



VERÓNICA ALEJANDRA BONILLA HERMOSA

**APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS DO
PROCESSAMENTO SEMI-SECO DO CAFÉ
PARA A PRODUÇÃO DE COMPOSTOS DE
VALOR AGREGADO**

LAVRAS - MG

2014

VERÓNICA ALEJANDRA BONILLA HERMOSA

**APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO SEMI-
SECO DO CAFÉ PARA A PRODUÇÃO DE COMPOSTOS DE VALOR
AGREGADO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Rosane Freitas Schwan

Coorientador

Dr. Whasley Ferreira Duarte

LAVRAS - MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Bonilla Hermosa, Verónica Alejandra.

Aproveitamento dos resíduos do processamento semi-seco do café para a produção de compostos de valor agregado / Verónica Alejandra Bonilla Hermosa. – Lavras : UFLA, 2014.

76 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Rosane Freitas Schwan.

Bibliografia.

1. Polpa de café. 2. Bioetanol. 3. Compostos voláteis. 4.
Hasensenaspora uvarum. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD – 660.28449

VERÓNICA ALEJANDRA BONILLA HERMOSA

**APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO SEMI-
SECO DO CAFÉ PARA A PRODUÇÃO DE COMPOSTOS DE VALOR
AGREGADO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 27 de fevereiro de 2014.

Dr. Whasley Ferreira Duarte UFLA

Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista UFLA

Dra. Kátia Regina Freitas Schwan Estrada UEM

Dra. Rosane Freitas Schwan
Orientadora

LAVRAS - MG

2014

Aos meus pais Héctor e Teresa

Ao meu namorado José

Com amor,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer a Deus, por me conceder a vida, por tudo que sou e o que tenho, por me permitir realizar este sonho, dando-me sempre forças e coragem para lutar.

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Biologia, pela oportunidade de realização do curso e disponibilizar a sua estrutura para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de estudos através do Programa Estudante Convênio Pós-Graduação (PEC-PG).

À professora Dra. Rosane Freitas Schwan pela orientação, pela oportunidade para cumprir com este sonho, pelos ensinamentos, por me guiar e a confiança em mim depositada.

Ao professor Dr. Whasley Ferreira Duarte, meus sinceros agradecimentos pelos ensinamentos, disponibilidade, paciência, apoio e sugestões concedidas em todo momento.

Aos professores do programa de Microbiologia Agrícola, pelos ensinamentos que contribuíram para a melhoria da minha formação profissional.

Às técnicas do laboratório, Cidinha e Ivani, pelas facilidades, acolhida, amizade, ajuda e apoio em todo momento.

À secretária da pós-graduação, Rose, pela paciência e disponibilidade.

Aos amigos e colegas do laboratório de fermentações, Monique, Andreia, Juliana, Suzana, Kelly, Ana Luiza, Karla, Mariana, Igor, Géssyca, Daelen, Lauany e Vanessa pelo carinho, convívio e ajuda. Em especial a minha amiga Luciana, pela linda amizade que construímos, pela confiança e por ter contribuído com a realização deste trabalho.

Obrigada a todos por fazer com que minha estada no Brasil seja maravilhosa.

Aos colegas do curso, especialmente àqueles com quem formamos equipe, fizemos disciplinas ou simplesmente convivemos, pelo carinho e momentos agradáveis.

Aos meus amigos Isabel, Lili, Maira e Fábio, pela amizade, carinho, solidariedade, apoio constante, pelos momentos de descontração, muito obrigada por ser minha querida família brasileira.

Aos meus pais, Héctor e Teresa, porque nunca mediram esforços para que eu alcançasse meus objetivos, por seu apoio, por acreditarem no meu potencial, por apoiarem as minhas escolhas, pela força e amor incondicional.

Aos meus irmãos Héctor e Katty que sempre estiveram ao meu lado, pelo seu carinho, apoio e ajuda em todo momento.

Ao meu namorado, José, por seu amor, paciência, por ser meu pilar e apoio em todo momento, pelo incentivo e força para alcançar esta conquista.

Aos meus familiares e amigos pelas palavras de incentivo, pelas orações e pela presença constante.

Aos meus amigos equatorianos Lorena, Soledad, Andrea, Rosana, Isabel, Fernanda, Elizabeth, Alberto e Andrés, pelo incentivo e apoio constante apesar da distância.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!!!

RESUMO

O café é um dos produtos mais cultivados no mundo. Durante o processamento semiseco do café, é gerada uma quantidade significativa de polpa e águas residuárias geradas na desmucilagem do fruto. O objetivo deste estudo foi avaliar a viabilidade de produção de etanol e compostos voláteis aromáticos a partir da fermentação desses resíduos, testando oito diferentes estirpes de leveduras. Os experimentos de fermentação foram realizados em 100 mL de meio, composto por uma mistura de polpa de café moída e água residuária. A estirpe *Hanseniaspora uvarum* UFLA CAF76 apresentou o melhor desempenho fermentativo, razão pela qual foi selecionada para avaliar diferentes composições de meio de cultura e de tamanho de inóculo, visando o aprimoramento do desempenho da fermentação. Os melhores resultados foram obtidos com as seguintes condições: 12% p/v de polpa de café, 1 g/L de extrato de levedura e 0,3 g/L (peso seco) de inóculo. Utilizando essas condições foi realizada outra fermentação em 1 L de meio de cultura, atingindo um alto rendimento de etanol, alta produtividade e alta eficiência de conversão de açúcares em etanol, com valores de 0,48 g/g, 0,55 g/L h e 94,81%, respectivamente. Além disso, foram identificados vinte e um compostos voláteis, na fermentação com *H. uvarum* UFLA CAF76, correspondentes aos grupos de álcoois superiores, acetatos, terpenos, aldeídos e ácidos voláteis. Tais resultados indicaram que os resíduos da indústria de café têm potencial para serem usados como substratos para a produção de compostos de valor agregado. O processo descrito neste trabalho poderá ajudar tanto à conservação do meio ambiente quanto à melhora da economia dos fazendeiros produtores de café. Por outro lado, *H. uvarum* UFLA CAF76 demonstrou alta capacidade fermentativa utilizando os resíduos do café, sendo uma levedura interessante para posteriores estudos.

Palavras-chave: Polpa de café. Bioetanol. Compostos voláteis. *Hanseniaspora uvarum*.

ABSTRACT

Coffee is one of the most cultivated products worldwide. The semi-dry processing generated significant amounts of coffee pulp and coffee wastewater. The objective of this study was to evaluate the feasibility of ethanol and volatile compounds production by fermentation of these residues, testing eight different yeast strains. Batch fermentation studies were performed in 100 mL, employing ground coffee pulp mixed with coffee wastewater. The strain *Hanseniaspora uvarum* UFLA CAF76 provided the best fermentation performance; hence it was selected to evaluate different culture medium compositions and the inoculum size for improving the fermentation performance. The best results were obtained with the follow conditions: 12% w/v of coffee pulp, 1 g/L of yeast extract and 0.3 g/L of inoculum size. Using these conditions was carried out a fermentation in 1 L of culture medium, achieving higher ethanol yield, ethanol productivity and conversion efficiency with values of 0.48 g/g, 0.55 g/L h and 94.81% respectively. Moreover, twenty-one volatile compounds corresponding to higher alcohols, acetates, terpenes, aldehydes and volatile acids were identified in the fermentation with *H. uvarum* UFLA CAF76. Such results indicated that coffee residues have excellent potential as culture medium for value-added compounds production, with this process would be attempted simultaneously conserving environment and improving the economic return to coffee producer farmers. Furthermore, *H. uvarum* UFLA CAF76 demonstrated high fermentative capacity using these coffee residues, thus it is an interesting yeast for further studies.

Keywords: Coffee pulp. Bioethanol. Volatile compounds. *Hanseniaspora uvarum*.

SUMÁRIO

	PRIMERA PARTE	
1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	Generalidades do café	13
2.2	Processamento semiseco do café e seus resíduos	16
2.2.1	Polpa de café	17
2.2.2	Mucilagem do café	18
2.2.3	Águas residuárias da desmucilagem do café	19
2.3	Bioetanol	20
2.3.1	Bioetanol de segunda geração	22
2.4	Compostos voláteis aromáticos	24
2.5	Microrganismos fermentadores	28
2.6	Head-space Microextração em fase sólida (HS-SPME)	31
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
	REFERÊNCIAS	34
	SEGUNDA PARTE - ARTIGO	39
	ARTIGO 1 Utilization of coffee residues obtained from semi-dry process for production of value-added compounds	39

PRIMERA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O café é a bebida mais consumida e um dos cultivos mais importantes no mundo. O Brasil, maior produtor mundial de café, gera grandes quantidades de resíduos agroindustriais após a sua produção e processamento. Estima-se que anualmente são geradas 225 milhões de toneladas de resíduos líquidos e 9,9 milhões de toneladas de resíduos sólidos em nível mundial (DIAS et al., 2014).

A polpa do café é um abundante resíduo do processamento semiseco, que representa aproximadamente 29% do peso seco do fruto inteiro. A desmucilagem do grão de café utiliza grandes quantidades de água, que se convertem em águas residuárias do processo, que junto com a polpa são dispostas geralmente nos cursos de água ou no solo, sem o devido tratamento. Assim estes resíduos constituem uma importante fonte de contaminação nos países produtores devido à presença de uma grande quantidade de material orgânico, além de quantidades consideráveis de compostos tóxicos e antinutricionais, como a cafeína, taninos e polifenóis (MUSSATTO et al., 2011).

Nos últimos anos, existe crescente interesse em dar um uso econômico a estes resíduos através do desenvolvimento de processos biotecnológicos eficientes. Dado que a polpa contém grandes quantidades de carboidratos, pode-se considerá-la como substrato interessante para a produção de compostos de valor agregado, como o bioetanol e compostos voláteis aromáticos.

Os problemas de mudança climática e o desejo de reduzir a dependência do petróleo têm gerado interesse no desenvolvimento do bioetanol como fonte alternativa de energia, por este ter uma natureza renovável, tecnologia de produção otimizada e potencial para mitigar os gases de efeito estufa. No entanto, a maior parte do bioetanol é produzida a partir de matérias-primas

utilizadas na alimentação humana, sendo de suma importância direcionar as pesquisas para a produção de bioetanol de segunda geração, gerado a partir da biomassa residual.

Por outro lado, os compostos voláteis de aroma e sabor são muito importantes nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e de cosméticos. No mercado mundial, esses compostos têm um volume de 20 bilhões de dólares anuais, com uma taxa de crescimento anual de 4 a 5%. A maioria dos compostos de aroma atualmente disponíveis são produzidos através de síntese química. A sua produção por meio de processos biotecnológicos é um mercado em desenvolvimento e com um futuro promissor, devido à crescente escolha por processos ecológicos, além de que os consumidores preferem produtos "naturais". Esses aromas naturais são sintetizados em processos microbianos, como a fermentação (*síntese de novo*) ou biocatálise (BERGER et al., 2009).

