnan matrix (Table2). In this case, a *p value* of 0.1 is currently recommended, since it is more conservative and lowers the risk of false- excluding statistically significant parameters (Rodrigues and lemma, 2005).

Table 2 Plackett-Burnan screening design matrix (PB- 12) and the ethyl hexanoate area after 24h of fermentation

	Glu	Soy	Ethanol	Gly	BM	A	T	I/M	Area
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	0.0049
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	0.0206
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	0.0638
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	0.0096
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	0.1619
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	0.4735
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	0.0777
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	0.0134
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	0.9608
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	0.5273
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	0.0247
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0.0188
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2664
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2630
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2795

Glu glucose, Soy soybean oil, Gly glycerol, BM Bagasse Malt, A agitation, T temperature, I/M inoculums/medium ratio (m/m), area: area ethyl hexanoate/ area 2-heptanol peak

3.1.1 Effect of the medium composition

The medium the culture composition being one of the main factors responsible for alterations in yield. It was demonstrated that, considering the ranges tested, neither glucose glycerol and bagasse malt concentration presented any statistical effects on the response, and thus these variables were of no

significant interest (at $p < 0.1$) to this process (Table 3). Soybean oil and ethanol showed a negative effect, which seems that this variable decreases the production of the compound.

Table 3 Estimates of the effects of the parameters analysed after 24 h of fermentation

	Effect	Std.Err.	t(6)	p
Mean/Interc.	0,501063	0,158529	3.16070	0.019548
glucose	0.006427	0.354482	0.01813	0.986121
soybean oil	-0.785458	0.354482	-2.21579	0.068594
ethanol	-0.845231	0.354482	-2.38441	0.054439
glycerol	0.021839	0.354482	0.06161	0.952876
temperature	1.007389	0.354482	2.84186	0.029495
agitation	0.965035	0.354482	2.72238	0.034533
Bagasse malt	-0.122916	0.354482	-0.34675	0.740618
Inoculum/medium proportion	0.106476	0.354482	0.30037	0.774029

3.1.2 Effect of the cultivation conditions

It is known that the medium temperature directly influences biological reactions. Moreover, medium agitation promotes development of the microorganism and cell-substrate interaction (Bicas, *et al.*, 2008). The temperature showed a positive effect ($p < 0.1$), on the *de novo* process, which means that highest this parameter improves the production (table 3).

Agitation showed a positive effect ($p < 0.1$) in the ethyl hexanoate area (table 3), probably related to the increase in cell-substrate contact. Hence, the optimum

agitation may be situated at values above the maximum value tested in the screening (300 rpm), and ampler range is suggested.

3.1.3 Effect of the inoculums size

The size of inoculum is an important factor in a fermentation process, as it has a considerable effect on the subsequent stages (Bicas *et al.*, 2008). But in this case, it has showed no effect in the response, then the least amount of inoculums was used (10 g.L^{-1}).

3.2 Optimization using a central composite design

According to the variables screened, the significant factors ($p < 0.1$) for the process under study, considering the levels tested, which were worth considering in the further optimization design, were soybean oil, agitation temperature and inoculums. For this reason, these four variables, which were analyzed at the levels described in Table 4, were optimized using a 2^4 central composite design with three center points, as shown table 5.

Table 4 Variables and levels evaluated in the central composite design

Variables	Levels				
	-2	-1	0	+1	+2
Soybean oil (g.L^{-1})	0.0	4.0	8.0	12.0	16.0
Ethanol (g.L^{-1})	0.0	4.0	8.0	12.0	16.0
Agitation (rpm)	80	140	200	260	320
Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	20	25	30	35	40

Table 5 2⁴ Central composite design matrix and the ethyl hexanoate GC-FID area after 24h fermentation