Apesar das consequências negativas dos resíduos do café e de seu grande potencial como matéria-prima, existe pouca informação quanto ao seu aproveitamento na geração de produtos de valor agregado. Assim, é importante desenvolver pesquisas que ajudem a estabelecer condições adequadas para o processo fermentativo para obter os maiores rendimentos de tais produtos.

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a produção de bioetanol e compostos voláteis, com oito estirpes de leveduras e utilizando a polpa de café e as águas residuárias da lavagem do grão do café como substratos para a fermentação. Após, avaliar o efeito da composição do meio de cultivo e do tamanho de inóculo no desempenho fermentativo da levedura pré-selecionada, além de determinar o seu perfil de compostos voláteis produzidos sob essas condições.

Desta maneira pode-se contribuir com a redução do impacto ecológico nas regiões cafeeiras e propor uma opção biotecnológica para obter produtos em

benefício da sociedade, que ajudarão a melhorar a renda econômica das famílias que vivem da produção do café e na criação de novos empregos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A geração de resíduos e subprodutos é inerente a qualquer setor produtivo. Os setores agroindustriais e de alimentos produzem grandes quantidades de resíduos, tanto líquidos quanto sólidos. O café é o segundo maior produto negociado no mundo, apenas depois do petróleo, portanto sua indústria é responsável pela geração de grande quantidade de resíduos (DIAS et al., 2014). Com a preocupação do grave impacto ambiental que causam esses resíduos e pressão das novas legislações ambientais, na última década, a utilização desses resíduos tem sido objeto de vários estudos.

A polpa de café e as águas residuárias da desmucilagem do fruto, principais resíduos do processamento semiseco do café, apresentam um conteúdo de nutrientes propício para o crescimento microbiano, assim podem ser usados como substratos para diferentes bioprocessos que produzam compostos de interesse econômico como são o bioetanol e os compostos voláteis aromáticos.

2.1 Generalidades do café

O café pertence à família *Rubiaceae*, existem mais de 70 espécies, no entanto duas são comercialmente produzidas, *Coffea arabica* L. (75% da produção mundial) e *Coffea canefora*, também chamada de Robusta (25% da produção mundial). A primeira espécie apresenta melhores propriedades sensoriais enquanto a segunda é mais resistente às pragas (MUSSATTO et al., 2011). A província de Kaffa, na Etiópia é considerada o *habitat* original do café arábica, enquanto que o café robusta é nativo da África Central (MURTHY; NAIDU, 2012).

Atualmente são produzidas mais de 9 milhões de toneladas anuais de café em todo o mundo, sendo o Brasil o maior produtor com 3 milhões de toneladas ao ano, seguido do Vietnã e Colômbia, como segundo e terceiro produtores mundiais, responsáveis por mais da metade da oferta mundial de café (INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION, 2014).

De acordo com a produção atual de café, estima-se que são geradas aproximadamente 225 milhões de toneladas de resíduos líquidos (25 t de águas residuárias por tonelada de grãos de café) e 9,9 milhões de toneladas de resíduos sólidos, incluindo casca, polpa, mucilagem, pergaminho, película prateada e borra de café (1,1 t de resíduos sólidos por tonelada de grãos de café) (DIAS et al., 2014).

O fruto do café (Figura 1) é ovoides e é formado por (MUSSATTO et al., 2011):

- a) **Epicarpo:** formado pela casca do grão de café. A casca com o amadurecimento passa de verde a vermelha ou amarela. O epicarpo é constituído principalmente por material lignocelulósico;
- b) **Mesocarpo ou Mucilagem:** É uma camada de espessura de 0,5 a 2 mm; é um sistema coloidal líquido, um hidrogel. Quimicamente constituído por água, pectinas, açúcares e ácidos orgânicos;
- c) **Endocarpo:** conhecido como pergaminho. É uma membrana cartilaginosa que recobre a semente ou grão de café. Constituído essencialmente de material celulósico;
- d) **Espermoderma:** conhecido como película prateada, que rodeia o endosperma, e é eliminado quando o grão entra no processo de torra;
- e) **Endosperma:** é o grão de café, parte utilizada na preparação da bebida de café. A dimensão dos grãos varia no comprimento de 7 a 15 mm, na largura de 6 a 8 mm e no peso de 0,1 e 0,2 g.

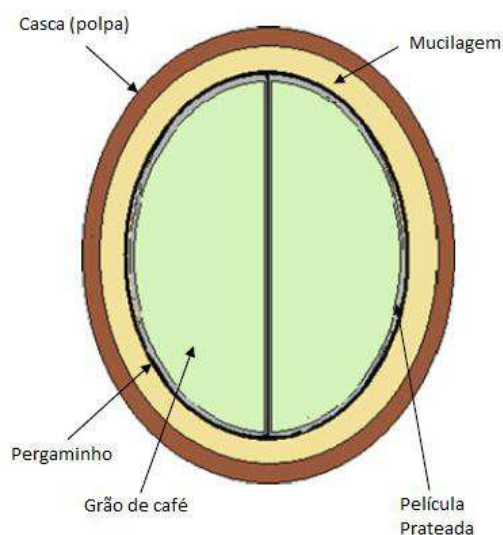


Figura 1 Esquema de um corte longitudinal do fruto do café

Fonte: (MUSSATTO et al., 2011).

No processamento do café, existem principalmente dois métodos, um por via seca e outro por via úmida. Na via seca, os frutos frescos colhidos são espalhados uniformemente em um terreiro limpo (de terra ou concreto) até uma espessura de 8 cm, onde são fermentados e secos com revolvimento constante. O café cereja fica totalmente seco em 12 - 15 dias com boas condições meteorológicas, dando origem ao café natural e gerando o subproduto conhecido como casca (MURTHY; NAIDU, 2012). Esta prática é preferida na Etiópia, Haiti, Indonésia e Brasil (DIAS et al., 2014).

Na via úmida, o café cereja colhido é mecanicamente descascado, despulpado, desmucilado e transferido para tanques de fermentação, onde é digerida a camada de mucilagem que fica aderida no grão. Este processo pode durar de 24 a 72 horas a 30 - 35 °C. Finalmente os grãos com pergaminho são secos ao sol até uma umidade de 11 - 12% para continuar com o processamento.

Este processo dá origem ao café descascado, despulpado e desmucilado, gerando como subproduto a polpa de café. A via úmida é utilizada na Colômbia, países de América Central, Etiópia, Haváí e Índia (DIAS et al., 2014; MURTHY; NAIDU, 2012).

2.2 Processamento semiseco do café e seus resíduos

Existe um terceiro método, a via semiúmida (também chamada semisseca), que nos últimos anos vem ganhando mais adeptos entre os cafeicultores brasileiros (BRUNO; OLIVEIRA, 2008). Por meio dessa via, o produto final, no mercado, tem preços mais elevados, além disso, este processamento requerer uma menor área para a secagem, melhora a qualidade de bebida e reduz gastos com energia e mão-de-obra (BRUNO; OLIVEIRA, 2008).

O processamento semiseco do café começa quando ele ainda está fresco, em estágio de cereja. A remoção da casca e mucilagem é realizada mecanicamente, e durante este processo se utiliza abundante quantidade de água, especialmente para retirar a mucilagem do grão de café. A diferença com o processamento por via úmida é a substituição da fermentação submersa por um desmucilador para eliminar a mucilagem. Depois os grãos despulpados e desmucilados são levados para os terreiros para fermentação e secagem, continuando com o processo. No final do processo, é gerada uma fração sólida que é a polpa, e uma fração líquida que é a água residuária da desmucilagem do grão. (PANDEY et al., 2000; CAMPOS; PRADO; PEREIRA, 2010). Menos de 50% do fruto fresco é utilizado na produção do café comercializado (ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012).

2.2.1 Polpa de café

A polpa é considerada o resíduo da despolpa úmida do café cereja, composta pela casca (epicarpo) e parte da mucilagem (mesocarpo). A diferença básica entre casca e polpa é que a primeira é obtida seca e contém o pergaminho, e segunda é úmida e não possui o pergaminho, pois este fica envolto ao grão de café como forma de proteção.

Estima-se que em torno de 40% do peso do fruto fresco do café seja constituído pela polpa. A polpa é essencialmente rica em carboidratos, proteínas e minerais (especialmente o potássio) (ULLOA et al., 2003).

A polpa do café apresenta uma média de 14% de açúcares totais, 10% de proteínas, 2,5% de lipídeos, 6,5% de substâncias pécnicas totais e 18% de fibras. Além de conter compostos considerados tóxicos e antinutricionais, como a cafeína, taninos e compostos fenólicos (PANDEY et al., 2000), que podem afetar a fauna e a flora, por exemplo, em animais diminuem a ingestão de alimentos e a absorção de nutrientes (ULLOA et al., 2003).

A cafeína é um composto ativo, um dos estimulantes naturais mais poderosos. Está presente em uma concentração de 0,87% a 1,3% na polpa do café (peso seco) (ULLOA et al., 2003). A concentração deste alcaloide é de duas a dez vezes menor na casca do que no grão (ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012).

No caso dos taninos, os dados encontrados nos diferentes estudos são contraditórios já que podem variar dependendo da metodologia de análise utilizada e da variedade do café. Eles podem estar em concentrações de 1,80 a 8,56% (PANDEY et al., 2000), e sabe-se que sua concentração aumenta ao longo da secagem da polpa e é maior em variedades de café amarelo do que nos vermelhos (ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012).

Os compostos fenólicos da polpa do café foram avaliados por Ramirez-Martinez (1988), encontrando ácido clorogênico (42,2% do total de compostos fenólicos), epicatequina (21,6%), ácido 3,5-dicaféoilquínico (19,3%), ácido 3,4-

dicafeoilquínico (5,7%), ácido 4,5-dicafeoilquínico (4,4%), catequina (2,2%), rutina (2,1%), ácido protocatequínico (1,6%) e ácido ferúlico (1,0%).

A polpa do café contém grandes quantidades de lignina, celulose e hemicelulose (17, 30 e 3% respectivamente), também contém elementos inorgânicos como nitrogênio, fósforo e potássio, dentre outros (MURTHY; NAIDU, 2012). Devido à sua composição, a polpa de café tem um grande potencial para ser utilizada na produção de diferentes compostos de valor agregado.

Nas fazendas produtoras de café, a polpa produzida é geralmente depositada em pilhas para permitir sua secagem e, assim, possibilitar seu posterior uso como adubo orgânico na lavoura. Com o contínuo uso destas áreas como depósito, os lixiviados produzidos por este material são uma fonte de poluição para o solo e águas subterrâneas, provocando alterações químicas e físicas. Devido à sua umidade elevada, a polpa é propensa à decomposição e fermentação, gerando odores desagradáveis, proliferação de mosquitos, além de dificultar a sua manipulação (ASOCIACIÓN NACIONAL DEL CAFÉ, 2005).

Com a finalidade de mitigar esses problemas, têm sido estudadas alternativas de uso da polpa e casca do café, como compostagem, alimentação animal, cultivo de cogumelos, produção de enzimas, compostos fenólicos, biogás, ácidos orgânicos, pectina, metabólitos secundários (sustâncias de aroma e sabor), proteína unicelular (*single cell protein* SCP), processos de ensilagem, preparação de meios de cultivo, dentre outros (PANDEY et al., 2000).

2.2.2 Mucilagem do café

A mucilagem é a fração do café que permanece aderida ao grão no processamento úmido após o despolpamento. Apresenta-se como um líquido viscoso, translúcido e incolor. A mucilagem é composta de água (84,2%),

proteínas (8,9%), açúcares (4,1%), substâncias pécicas (0,91%) e cinzas (0,7%) (ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012).

O processamento de cada quilograma de café cereja produz 91 mL de mucilagem pura que, por conter um considerável teor de nutrientes, também é considerada um substrato interessante em fermentações microbianas (ZAMBRANO et al., 1999).

2.2.3 Águas residuárias da desmucilagem do café

A água residual gerada da remoção da mucilagem do café cereja adquire componentes solúveis e insolúveis da polpa e da mucilagem (ASOCIACIÓN NACIONAL DEL CAFÉ, 2005). Portanto essas águas são ricas em matéria orgânica, contendo açúcares (frutose, glicose e galactose), proteínas, pectinas, celulose, hemicelulose, polifenóis (ácidos clorogênico e cafêico), taninos e cafeína, pequenas quantidades de corantes naturais (antocianinas) e lipídeos (ZAMBRANO et al., 1999; DIAS et al., 2014).

As demandas química (DQO) e bioquímica (DBO) de oxigênio têm sido encontradas com valores de 16.450 mg/L e 9.010 mg/L respectivamente, valores superiores àqueles permitidos pela legislação ambiental. Os compostos fenólicos são encontrados em uma concentração de 954,2 mg/L. Estes compostos são considerados tóxicos porque atuam inibindo as atividades de microrganismos, vegetais e animais. As águas residuárias também apresentam uma salinidade de 2,56% (CAMPOS; PRADO; PEREIRA, 2010).

Todos estes compostos presentes nas águas residuárias podem alterar e degradar os solos, cursos de água e poluir o ar, quando elas são dispostas sem tratamento prévio. Se forem lançadas em cursos de água provocam a diminuição do oxigênio dissolvido no meio, uma vez que é usado pelos microrganismos na decomposição aeróbia. A redução do oxigênio tem como consequências o desequilíbrio da fauna e flora aquáticas, eutrofização e geração de odores

desagradáveis, causando assim um grave impacto ambiental e degradando a qualidade das águas (FIA et al., 2007). As águas residuárias também podem produzir gases como o metano, dióxido de carbono, gás sulfídrico e amônia, como resultado da atividade bacteriana, poluindo o ar. Além de existir o risco de poluição das águas subterrâneas (ASOCIACIÓN NACIONAL DEL CAFÉ, 2005).

A ideia do aproveitamento dos resíduos do processamento do café surge da necessidade de minimizar seus efeitos negativos no ambiente, dando-lhes um destino alternativo com geração de produtos com valor agregado (NAVIA; VELASCO; HOYOS, 2011). Atualmente, a alta produtividade de café por hectare, as rigorosas legislações ambientais, o alto custo dos combustíveis e dos fertilizantes favorecem o uso desses resíduos para sua transformação em produtos de valor agregado (DIAS et al., 2014).

2.3 Bioetanol

No Brasil, o bioetanol obteve maior importância desde o ano de 1929, quando a grande crise internacional afetou a indústria açucareira. Sobrava açúcar e cana e faltavam divisas para aquisição de combustível líquido. A primeira destilaria de álcool anidro foi instalada em 1931 e o Governo Federal estabeleceu a obrigatoriedade da mistura de 5% de etanol à gasolina, para economizar na importação de combustível e amparar a lavoura canavieira. Em 1974 com a crise internacional do petróleo, o Brasil iniciou uma nova fase de produção de etanol com um grande investimento na tecnologia de produção. (LIMA; BASSO; AMORIN, 2001). Hoje, o Brasil é o país com a tecnologia mais avançada no processo fermentativo alcoólico do mundo e tem mercado garantido, devido ao uso do álcool na frota brasileira seja puro ou misturado com

gasolina, substituindo a gasolina em cerca de 40% do total (FERREIRA-LEITÃO et al., 2010).

O bioetanol é obtido a partir da fermentação dos açúcares que se encontram nos vegetais, tais como cereais, cana-de-açúcar, beterraba ou na biomassa vegetal (resíduos). Estes açúcares estão combinados na forma de sacarose, amido, hemicelulose e celulose (KRYLOVA; KOZYUKOV; LAPIDUS, 2008).

A utilização do bioetanol tem-se generalizado para substituir o consumo de derivados do petróleo e por ser um combustível renovável e limpo. Este álcool tem um conteúdo de oxigênio em torno de 35% em massa, pelo que sua combustão é limpa, contribuindo na redução das emissões poluidoras de efeito estufa (KRYLOVA; KOZYUKOV; LAPIDUS, 2008). Substituindo a utilização de combustíveis fósseis pelo bioetanol reduzem-se as emissões de carbono em 80%, enquanto elimina-se o efeito da chuva ácida causado pelo dióxido de enxofre (MUSSATTO et al., 2010).

A demanda de bioetanol está aumentando rapidamente nos países industrializados, interessados em desenvolver um mercado interno de biocombustíveis, com seus planos e regulações de utilização. Esse interesse se deve a fatores como: 1) o aumento dos preços do petróleo e consciência de que as reservas mundiais do mesmo estão se esgotando, 2) preocupação a respeito das emissões poluentes dos combustíveis fósseis, 3) os requisitos do Protocolo de Quioto e o Plano de Ação de Bali sobre as emissões de carbono, e 4) a provisão de saídas alternativas para os produtores agrícolas (MUSSATTO et al., 2010).

A via fermentativa é a maneira mais importante de obtenção de etanol no Brasil, pelo grande número de matérias-primas naturais existentes em todo o país, durante todo o ano. No processo de obtenção, distinguem-se quatro fases: preparo do substrato, fermentação, purificação e desidratação. O preparo do

substrato consiste no tratamento da matéria-prima para extrair os açúcares fermentescíveis e difere dependendo da matéria-prima. A fermentação é um processo comum a todos os substratos açucarados e seu princípio é a transformação dos açúcares em etanol e CO₂. A purificação é feita geralmente em duas operações: a primeira separa o etanol do substrato fermentado por destilação, produzindo uma mistura hidroalcoólica impura contendo aldeídos, ésteres, álcoois superiores e ácidos orgânicos, e a segunda, separa o etanol dessas impurezas através da retificação. Finalmente é feita a desidratação para levar o etanol a concentrações superiores a 97,2% v/v (LIMA; BASSO; AMORIN, 2001).

2.3.1 Bioetanol de segunda geração

Graças aos avanços biotecnológicos, a maioria do etanol produzido no mundo provém de produtos agrícolas. Aproximadamente 40% do total do bioetanol são produzidos a partir de matérias-primas diretamente fermentescíveis como a cana-de-açúcar e beterraba, e 60% com matérias-primas amiláceas, como o milho, trigo e batata, cujo amido deve ser convertido em açúcares (sacarificado) antes da fermentação (MUSSATTO et al., 2010). A grande desvantagem de utilizar essas culturas como matérias-primas é que todas elas estão destinadas para a alimentação humana e animal, fato que gera polêmica pelo tema de segurança alimentar e do uso da terra, além de aumentar o custo de produção (NAVIA; VELASCO; HOYOS, 2011).

Nos últimos anos, as pesquisas estão sendo dirigidas à produção de etanol a partir de matérias-primas lignocelulósicas (biomassa), que são mais baratas e abundantes. O bioetanol produzido a partir destas fontes é chamado de segunda geração. A importância deste bioetanol decorre da possibilidade de utilizar matéria-prima de baixo custo, evitar a concorrência direta e indireta com a alimentação humana e animal, segurança de abastecimento de energia, reduzir

as importações de petróleo e mitigar a produção dos gases de efeito estufa (BALAT; BALAT, 2009).

A biomassa vegetal é gerada como resíduos nos processos produtivos de setores agrícola, florestal e industrial, como por exemplo, as gramíneas, madeiras, subprodutos de colheitas e processamento de frutas, da indústria de papel, resíduos sólidos municipais, etc. (CHEN, 2011). A utilização de resíduos impede sua acumulação e potencial contaminação de solos, rios e águas subterrâneas (FERREIRA-LEITÃO et al., 2010).

Com o avanço na pesquisa do etanol de segunda geração, também estão sendo estudados microrganismos que possam usar eficientemente essas matérias-primas como substratos. Especialmente leveduras que possam utilizar tanto hexoses quanto pentoses para a produção de etanol e que sejam resistentes às diversas condições da fermentação (PANDEY et al., 2000; BALAT; BALAT, 2009; MUSSATTO et al., 2011).

Na literatura existem poucos estudos que tenham utilizado polpa de café como substrato para fermentação na produção de etanol. No estudo de Kefale, Redi e Asfaw (2012), foi utilizada polpa de café hidrolisada em água destilada a temperatura de ebulição e fermentada com levedura comercial *S. cerevisiae* durante 24 h, obtendo assim uma concentração máxima de etanol de 7,4 g/L. Os autores concluíram que a polpa de café tem um grande potencial para produção de bioetanol na Etiópia. Outro estudo relatou que a fermentação do hidrolisado de polpa de café por *S. cerevisiae* alcançou um rendimento de etanol de 0,46 g/g e apresentou um rendimento teórico de 40% (SHENOY et al., 2011).

Em outro estudo realizado por Navia, Velasco e Hoyos (2011) foram utilizadas polpa e mucilagem do café, submetidas à hidrólise ácida e posterior fermentação com *S. cerevisiae* comercial, obtendo 25,44 g/L de etanol a partir de 64,40 g/L de açúcares totais, o que equivale a um rendimento teórico de

77,29%, mostrando que é viável a produção de etanol em pequenas cafeiras com matérias-primas de fácil acesso.