	Soy	Ethanol	A	T	Area
1	-1	-1	-1	-1	0.0862
2	+1	-1	-1	-1	0.0580
3	-1	+1	-1	-1	0.0982
4	+1	+1	-1	-1	0.1017
5	-1	-1	+1	-1	0.0185
6	+1	-1	+1	-1	0.0401
7	-1	+1	+1	-1	0.0171
8	+1	+1	+1	-1	0.0167
9	-1	-1	-1	+1	0.8132
10	+1	-1	-1	+1	0.3511
11	-1	+1	-1	+1	0.8963
12	+1	+1	-1	+1	0.5985
13	-1	-1	+1	+1	0.2259
14	+1	-1	+1	+1	0.3516
15	-1	+1	+1	+1	0.4194
16	+1	+1	+1	+1	0.4331
17	-2	0	0	0	0.1420
18	+2	0	0	0	0.3286
19	0	-2	0	0	0.0621
20	0	+2	0	0	0.2017
21	0	0	-2	0	0.0107
22	0	0	+2	0	0.1189
23	0	0	0	-2	0.0258
24	0	0	0	+2	0.1215
25	0	0	0	0	0.6468
26	0	0	0	0	0.6919
27	0	0	0	0	0.6816

Soy soybean oil, A agitation, T temperature, area: area ethyl hexanoate / area 2-heptanol peak.

These data were treated by the software STATISTICA ® v. 7.0, which generated the regression coefficients and respective statistical analysis of the parameters considered (Table 6).

Table 6- The least- squares and significances of the regression coefficients of the model parameters

Parameter	RC	SE	t (12)	P value
Mean	0.67	0.12	5.57	< 0.001
Soy	-0.01	0.04	-0.24	0.811
Soy ²	-0.08	0.05	-1.84	0.090
Ethanol	0.04	0.04	0.89	0.389
Ethanol	-0.11	0.05	-2.41	0.033
A	-0.05	0.04	-1.23	0.241
A²	-0.13	0.05	-2.78	0.017
T	0.16	0.04	3.75	0.003
T²	-0.12	0.05	-2.73	0.018
Soy x EtOH	< 0.01	0.05	0.07	0.9423
Soy x A	0.06	0.05	1.13	0.281
Soy x T	-0.04	0.05	-0.74	0.475
EtOH x A	- 0.01	0.05	-0.16	0.875
EtOH x T	0.04	0.05	0.69	0.505
A x T	-0.06	0.05	-1.17	0.266

RC Regression coefficient, SE standard error, Soy soybean oil, EtOH: ethanol, A agitation, T temperature, area: area ethyl hexanoate / area 2-heptanol peak. Parameters in bold are statistically significant for the model ($p < 0.05$)

Table 7 ANOVA of the quadratic model

Variation source	SS	df	SM	F value	p value
Regression	1,03	4	0.26	6.01	< 0.0001
Residues	0.94	22	0.04		
Total	1.97	26			
$R^2 = 0.52$			$F_{0.95 (4,22)} = 2.82$		

SS Sum of squares, df degrees of freedom, SM mean square

The ANOVA (Table 7) demonstrated that the quadratic model adjusted for the process responses was unsatisfactory. The calculated F value was higher than

the respective listed value, while the p value of the model was lower than 0.0001. However it is not ideal, a value for $R^2 = 0.52$ and indicates that the model is not be used to predictions. Consequently, it is not possible to define valid model ($p < 0.05$).

The low value of R^2 does not invalidate the results obtained in practice, it means that other factors could be affecting the production of well studied here or probably, some assays need to repeated. Then to analyse the assays may have influenced the low R^2 was made the graph of observed values by predicted values (Figure 1). Observed this figure, it is clear that this experiment must be repeated at least, assays 14, 18, 20 and 24. If the value of R^2 remains low, new parameters such as pH and redefinition of ranges need to be surveyed to obtain an appropriate model to make predictions. It is noteworthy that although the model is not able to forecast the data of the tests are true.