Também existem trabalhos que relataram o uso de outros resíduos da indústria do café, como o estudo de Mussatto et al. (2012), em que utilizaram a borra e pergaminho do café, avaliando o metabolismo de açúcares e a produção de etanol, por três diferentes leveduras cultivadas em substratos hidrolisados por hidrólise ácida. A fermentação com *S. cerevisiae* resultou na maior produção de etanol a partir do hidrolisado ácido da borra de café, sendo o teor de etanol de 11,7 g/L em um processo fermentativo com 50,2% de eficiência (MUSSATTO et al., 2012).

Gouvea et al. (2009) utilizaram a casca de café e *S. cerevisiae* para produzir etanol. As condições nas quais obtiveram os melhores resultados foram utilizando as cascas inteiras, 3 g de levedura por litro de substrato e uma temperatura de fermentação de 30 °C. Sob estas condições, a produção de etanol foi de 13,6 g/L.

2.4 Compostos voláteis aromáticos

Os compostos voláteis influenciam no aroma e sabor dos produtos. Esses compostos odoríferos (aromas) são moléculas de baixo peso molecular ($m < 400$ Dalton) cuja pressão de vapor é suficientemente alta para vaporizá-los parcialmente à temperatura ambiente, produzindo estímulos olfativos (SOCCOL et al., 2008).

A maioria dos aromas naturais é o resultado de misturas de compostos químicos, biologicamente ativos, que apresentam estruturas complexas de vários grupos funcionais. Os compostos químicos responsáveis pelos aromas característicos são álcoois, aldeídos, ácidos, ésteres, terpenos, dicarbonilos, ácidos graxos de cadeia curta e mediana, cetonas, lactonas, compostos fenólicos

e sulfurados, dentre outros. Estes compostos conferem atributos organolépticos agradáveis, como frutado, floral, picante, temperado, cremoso, etc., aos alimentos, bebidas, pastas de dente, fragrâncias, perfumes e outros artigos perfumados (UENOJO; PASTORE, 2006; BERGER, 2009).

Os compostos de aroma podem resultar do metabolismo secundário das plantas, mas existem inconvenientes para obtê-los por esse processo. Por exemplo: são geradas baixas concentrações, os aromas podem estar ligados a outros compostos, podem ser encontrados apenas em plantas exóticas e sua produção depende dos fatores ambientais e das doenças que as plantas possam adquirir, tornando custoso o processo de extração (UENOJO; PASTORE, 2006). Uma vez que sua estrutura é elucidada, os aromas têm sido produzidos por síntese química, um processo que afeta ao meio ambiente e que tem pouca seletividade pelo substrato, causando a formação de misturas racêmicas indesejáveis, reduzindo assim a eficiência do processo (LONGO; SANROMAN, 2006).

Uma rota alternativa para a produção de compostos de aroma é a biossíntese microbiana (fermentação) ou a bioconversão de precursores naturais com células microbianas ou enzimas (biocatálise). Os métodos biotecnológicos normalmente têm condições de processo menos prejudiciais para o ambiente e produzem o enantiômero desejável do composto aromatizante (VANDAMME, 2003).

Geralmente, os aromas de origem microbiana estão presentes apenas em pequenas concentrações nos caldos de fermentação, o que pode resultar em elevados custos de recuperação, mas isso é compensado pelo fato de que o valor dos aromas naturais no mercado é de 1-100 vezes maior que dos aromas sintéticos. Isto significa que para ser competitivo, o preço dos aromas produzidos com microrganismos deve estar entre 200 e 2.000 USD/kg (DUBAL et al., 2008).

Existe uma marcada diferença de preços entre as três formas de obtenção. Por exemplo, o butirato de etilo, importante composto aromatizante frutado, tem um custo de cerca de 180 USD/kg quando produzido biotecnologicamente, enquanto que, sua obtenção "natural" pela concentração de sumos de fruta chega a um preço de 5.000 USD/kg. Produzi-lo sinteticamente tem um custo de apenas 4 USD/kg (DUBAL et al., 2008).

Atualmente, a população opta pelos alimentos e aditivos naturais, os compostos de aroma produzidos por microrganismos entram nessa categoria, uma vez que, segundo o Regulamento Europeu sobre aromas e sabores (EEC nº 1334/2008), o aromatizante natural é definido como: “uma substância aromatizante obtida por processos físicos, enzimáticos ou microbiológicos a partir de material de origem vegetal, animal ou microbiológico no seu estado bruto ou após o processamento para o consumo humano por um ou mais dos processos tradicionais de preparação de alimentos” (BERGER, 2009).

Certos fungos, leveduras e bactérias podem sintetizar aromas como metabólitos secundários durante processos fermentativos a partir de nutrientes como açúcares, aminoácidos e álcoois (UENOJO; PASTORE, 2006).

Algumas leveduras como *P. anomala*, *K. marxianus*, *S. cerevisiae* e algumas não *Saccharomyces* mostraram um grande potencial na produção industrial de compostos de aroma, como o 2-feniletanol, um dos aromas mais importantes na indústria por possuir odor de rosas (LONGO; SANROMAN, 2006; VANDAMME, 2003). Este composto é produzido a partir da L-fenilalanina através da via de Ehrlich, em três reações: transaminação da L-fenilalanina produzindo fenilpiruvato, descarboxilação do fenilpiruvato formando fenilacetaldeído, e redução do fenilacetaldeído a 2-feniletanol. O preço no mercado do 2-feniletanol natural (a partir de óleos essenciais de flores e plantas) está em torno de US \$ 1,000/kg, e aquele sintetizado quimicamente custa em torno de US \$ 5/kg (KIM; CHO; HAHM, 2014).

O fator mais importante que limita a viabilidade econômica da produção de compostos de aroma por microrganismos através de fermentação, é a necessidade de caros componentes sintéticos para os meios de cultura. Assim, uma alternativa seria a utilização de resíduos agroindustriais como matéria-prima para esse processo, o que poderia trazer essa viabilidade econômica (BICAS et al., 2010).

Uma nova abordagem para dar valor agregado à casca/polpa de café é utilizá-la na produção de compostos de aroma por leveduras e fungos. Por exemplo, a levedura *Pachysolen tannophilus* tem sido utilizada em fermentação em estado sólido (SSF) com casca de café, resultando na produção de aromas de abacaxi e banana pela presença de acetato de isoamilo e álcool isoamílico, também foram produzidos acetaldeído, acetato de etilo, isobutanol, acetato de isobutilo e etil-3-hexanoato (PANDEY et al., 2000).

Kluyveromyces marxianus produz compostos de aroma frutado em SSF utilizando como substrato bagaço de mandioca e farelo de palma gigante (*Opuntia ficus indica*). A análise mostrou a produção de onze compostos incluindo álcoois, ésteres e aldeídos. Os principais componentes produzidos foram acetato de etilo, etanol e acetaldeído (MEDEIROS et al., 2001).

Na produção de compostos de aroma a partir de vários tipos de resíduos agroindustriais, tem-se utilizado principalmente fungos filamentosos, como *Aspergillus* sp., *Neurospora* sp., *Trichoderma viride*, *Rhizopus oryzae*, e *Ceratocystis frimbriata*, que produzem grande quantidade de aromas frutados ou florais (pêssego, abacaxi, banana, citros, rosa, etc.) dependendo da cepa e das condições de cultivo (MEDEIROS et al., 2001; SOARES et al., 2000).

2.5 Microrganismos fermentadores

A microbiota de processos fermentativos tradicionais e industriais constitui uma boa fonte de isolados microbianos com características de relevância industrial. Especificamente, podem ser encontradas estirpes de leveduras tolerantes ao estresse durante a fermentação alcoólica, nos quais a levedura é submetida a vários estresses como o osmótico e à concentração de etanol. Tais isolados podem ser bons candidatos para novos esforços de engenharia genética e metabólica (MUSSATTO et al., 2010).

Atualmente, o microrganismo mais utilizado na produção de etanol é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, por sua habilidade de crescer em meios contendo altas concentrações de açúcares e etanol. Esta levedura é rotineiramente utilizada em muitos processos biotecnológicos tradicionais, como panificação e produção de várias bebidas alcoólicas. *S. cerevisiae* tem a capacidade de hidrolisar sacarose em glicose e frutose, hexoses facilmente utilizadas por ela, além da manose e galactose, mas tem como limitação o fato de não fermentar as pentoses (CHEN, 2011). Com a finalidade de tornar viável a produção de etanol de segunda geração, os pesquisadores têm se interessado na procura de leveduras capazes de utilizar pentoses, que sejam termotolerantes, tolerantes ao etanol, resistentes a inibidores liberados durante o pré-tratamento do material lignocelulósico e capazes de utilizar um amplo espectro de substratos (MUSSATTO et al., 2012). As pesquisas têm demonstrado que várias espécies de leveduras são capazes de fermentar xilose em etanol, como *Pichia stipitis* (MUSSATTO et al., 2012), *Candida tropicalis* (JAMAI et al., 2007), e *Kluyveromyces marxianus* (CHEN, 2011).

P. stipitis é uma levedura isolada da madeira em decomposição e das larvas de insetos que habitam na madeira. O nicho ecológico desta levedura lhe fornece capacidade para utilizar a maior parte dos açúcares presentes na

madeira. Esta levedura fermenta xilose a etanol com elevado rendimento, configurando-se como a mais promissora para aplicação industrial (AGBOGBO; COWARD-KELLY, 2008).

Jamai et al. (2007) utilizaram *C. tropicalis* livre e imobilizada para produzir bioetanol a partir de amido, em que o pré-tratamento do amido com α -amilase foi suficiente para obter a fermentação completa com esta levedura.

K. marxianus é encontrada em alimentos fermentados. Apresenta uma alta taxa de crescimento, pode sobreviver a 52 °C e sua eficiência fermentativa é similar a *S. cerevisiae*. *K. marxianus* pode produzir etanol eficientemente a temperaturas de 38 - 45 °C, sendo uma característica interessante, uma vez que as fermentações em grande escala podem atingir altas temperaturas. Ela pode também metabolizar vários substratos contendo hexoses e pentoses (CHEN, 2011).

Existe uma grande variedade de leveduras que produzem compostos de aroma durante as fermentações, algumas delas são citadas a seguir. *C. tropicalis* e *Yarrowia lipolytica* degradam o ácido ricinoleico em ácidos de 16, 14 e 12 carbonos, acumulando δ -decalactona, que apresenta notas frutadas e oleosas importantes na formulação de aromas de pêssego, damasco ou morango (LONGO; SANROMAN, 2006). Rojas et al. (2001) estudaram várias leveduras não-*Saccharomyces* de vinho produtoras de ésteres de acetato. Dentre elas, *Hanseniaspora guilliermondii* e *Pichia anomala* foram consideradas como fortes produtoras de acetato de 2-feniletilo e de acetato de isoamilo, respectivamente. *S. cerevisiae* e leveduras selvagens apresentam capacidade de esterificação pronunciada e também possuem atividade de acoplamento carbono-carbono (BERGER, 2009).

P. anomala pode crescer sob condições ambientais estressantes como pH extremo, baixa atividade de água, e condições anaeróbias, produzindo etanol e glicerol. Esta levedura é um dos microrganismos necessários para a

fermentação de cacau e café, podendo degradar a pectina. Além de contribuir com ao aroma de bebidas fermentadas pela produção de compostos voláteis (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011).

Outra levedura muito encontrada em fermentações é *Pichia guilliermondii* que tem a capacidade de produzir terpenos ou transformar monoterpenoides acíclicos em linalol, carene e α -terpeniol. Ela tem potencial para produção industrial de riboflavina e xilitol (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011).

Torulaspota delbrueckii apresenta uma influência positiva sobre o sabor e aroma de bebidas alcoólicas, e ao mesmo tempo, exibe baixa produção de acetaldeído, acetoína, acetato, acetato de etilo e ácidos voláteis que podem conferir sabores indesejáveis. Em altas concentrações de etanol e ácido acético, *T. delbrueckii* preserva a viabilidade mais do que *S. cerevisiae*, embora não seja capaz de consumir frutose sob a mesma condição (AZZOLINI et al., 2012).

Hanseniaspora uvarum, também conhecida como *Kloeckera apiculata*, na sua forma anamórfica, tem formato apiculado, esferoidal a ovoide, ou alongado. As baixas temperaturas favorecem o seu crescimento. *H. uvarum* é uma espécie muito difundida e frequentemente isolada do solo, insetos, várias frutas, mostos fermentados, processos de produção industrial de alimentos, de processamento de café por fermentação, entre outros. Várias estirpes de *H. uvarum* de origem enológica apresentam enzimas com atividade β -D-glucosidase e β -D-xilosidase, ambas as glicosidases são importantes para a liberação de compostos aromáticos em vinificação (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011).

H. uvarum encontra-se predominantemente no começo das fermentações naturais dos sucos de frutas, contribuindo com um aroma mais complexo na bebida fermentada final, pela alta produção de compostos aromáticos, pequenas quantidades de ácidos e glicerol. Esta levedura pode produzir até 6% v/v de

etanol a partir de glicose e frutose; no entanto, ela pode tolerar o etanol até concentrações de 4 a 7% v/v. Concentrações acima dessa percentagem junto com a redução do potencial redox geram um ambiente que inibe o seu crescimento (ESCALANTE et al., 2011; HUTKINS, 2006).

H. uvarum é uma levedura anaeróbia facultativa. Tolerar altas concentrações de açúcares fermentescíveis encontrados nos mostos de frutas, uma vez que ela não apresenta o efeito *Crabtree* (metabolismo fermentativo na presença de altas concentrações de glicose, embora com quantidade suficiente de oxigênio no meio), ou seja, o aumento na concentração de glicose não afeta a sua respiração; no entanto podem ser produzidas pequenas quantidades de etanol, glicerol e acetato. Devido a esta característica metabólica, *H. uvarum* é considerada uma levedura oxidativa, que após o esgotamento de oxigênio no meio terá um metabolismo fermentativo (ESCALANTE et al., 2011).

2.6 Head-space Microextração em fase sólida (HS-SPME)

A análise cromatográfica de compostos orgânicos, que estão presentes em diferentes produtos, sempre exige um pré-tratamento da amostra, devido à existência de macromoléculas (proteínas ou açúcares) que são incompatíveis com as colunas cromatográficas ou com a concentração de substâncias traço. A escolha de uma técnica de extração adequada ainda é um desafio, porque os compostos voláteis são muito instáveis e sujeitos a mudanças e perdas durante a extração. Em alguns casos, torna-se necessário combinar técnicas de extração para obter um extrato representativo dos voláteis de uma amostra (PIETROWSKI et al., 2012).

HS-SPME é uma técnica de preparação da amostra que não usa solvente, em que uma fibra de sílica revestida com um polímero seletivo é introduzida no espaço livre em cima da amostra. Os analitos orgânicos volatilizados são

extraídos (adsorvidos) e concentrados no revestimento e, em seguida, são transferidos ao instrumento analítico para sua dessorção e análise. É uma técnica muito utilizada devido a sua simplicidade, velocidade, possibilidade de automação e facilidade de uso. No entanto, as concentrações detectadas dos compostos de interesse são geralmente baixas e fortemente dependentes da matriz, devido ao elevado nível de etanol e de outros voláteis majoritários nos meios fermentados, e ao fato de que os compostos alvo passam por uma fase de adsorção e depois outra de dessorção. Para garantir a precisão, devem ser usados padrões internos adequados (ZAPATA et al., 2012).

A fibra mais comumente utilizada em fermentações tem recobrimento de DVB/CAR/PDMS (divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane). Os componentes reativos são o Carbowax (adsorvente moderadamente polar) e o divinilbenzeno (suspendido no Carbowax, que tem uma elevada afinidade para pequenas aminas). Carbowax/divinilbenzeno é adequado para SPME de álcoois e compostos polares e, portanto, é adequado para os compostos voláteis produzidos geralmente nas fermentações alcoólicas (PIETROWSKI et al., 2012).

Em relação à temperatura de extração, as temperaturas mais baixas (em torno de 15 °C) favorecem a retenção dos compostos mais voláteis pelo revestimento SPME. Em contraste, as temperaturas mais elevadas (em torno de 60 °C) permitem aumentar a concentração de compostos semivoláteis no espaço superior da amostra. Por isso, geralmente é adotada uma temperatura intermédia (em torno de 40 °C) com a consequente redução na quantidade extraída de elementos voláteis e semivoláteis (BIANCHIN et al., 2014).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, a polpa de café juntamente com as águas residuárias da desmucilagem do grão demonstraram ser um substrato adequado para o processo fermentativo de produção de compostos de valor agregado como o bioetanol e os compostos voláteis aromáticos. A levedura *H. uvarum* UFLA CAF76 apresentou o melhor desempenho fermentativo, cujo aprimoramento foi conseguido com 12% p/v de polpa de café, 1 g/L de extrato de levedura e 0,3 g/L (peso seco) de inóculo. Sob essas condições, foram obtidos altos valores de rendimento de etanol (0,48 g/g), produtividade de etanol (0,55 g/L h) e eficiência de conversão (94,81%). Além disso, o perfil dos compostos voláteis, produzidos por *H. uvarum* UFLA CAF76, foi caracterizado pela produção de 2-fenil-etanol, acetato de feniletilo, linalol e b-citronelol, compostos muito utilizados na indústria de alimentos, cosméticos, perfumaria, farmacêutica, etc.

H. uvarum UFLA CAF76 é uma levedura promissora para diversos bioprocessos utilizando resíduos da indústria do café, portanto, futuras pesquisas são necessárias para elucidar e maximizar seu potencial fermentativo.

Este estudo mostrou uma alternativa viável para a obtenção de bioetanol e compostos voláteis aromáticos nas cafezeiras utilizando matérias-primas baratas e de fácil acesso, por serem resíduos que não têm usos definidos e podem ser separados e recolhidos facilmente para seu aproveitamento. Recomenda-se um processo de avaliação em uma plantação de café realizando um estudo econômico e financeiro. Os próximos passos do presente estudo seriam realizar a destilação do mosto fermentado para recuperação do etanol, posteriormente executar os processos de retificação e desidratação para obter a pureza desejada para a utilização do etanol como combustível e a recuperação e a purificação dos compostos voláteis aromáticos de interesse.

REFERÊNCIAS

AGBOGBO, F. K.; COWARD-KELLY, G. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 30, n. 9, p. 1515-1524, Apr. 2008.

ASOCIACIÓN NACIONAL DEL CAFÉ. **Manual de beneficiado húmedo del café**. Guatemala: ANACAFÉ, 2005.

AZZOLINI, M. et al. Effects of *Torulasporea delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed cultures on fermentation and aroma of Amarone wine. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 235, n. 2, p. 303-31, May 2012.

BALAT, M.; BALAT, H. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. **Applied Energy**, Oklahoma, n. 86, n. 11, p. 2273-82, Nov. 2009.

BERGER, R. et al. Biotechnology of flavours: the next generation. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 31, n. 11, p. 1651-1659, Nov. 2009.

BIANCHIN, J. N. et al. Screening of volatile compounds in honey using a new sampling strategy combining multiple extraction temperatures in a single assay by HS-SPME-GC-MS. **Food Chemistry**, London, v. 145, p. 1061-1065, Feb. 2014.

BICAS, J. L. et al. Biotechnological production of bioflavors and functional sugars. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 07-18, mar. 2010.

BRUNO, M.; OLIVEIRA, R. A. Tratamento anaeróbico de águas residuárias do beneficiamento de café por via úmida em reatores UASB em dois estágios. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 364-377, June 2008.

CAMPOS, C. M. M.; PRADO, A. C.; PEREIRA, E. L. Caracterização físico-química, bioquímica e energética da água residuária do café processado por via úmida. **Biociencia Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 4, p. 514-524, ago. 2010.

CHEN, Y. Development and application of co-culture for ethanol production by co-fermentation of glucose and xylose: a systematic review. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 38, n. 5, p. 581-597, May 2011.

DIAS, D. R. et al. Management and utilization of wastes from coffee processing. In: SCHWAN, R. F.; FLEET, G. H. (Org.). **Cocoa and coffee fermentations**. Boca Raton: CRC Taylor & Francis, 2014. Cap. 15, p. 376-382.

DUBAL, S. et al. Biotechnological routes in flavour industries. **Advanced Biotechnology**, Chennai, v. 6, n. 9, p. 20-31, Mar. 2008.

ESCALANTE, W. E. et al. Actividad fermentativa de *Hanseniaspora uvarum* y su importancia en la producción de bebidas fermentadas. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**, Caracas, v. 31, n. 1, p. 57-63, June 2011.

ESQUIVEL, P.; JIMÉNEZ, V. Functional properties of coffee and coffee by-products. **Food Research International**, Barking, v. 46, n. 2, p. 488-495, May 2012.

FERREIRA-LEITAO, V. et al. Biomass residues in Brazil: availability and potential uses. **Waste and Biomass Valorization**, New York, v. 1, n. 1, p. 65-76. Feb. 2010.