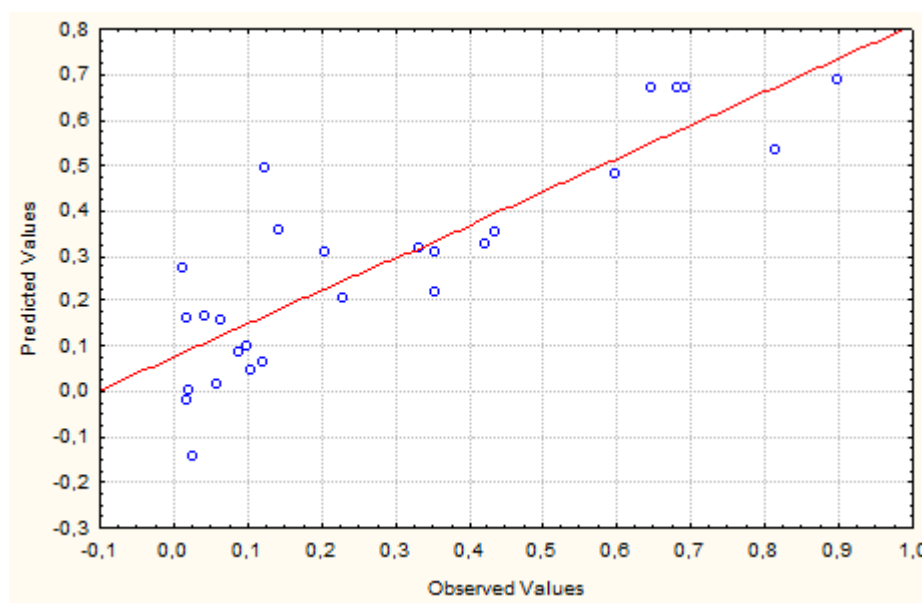


Figure 1. Predicts values x Observed values

In practice, it used 30°C/150 rpm and 10.0 g.L⁻¹ inoculum, reaching a value of 44.73 mg L⁻¹ ethyl hexanoate after one day of fermentation.

4. Conclusion

For the first time a variable screening followed was described which parameters should be used to optimize the production of ethyl hexanoate by *Neurospora sitophila* in bagasse malt using de novo syntheses. This screening technique was very useful for an understanding of the process. The following stage of this research should be repeated some assays in order to use the model to make predictions. Nevertheless, in practice the highest concentrations of this compound was obtained in temperature 30°C, agitation 150 rpm and ethanol 4.0 g.L⁻¹ and an inoculum/culture medium of 10 g.L⁻¹.

References

- Bicas, J. L.; Barros, F.F.C.; Wagner, R.; Godoy, H. T.; Pastore, G. M. 2008. Optimization of R- (+) – α – terpineol production by the biotransformation of R – (+) – limonene. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 35, 1061-1070.
- Cabral Filho, S. L. S. Avaliação do resíduo de cervejaria em dietas de ruminantes através de técnicas nucleares correlatas. Dissertação de mestrado. Piracicaba, 1999, 68p.
- Celik D.; Bayraktar, E.; Mehmetoglu, U.; 2004. Biotransformation of 2-phenylethanol to phenylacetaldehyde in a two-phase feedback system. Biochem. Eng. J. 17, 5-13.

- Damasceno, S.; Cereda, M. P.; Pastore, G. M.; Oliveira, J. G. 2003. Production of volatile compounds by *Geotrichum fragrans* using cassava wastewater as substrate. *Process Biochem.* 39, 411- 414.
- Janssens, L.; De potter, H. L.; Schamp, N. M.; Vandamme, E. J. 1992. Production of flavours by microorganisms. *Process Biochem.* 27, 195-215.
- Krings, U.; Berger, R. G. 1998. Biotechnological production of flavours and fragrances. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49, 1-8.
- Mello, L. L. M. M.; Pastore, G. M.; Macedo, G. A. (2005). Optimized synthesis of citronellyl flavour esters using free and immobilized lipase from *Rhizopus* sp. *Process Biochemistry*, 40, 3181-3185.
- Mello, E. T.; Pawlowsky, U. 2003. Minimização de resíduos em uma indústria de bebidas. *Engenharia Sanitária e Ambiental.* 8, 4, 249-256.
- Pandey, A.; Soccol, C. R. 1998. Bioconversion of biomass: a case study of lignocellulosics bioconversions in solid-state fermentation. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 41, 379-390.
- Pandey, A.; Soccol, C. R.; Nigam, P.; Soccol, V. T. 2000. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I. Sugarcane bagasse. *Biores. Technol.* 74, 69-80.
- Rodrigues, M.I.; Iemma, A. F. 2005. Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos. Editora Casa do Pão, Campinas, Brazil.
- Soccol, C. R.; Vandenberghe, L. P. S. 2003. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochem. Eng. J.* 13, 20.