FIA, R. et al. Coeficientes de degradação da matéria orgânica de água residuária da lavagem e descascamento dos frutos do cafeiteiro em condições anóxica e aeróbia. **Revista Engenharia na Agricultura**, Viçosa, v. 15, n. 1, p. 45-54, mar. 2007.

GOUVEA, B. M. et al. Feasibility of ethanol production from coffee husks. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 31, n. 9, p. 1315-1319, Sept. 2009.

HUTKINS, R. **Microbiology and technology of fermented foods**. Ames: Blackwell Publishing, 2006.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. Available at: <<http://www.ico.org/>>. Accessed: 16 Jan. 2014.

JAMAI et al. Production of ethanol from starch by free immobilized *Candida tropicalis* in the presence of α -amilase. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, n. 14, p. 2765-2770, Oct. 2007.

KEFALE, A.; REDIB, M.; ASFAW, A. Bioethanol production and optimization test from agricultural waste: the case of wet coffee processing waste (pulp). **International Journal of Renewable Energy Research**, Ankara, v. 2, n. 3, p. 446-450, July 2012.

KIM, B.; CHO, B. R.; HAHN, J. S. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of 2-phenylethanol via Ehrlich pathway. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 111, n.1, p. 115-124, Jan. 2014.

KRYLOVA, A. Y.; KOZYUKOV, E. A.; LAPIDUS, A. L. Ethanol and diesel fuel from plant raw materials: a review. **Solid Fuel Chemistry**, Moscow, v. 42, n. 6, p. 358-64, May 2008.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. (Ed.). **The yeasts: a taxonomy study: volume 2**. 5th ed. Amsterdam: Elsevier, 2011.

LIMA, A. O. S.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de etanol. In: LIMA, U. A. et al. (Ed.). **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos: volume 3**. São Paulo: Blucher, 2001. p. 1-43.

LONGO, M.; SANROMÁN, M. Production of food aroma compounds: microbial and enzymatic methodologies. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 44, n. 3, p. 335-353, 2006.

MEDEIROS, A. B. et al. Aroma compounds produced by *Kluyveromyces marxianus* in solid state fermentation on a packed bed column bioreactor. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 17, n. 8, p. 767-771, Sept. 2001.

MURTHY, P. S.; NAIDU, M. M. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition: a review. **Resources, Conservation and Recycling**, Amsterdam, v. 66, p. 45-58, Sept. 2012.

MUSSATTO, S. I. et al. Sugars metabolism and ethanol production by different yeast strains from coffee industry wastes hydrolysates. **Applied Energy**, Oklahoma, v. 92, p. 763-768, Apr. 2012.

MUSSATTO, S. I. et al. Production, composition, and application of coffee and its industrial residues. **Food Bioprocess Technology**, New York, v. 4, n. 5, p. 661-672, July 2011.

MUSSATTO, S. I. et al. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology Advances**, New York, v. 28, n. 6, p. 817-830, Dec. 2010.

NABAIS, J. N. et al. Influence of preparation conditions in the textural and chemical properties of activated carbons from a novel biomass precursor: the coffee endocarp. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, n. 15, p. 7224–7231, Oct. 2008.

NAVIA, D. P.; VELASCO, R. J.; HOYOS, J. L. Production and evaluation of ethanol from coffee processing by-products. **Vitae**, Medellín, v. 18, n. 3, p. 287-294, Sept. 2011.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 153-162, Oct. 2000.

PIETROWSKI, A. G. M. et al. Influence of fermentation with *Hanseniaspora* sp. yeast on the volatile profile of fermented apple. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 60, n. 39, p. 9815-9821, Sept. 2012.

RAMIREZ-MARTINEZ, J. R. Phenolic compounds in coffee pulp: quantitative determination by HPLC. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 43, n. 2, p. 135–144, Sept. 1988.

ROJAS, V. et al. Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 70, n. 3, p. 283–289, Nov. 2001.

SHENOY, D. et al. A study on bioethanol production from cashew apple pulp and coffee pulp waste. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 35, n. 10, p. 4107-4111, Oct. 2011.

SOARES, M. et al. Fruity flavour production by *Ceratocystis fimbriata* grown on coffee husk in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, Ankara, v. 35, n. 8, p. 857–861, Mar. 2000.

SOCCOL, C. et al. Production of aroma compounds. In: PANDEY, A.; SOCCOL, C.; LARROCHE, C. (Ed.). **Current developments in solid-state fermentation**. New York: Springer Science, 2008. p. 356-376.

UENOJO M.; PASTORE, G. Isolamento e seleção de microrganismos pectinolíticos a partir de resíduos provenientes de agroindústrias para produção de aromas frutais. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 509-515, set. 2006.

ULLOA, J. et al. Biological treatments affect the chemical composition of coffee pulp. **Bioresource Technology**, Essex, v. 89, n. 3, p. 267–274, Sept. 2003.

VANDAMME, E. Bioflavours and fragrances via fungi and their enzymes. **Fungal Diversity**, New York, v. 77, n. 12, p. 153-166, Dec. 2003.

ZAMBRANO, D. et al. Tratamiento de aguas residuales del lavado del café. **Boletín Técnico Cenicafé**, Colombia, n. 20, p. 1-26, June 1999.

ZAPATA, J. et al. Automated and quantitative headspace in-tube extraction for the accurate determination of highly volatile compounds from wines and beers. **Journal of Chromatography A**, Oxford, v. 1230, p. 1-7, Mar. 2012.

SEGUNDA PARTE - ARTIGO

**ARTIGO 1 Utilization of coffee residues obtained from semi-dry process
for production of value-added compounds**

**Preparado de acordo com as normas da revista Bioresource Technology
(Versão submetida)**

Abstract

The semi-dry processing of coffee generates significant amounts of coffee pulp and coffee wastewater. This study evaluated the production of bioethanol and volatile compounds by eight different yeast strains when cultivated in a mixture of these residues. *Hanseniaspora uvarum* UFLA CAF76 provided the best fermentation performance; hence it was selected to evaluate different culture medium compositions and inoculum size. The best results were obtained with 12% w/v of coffee pulp, 1 g/L of yeast extract and 0.3 g/L of inoculum. Using these conditions, a fermentation in 1 L of medium was carried out, achieving higher ethanol yield, productivity and efficiency with values of 0.48 g/g, 0.55 g/L h and 94.85% respectively. Twenty-one volatile compounds corresponding to higher alcohols, acetates, terpenes, aldehydes and volatile acids were identified. Such results indicate that coffee residues have excellent potential as substrates for value-added compounds production. *H. uvarum* demonstrated high fermentative capacity using these residues.

Keywords: coffee pulp, coffee wastewater, bioethanol, volatile compounds, *Hanseniaspora uvarum*.

1. Introduction

Coffee is the most frequently consumed functional beverage worldwide and the second largest traded commodity after petroleum (Mussatto et al., 2011). According to the International Coffee Organization (ICO, 2014), global coffee production during 2013 is estimated to be over 145 million of bags of 60 kg. Therefore, large amount of residues are generated during the coffee processing. Among these residues, coffee pulp is the first residue obtained during wet and semi-dry processing of coffee and represents 29% dry-weight of the whole berry (Murthy and Madhava Naidu, 2012). In the semi-dry processing, fruit pulp

covering the seeds are removed by pulper, then the mucilage coating the grains is washed for their subsequent solar drying (Navia et al., 2011; Esquivel e Jiménez, 2012). Coffee pulp is essentially rich in sugars, proteins, minerals and it also contains appreciable amounts of tannins, polyphenols and caffeine, considered toxic in nature (Pandey, 2000). The water used for depulping and demucilage of cherries is known as coffee wastewater and has high concentration of organic pollutants (Haddis and Devis, 2008). Residues of the coffee industry represent a serious environmental problem for coffee producing countries, due to unsafe disposal of them causing water and land pollution (Murthy and Madhava Naidu, 2012). There are few studies addressing to their use in profitable applications. Since coffee pulp and coffee wastewater contain considerable amounts of fermentable sugars and other nutrients (Mussatto et al., 2011), these constitute interesting substrates for microorganisms' growth, and consequently, for producing value-added products such as bioethanol and aroma compounds.

The emission of greenhouse gases as a result of consumption of fossil fuels and the nonrenewable nature of them, encourage the search for new sources of clean energy, which can be produces in a sustainable manner. Burning ethanol instead of gasoline reduces carbon emissions by more than 80% while eliminating the release of acid-rain-causing sulfur dioxide (Mussatto et al., 2011). Furthermore, there is a growing interest worldwide to find out new and cheap carbohydrate sources for production of second generation bioethanol. The agricultural residues are attractive materials since they are abundant, inexpensive feedstock, avoid direct and indirect competition with human food and animal feed and provide an energy supply security (Balat and Balat, 2009). It is considered that agroindustrial residues will become the main feedstock for ethanol production in the near future. Recent studies indicate the excellent

potential of coffee residues for bioethanol production (Kwon et al., 2013; Choi et al., 2012; Mussatto et al., 2012; Shenoy et al., 2011).

On another hand, a novel approach on value addition of agroindustrial residues is the production of aroma volatile compounds for industry application using yeast and fungi (Murthy and Madhava Naidu, 2012; Medeiros et al., 2001; Pandey et al., 2000). The chemical synthesis and direct extraction from plants of aroma compounds present economic and environmental disadvantages. Moreover, nowadays there has been a remarkable preference of consumers for natural food additives (Medeiros et al., 2001). Hence, biotechnological production of these compounds is a suitable alternative, since it occurs at mild reaction conditions, presents high enantioselectivity, does not generate toxic wastes and the products obtained may be labeled as "natural" (Bicas et al., 2010). The utilization of agroindustrial wastes as feedstock could bring economic feasibility for the commercial process, reducing costs in the culture medium (Bicas et al., 2010).

Many yeasts have the capacity to produce specific single flavor molecules by either *de novo* synthesis or converting an added substrate/precursor molecule (Vandamme, 2003). During alcohol fermentations, yeasts can produce alcohols (2-phenylethanol), terpenes (citronellol, linalol, geraniol), esters (2-phenylethyl acetate) and others with fruity, floral and green odors. Specifically, apiculate yeasts can impact on the sensory quality of wine owing to the higher production of aroma compounds (De Benedictis et al., 2011; Moreira et al., 2011).

Application of coffee residues in such bioprocesses would reduce waste treatment costs, reduce environmental pollution, provide alternative substrates and produce compounds economically important. The aim of this study was first to evaluate the production of ethanol and volatile compounds by eight yeast strain utilizing coffee residues (coffee pulp and coffee wastewater) as substrate

for fermentation, and then to investigate the effects of culture medium composition and the inoculum size on fermentation performance of pre-selected yeast, besides to determine the volatile compounds produced under these optimum conditions.

2. Materials and methods

2.1. Raw material

Coffee pulp and coffee wastewater from the depulping and demucilage process of coffee beans (*Coffea arabica* L., variety Catuaí 99 vermelho) were supplied by a coffee-producing unit located in the Southern area of the state of Minas Gerais (Brazil), during the 2012 harvest. As soon as obtained, the materials were frozen at -20°C. The coffee pulp was dried at 60°C for 48 h until constant weight, later coffee pulp was ground and stored in hermetical glass flasks.

2.2. Physicochemical analysis

The physicochemical characteristics of coffee pulp and wastewater were determined according to standard procedures. The parameters analyzed were: water content, ash, lipids and protein (AOAC, 1970), reducing sugars, non-reducing sugars and total sugar (Nelson, 1944), crude fibre (Van der Kamer and Van Ginkel, 1952), cellulose, hemicellulose, and lignin (Van Soest and Wine, 1968), soluble pectin, total pectin and solubility (Bitter and Muir, 1962), total phenolic compounds by Folin–Ciocalteu method, pH, chemical oxygen demand (COD) and biochemical oxygen demand (BOD) (APHA, 1992).

2.3. Yeasts strains

Eight strains isolated from coffee fermentation, cocoa fermentation, sugar cane spirit (cachaça) fermentation and soil were evaluated in the present

study. They were preselected according to their capacity to produce ethanol and aroma compounds in published studies. The isolates involved were: *Saccharomyces cerevisiae* UFLA CA11 (Kwon et al., 2013; Mussatto et al., 2012; Shenoy et al., 2011), *Pichia anomala* UFLA CAF70 (Longo and Sanromán, 2006), *Kluyveromyces marxianus* UFLA CH1-1 (Medeiros et al., 2001; Goshima et al., 2013), *Candida tropicalis* UFLA CES-Y573 (Oberoi et al., 2010), *Pichia guilliermondi* UFLA CAF725 (Ponzoni et al., 2008), *Haseniaspora uvarum* UFLA CAF76 (Moreira et al., 2008, 2011), *Torulasporea delbruekii* UFLA CAF58 (Azzolini et al., 2012) and *Pichia stipitis* NCYC 1541 (National Collection of Yeast Cultures, Norwich, UK) (Mussatto et al., 2012). All strains, except *P. stipitis*, were from the microbial collection of the Microbial Physiology Laboratory/Department of Biology from the Federal University of Lavras (UFLA) in Brazil.

2.4. Inoculum preparation

Yeast strains maintained at -80°C were re-activated and multiplied using YEPG medium (10 g/L yeast extract, 20 g/L peptone and 20 g/L glucose) as described below. Using a platinum loop, yeast strains were inoculated into tubes containing 1 mL YEPG and were incubated at 28°C. After 24 h, the content of these tubes were transferred to new tubes containing 9 mL YEPG and incubated for 24 h at 28°C. The resulting yeast cultures (10 mL) were transferred to Erlenmeyer flasks containing 90 mL YPD, which were subsequently incubated for 24 h at 28°C; for all steps the agitation was 135 rpm. Yeast cells were later recovered from the medium by centrifugation (5000 rpm, 10 min, 20 °C) and washed twice with sterile peptone water (Duarte et al., 2012). Finally, the biomass obtained was inoculated in the fermentation medium containing coffee residues.

2.5. Screening of the yeast strains

Eight yeasts strains were screened, in pure culture, based on their fermentation performance (sugar consumption, ethanol production and fermentation kinetics). Fermentation experiments were performed using 250 ml Erlenmeyer flasks containing a mixture of 10 g of coffee pulp and 100 mL of coffee wastewater, this medium was sterilized at 121°C for 15 min. The flasks were inoculated with an initial concentration of 0.3 g/L of cells (dry weight) of each strain. The incubation was performed in a rotary shaker at 27°C and 105 rpm. The fermentation time was determined based on the maximum sugar consumption, analyzed by HPLC. During the experiments, samples were taken for sugars (sucrose, glucose and fructose), alcohols (ethanol and glycerol) and volatile compounds determinations. All the assays were performed in duplicate. After this preliminary test, the strain with higher ethanol yield, lower residual sugar level and higher kinetic parameters was used in a new fermentation assay.

2.6. Evaluation of the effect of the culture medium composition and the inoculum size on fermentation performance

At the second stage, three variables were tested aiming the improvement of the fermentation performance with the selected yeast strain from the previous stage (item 2.5). It was carried out a 2x3x2 factorial experiment. The variables tested were: coffee pulp concentration (6 and 12 % w/v), yeast extract concentration (0, 1 and 2 g/L) and inoculum size (0.3 and 1 g/L dry weight), which combinations resulted in 12 assays.

The pre-selected yeast strain was inoculated in the culture medium containing 100 mL of coffee wastewater and different concentrations of coffee pulp and yeast extract as described above. The fermentation conditions were the same as previously described (item 2.5). Samples were taken for determination of sugars and alcohols. All the assays were performed in duplicate. The assay

with significant and positive effect on the fermentation performance was chosen to conduct the fermentation in 1 L of medium containing the coffee residues (described below).

2.7. Fermentation with optimized conditions

The assay obtained in the last stage was reproduced on 1 L of culture medium and incubated at the same fermentation conditions. This experiment was carried out in triplicate. At initial and final time of fermentation, samples were taken for determination of sugars, ethanol and volatile compounds. The content of total phenolic compounds was determined (Folin–Ciocalteu method), in the residual solid, after of fermentation, for its comparison with the concentration of phenolic compounds in the coffee pulp.

2.8. Evaluation of fermentation performance

To evaluate fermentation performance some parameters were calculated. The ethanol yield factor ($Y_{p/s}$, g/g) was determined as the ratio between the maximum ethanol concentration (g/L) and total sugars consumed (g/L). Ethanol volumetric productivity (Q_p , g/l h) was defined as the ratio between the maximum ethanol concentration (g/l) and the respective fermentation time (h). The conversion efficiency of sugars to ethanol (E_f , %) was calculated as the ratio between the obtained $Y_{p/s}$ (g/g) and the theoretical value (0.51 g/g) of this parameter (Mussatto et al., 2012). The percentage of sugars consumed ($Conv$, %) was defined as a ratio between the total sugars consumed (g/L) and the initial sugar concentration (g/L).

2.9. HPLC analysis

The concentration of carbohydrates (sucrose, glucose and fructose), ethanol and glycerol was determined by High-Performance Liquid

Chromatography (HPLC). Analyses were carried out using a Shimadzu chromatograph (Shimadzu Corp., Japan) that was equipped with a refractive index detector (RID-10A). For carbohydrates quantification was used a Shimadzu ion exclusion column (Shim-pack SCR-101C, 7.9 mm x 30 cm) that was operated at a temperature of 80°C using ultrapure water as the eluent at a flow rate of 0.6 mL/min. Ethanol and glycerol was determined using a Shimadzu ion exclusion column (Shim-pack SCR-101H, 7.9 mm x 30 cm) that was operated at 30°C using 100 mM perchloric acid as the eluent at a flow rate of 0.6 mL/min. The compounds were identified by comparison of their retention times with the retention times of certified standards. The quantification of compounds was performed using calibration curves constructed with different concentrations of standard compounds, injected at the same conditions of samples (Duarte et al., 2012; Duarte et al., 2011). All samples were examined in duplicate.

2.10. Extraction of volatile compounds and GC-FID analysis

The extraction of volatile compounds was performed by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME). A sample of 5 mL of fermented medium was added in a 15 mL vial with 4-nonanol (internal standard) at a final concentration of 249.5 µg/L. Extraction was performed by constant magnetic stirring of sample during 10 min of equilibration at 60 °C. After this period, a 50/30 µm DVB/CAR/PDMS fiber (Supelco, Bellefonte, PA, USA) was exposed into the sample headspace for 15 min with a constant stirring and the same temperature. The time of volatiles desorption from the SPME fiber was fixed at 5 min.

The volatile compounds were analyzed using a gas chromatograph (GC) Shimadzu model 17A, equipped with an flame ionization detector (FID) and using a capillary column of silica DB Wax (30 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 µm) (J&W Scientific, Folsom, Calif., U.S.A.). The oven temperature was maintained

at 50°C for 5 min, raised to 190°C by increments of 3°C/min, and then maintained at 190°C for 10 min. Injector and detector temperatures were kept at 230 and 240°C, respectively. The carrier gas (N₂) was maintained at a flow rate of 1.2 mL/min. Injection was made in the split mode (1:10). The volatile compounds were identified by comparing their retention times with those of standard compounds injected under the same conditions. Quantification of the volatile compounds was expressed as 4-nonanol (internal standard) equivalents. The relative concentrations of the investigated compounds were calculated by relating the area of the internal standard to the area of the compound of interest (Duarte et al., 2011). Analyses were performed in duplicate.

2.11. Statistical analysis

The software SISVAR 5.1 (Lavras, MG, Brazil) was used for the Scott-Knott test. Principal Component Analyses were performed with XLstat 7.5.2 software (Addinsoft's, New York, NY, USA).

3. Results and discussion

3.1. Physicochemical analysis

Table 1 shows the composition of coffee pulp and coffee wastewater. The majority of values found for coffee pulp were similar to those reported by other authors (Esquivel e Jiménez, 2012; Navia et al., 2011; Ulloa et al., 2003; Elias, 1979), with exception of proteins, which presented a relative higher content (14.79%) if compared with others studies that found values from 7% to 12% of protein (Navia et al., 2011; Ulloa et al., 2003). The coffee pulp presented significant sugars content (9.7%), which is expected given the origin of such residue, i.e., fruit pulp. On the other hand, coffee wastewater presented lower components values than coffee pulp but it had similar physicochemical characteristics since the wastewater catches components from pulp and mucilage

during depulping and demucilage process. The protein content in the wastewater was also measured in a significant concentration (4.26%). According to environmental regulations COPAM (2008), the values of COD and BOD are higher than those permitted for effluent discharge in fluvial receptors (Table 1).

The chemical composition of coffee residues can differ widely according to the altitude, crop variety, cultivation conditions, processing mode and stage of development when the coffee cherries were harvested (Elias, 1979). The presence of significant amounts of fermenting sugars, protein, lipids and mineral components (ash) indicated that these residues seem quite promising for biotechnological process.