CONCLUSÃO GERAL

A capacidade produtora de diferentes linhagens de *Neurospora* sp. isoladas de beiju foi evidenciada. Entretanto, a linhagem *Neurospora sitophila* GFSC1135 foi capaz de produzir a maior concentração de hexanoato de etila e portanto selecionada para a otimização, tanto em meio sintético quanto em resíduo agroindustrial.

O melhor meio sintético para a produção do éster foi o extrato de malte. Em condições não otimizadas, onde se utilizou 30°C, 50 g.L⁻¹ desse meio de cultura, 20 g.L⁻¹ de biomassa e 200 rpm de agitação, a linhagem produziu 8,07 mg.L⁻¹. Após a otimização do processo, com o auxílio de planejamento experimental, nas condições otimizadas, as quais foram: 30°C, 200 rpm, 10 g.L⁻¹ de óleo de soja acrescentados em 50 g.L⁻¹ de meio extrato de malte e 30 g.L⁻¹ de biomassa, o micro-organismo foi capaz de produzir 45,37 mg.L⁻¹.

A técnica de microextração em fase sólida mostrou-se adequada para a triagem de linhagens com potencial produtor de hexanoato de etila, além de permitir detectar compostos que por ventura coeluem com o pico do solvente quando se utiliza como técnica de preparo de amostra a extração líquido-líquido.

Devido à complexidade da composição dos meios de cultura juntamente com a biomassa, essas matrizes podem ser consideradas difíceis de serem manipuladas. Sendo assim, alguns parâmetros de validação foram avaliados, tanto para o método que utilizou extração líquido-líquido quanto para o que usou a técnica de microextração em fase sólida, para dar segurança analítica, evidenciando a qualidade do laboratório e confiabilidade dos resultados obtidos.

Todos os métodos validados se mostraram adequados para as análises realizadas nesta tese.

Foi estudada a potencialidade do uso da manipueira e do bagaço de malte, resíduos agroindústrias oriundos da indústria da mandioca e de cervejaria, respectivamente, como substrato para a produção do hexanoato de etila. Comparando-se os resultados obtidos para os diferentes resíduos a maior produção foi cerca de 10 mg.L^{-1} em bagaço de malte com 24 horas de fermentação quando comparado com cerca de 5 mg.L^{-1} obtidas em manipueira. Dessa forma, foi demonstrando, que o uso de resíduos agroindustriais, pode ser uma alternativa para o barateamento do processo representando uma possibilidade exequível. Como no bagaço de malte, foi obtido a maior concentração, este foi selecionado para a otimização da produção do éster.

Para a otimização foi utilizado planejamento experimental. Os resultados demonstraram que o uso da matriz Placket-Burmann, foi eficiente para a seleção de variáveis que podem influenciar a produção do éster estudado. Entretanto, o delineamento Composto Central Rotacional, precisa ser revisto para o modelo gerado a partir dessa ferramenta estatística, pode ser usado para previsões. Mesmo assim nas condições usando 30°C , 150 rpm, 4 g.L^{-1} de etanol em 50 g.L^{-1} de meio de bagaço de malte e 10 g.L^{-1} de biomassa a produção de hexanoato de etila atingiu 44,73 após 24 horas. Observa-se que esta concentração é muito próxima da obtida em meio extrato de malte, que foi de $45,37 \text{ mg.L}^{-1}$, e não havendo diferença estatística entre as concentrações obtidas nos diferentes meios. Sendo assim, este processo se torna plausível para investimentos de

indústrias, pois o uso de resíduos além de baratear o processo ajuda a agregar valor a esses sub-produtos.

Neste trabalho relata-se o inédito uso de bagaço de malte para a produção de compostos de aroma e a otimização do processo de produção do hexanoato de etila, resultados que geraram um pedido de patente junto ao Instituto Nacional de Propriedade Intelectual.

Trabalhos futuros de ampliação de escala e o uso da *Neurospora sitophila* GFSC1135 liofilizada, visando eliminar a etapa de pré-inóculo, serão estudados para tornar cada vez mais atrativa a inovação.