Table 1

Physicochemical characteristics of coffee residues added to the culture medium

Parameter	Coffee pulp (dry matter)	Coffee wastewater
Water content (%)	82.44	97.56
Total sugars (%)	9.7	1.21
Reducing sugars (%)	9.63	1.13
Non-reducing sugars (%)	0.07	0.08
Protein (%)	14.79	4.26
Lipids (%)	1.2	nd
Ash (%)	7.33	0.16
Crude fiber (%)	14.1	nd
Cellulose (%)	20.7	-
Hemicellulose (%)	3.6	-
Lignin (%)	14.3	-
Solubility (%)	6.19	-
Total pectin (g 100 g ⁻¹)	11.37	-
Soluble pectin (g 100 g ⁻¹)	0.7	-
Total phenolic (g 100 g ⁻¹)	2.62	0.022
Chemical oxygen demand (mg L ⁻¹)	-	10,259
Biochemical oxygen demand (mg L ⁻¹)	-	6,500
pH	-	5.25

nd not detected

Maximum permitted values according to COPAM: DQO = 180 mg/L, DBO = 60 mg/L (COPAM, 2008).

3.2. Screening of eight yeast strains

All yeasts strains were able to grow and ferment the culture medium containing coffee pulp and coffee wastewater. The sugars (sucrose, glucose and fructose) content was almost totally consumed after 24 h of fermentation, except fermentations with *P. guilliermondi* UFLA CAF725 and *P. stipitis* NCYC 1541 that required a longer fermentation time (48 h) (Table 2). The total initial sugar concentration was 35.23 g/L. As consequence of sugar consumption, the yeasts produced levels of ethanol ranging from 10.79 g/L (*P. anomala* UFLA CAF70) to 14.67 g/L (*H. uvarum* UFLA CAF76), with significant differences (Table 2). The ethanol content was higher (letter *a* in the Scott-Knott test) for the strains *S. cerevisiae* UFLA CA11, *T. delbruekii* UFLA CAF58, *C. tropicalis* CES-Y573, UFLA CAF76 and *P. stipitis* NCYC 1541, with concentrations ranging from 13.47 to 14.67 g/L. These strains also showed higher ethanol yield factors $Y_{p/s}$, higher conversion efficiencies (E_p) and higher ethanol productivities (Q_p) (Table 2). The last parameter was lower only for *P. stipitis* NCYC 1541. The strains *P. anomala* UFLA CAF70, *K. marxianus* UFLA CH1-1, *P. guilliermondi* UFLA CAF725 and *P. stipitis* NCYC 1541 were the most efficient in sugar consumed with values of *Conv* from 99.19 to 99.39% (Table 2). This result means that probably the last strains used more of their carbon source for either biomass production or other metabolites than for ethanol production (Sobocan and Glavic, 2000).

H. uvarum UFLA CAF76, an apiculate yeast, produced the highest ethanol concentration of 14.67 g/L (1.86% v/v). Previous studies reported that *H. uvarum* produced until 6% v/v of ethanol in fermented beverages (Estela Escalante et al., 2011), and it can tolerate ethanol until concentrations of 4-7% (Moreira et al. 2011; Fleet, 2003). *H. uvarum* UFLA CAF76 had the highest value for the ethanol yield factor $Y_{p/s}$ of 0.42 g/g, thus it converted sugar to ethanol more efficiently, based on the theoretical maximum value of 0.51 g/g.

Furthermore, this strain was the most efficient producer of ethanol per unit time with a Q_p of 0.61 g/L h. Although *H. uvarum* UFLA CAF76 had a slightly lower percentage of sugars consumed (*Conv*) of 98.86% (letter *b* in the Scott-Knott test), the E_f value was the highest with 82.57 % (Table 2), indicating that this yeast was able to convert more of the consumed sugar into ethanol than the other ones. These results showed that *H. uvarum* UFLA CAF76 had a good performance in the fermentation process; hence it was selected for the subsequent step of this work.

Since the most studies for ethanol production from agroindustrial residues used *S. cerevisiae*, the results found here are quite interesting, regarding that the fermentation performance was better with *H. uvarum* UFLA CAF76 than with *S. cerevisiae* UFLA CA11. These findings were probably due to *H. uvarum* UFLA CAF76 has been isolated from coffee fermentation during semi-dry processing (Vilela et al., 2010), hence it is adapted to the components and conditions present in this medium. This yeast is commonly found in fermentations of natural and pulped coffee (Vilela et al., 2010; Avallone et al., 2001).

Table 2
Concentrations (g/L) of residual sugars and alcohols produced in fermented coffee residues and kinetics parameters for eight yeasts strains.

Yeasts	Compounds (g/L)						Parameters			
	Sucrose	Glucose	Fructose	Glycerol	Ethanol	$Y_{p/s}$ (g/g)	Q_p (g/L h)	E_f (%)	Conv. (%)	
<i>S. cerevisiae</i>	0.04 ± 0.01	0.23 ± 0.00	0.24 ± 0.05	1.67 ± 0.13	13.47 ± 0.59 ^a	0.39 ^a	0.56 ^a	76.09 ^a	98.56 ^c	
UFLA CA11	0.01 ± 0.00	0.23 ± 0.03	0.26 ± 0.01	1.68 ± 0.06	13.78 ± 0.29 ^a	0.40 ^a	0.57 ^a	77.79 ^a	98.61 ^c	
<i>T. delbrueckii</i>	0.01 ± 0.00	0.17 ± 0.06	0.09 ± 0.02	0.32 ± 0.26	10.79 ± 0.68 ^c	0.31 ^c	0.45 ^c	60.53 ^c	99.26 ^a	
UFLA CAF58	nd	0.16 ± 0.02	0.23 ± 0.00	1.38 ± 0.05	13.58 ± 0.08 ^a	0.39 ^a	0.57 ^a	76.42 ^a	98.89 ^b	
<i>P. anomala</i>	nd	0.06	0.28 ± 0.02	1.95 ± 0.01	12.39 ± 0.72 ^b	0.35 ^b	0.52 ^b	69.50 ^b	99.19 ^a	
UFLA CAF70	nd	0.09 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.91 ± 0.09	14.67 ± 0.38 ^a	0.42 ^a	0.61 ^a	82.57 ^a	98.86 ^b	
<i>C. tropicalis</i>	0.02 ± 0.00	0.02	0.22 ± 0.01	1.21 ± 0.09	12.57 ± 0.27 ^b	0.36 ^b	0.26 ^d	70.39 ^b	99.39 ^a	
UFLA CAF76	nd	nd	0.25 ± 0.06	1.25 ± 0.25	13.67 ± 0.62 ^a	0.39 ^a	0.28 ^d	76.65 ^a	99.29 ^a	
<i>P. guilliermondii</i>	nd	nd								
UFLA CAF725	nd	nd								
<i>P. stipitis</i>	nd	nd								
NCYC 1541	nd	nd								

Average ± SD, values followed by the same letter are not significantly different at the 0.05 level (Scott-Knott test)
 $Y_{p/s}$: ethanol volumetric productivity; E_f : conversion efficiency from sugars to ethanol; *Conv.*: percentage of sugars consumed.

3.3. Volatile compounds profile of eight yeast strains in coffee residues fermentation

Other purpose of this work was to test the coffee residues for the production of aroma/flavor compounds that could be interesting for food, cosmetics or perfume industry. The GC-FID analysis of the samples, belonging to the uninoculated medium and the medium after the fermentations by the eight yeasts strains, allowed the identification of thirty-five compounds corresponding to six groups of volatile compounds, higher alcohols, acetates, ethyl esters, aldehydes, terpenes and volatile acids (Table 3). The highest concentration of higher alcohols was found in the fermentation with *P. guilliermondi* UFLA CAF725 (712.87 $\mu\text{g/L}$). Among these compounds 2-phenylethanol is industrially interesting because of its rose-like odor, the production of this compound was higher in the fermentations carried out with the strains *P. anomala* UFLA CAF70, *P. guilliermondi* UFLA CAF725 and *H. uvarum* UFLA CAF76. The strain *K. marxianus* UFLA CH1-1 had the highest concentration of acetates (100.11 $\mu\text{g/L}$). In relation to ethyl esters, only was produced ethyl butyrate by two strains *S. cerevisiae* UFLA CA11 and *P. stipitis* NCYC 1541 (Table 3). Acetates and ethyl esters are positive aromatic descriptors contributing with fruity notes (Salgado et al., 2012).

Terpenes are derived from the raw material and could have their concentration increased by enzymatic process during fermentation; they are considered positive aromas because supply floral and fruity notes and have commercial interest (Salgado et al., 2012). The fermentation with *H. uvarum* UFLA CAF76 produced the highest concentration of terpenes, which increased from 21.54 $\mu\text{g/L}$ (uninoculated medium) until 51.40 $\mu\text{g/L}$.

Volatile acids were the group more abundant in the medium fermented by *P. stipitis* NCYC 1541 (17.53 $\mu\text{g/L}$), which have odor descriptors of fatty-rancid, cheesy and sweaty. Furfural was the most abundant aldehyde in the

uninoculated medium with 46.14 g/L, this concentration enabled cell growth of all yeast strains. Besides, this compound was not detected in the medium after the fermentation by all yeasts. Therefore, furfural was likely either degraded during the fermentation or reduced into furfuryl alcohol and esterified to furfuryl acetate (Duarte et al., 2005). Furfural is undesirable because it can affect the specific growth rate of cells, the cell-mass yield on ATP and the volumetric and specific ethanol productivities, depending on its concentration in the fermentation medium (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000).

Table 3Concentrations ($\mu\text{g/L}$) of volatile compounds in coffee residues fermented by eight yeast strains

No.	Compounds	Uninoculated medium	Yeast strains (After fermentation)							
			<i>S. cerevisiae</i> UFLA CA11	<i>P. anomala</i> UFLA CAF70	<i>T. delbruekii</i> UFLA CAF58	<i>C. tropicalis</i> UFLA CES-Y573	<i>K. marxianus</i> UFLA CHI-1	<i>H. uvarum</i> UFLA CAF76	<i>P. guilliermondii</i> UFLA CAF725	<i>P. stipitis</i> NCYC 1541
<i>Higher alcohols (11)</i>										
1	Methanol	120.39±0.67	45.48 ± 5.44	39.55 ± 2.03	46.49 ± 0.14	50.75 ± 2.13	63.34 ± 2.53	126.66 ± 0.45	112.88 ± 0.05	127.73 ± 1.98
2	1-propanol	nd	4.31 ± 0.65	4.20 ± 0.87	1.49 ± 0.00	5.52 ± 0.03	6.28 ± 0.00	18.80 ± 0.27	45.83 ± 0.23	19.51 ± 0.01
3	2-methyl-1-propanol	nd	5.60 ± 0.76	23.11 ± 0.22	5.40 ± 0.26	29.16 ± 0.20	39.25 ± 0.18	84.81 ± 2.71	218.32 ± 0.72	105.96 ± 0.89
4	2-methyl-1-butanol	1.51 ± 0.02	38.79 ± 0.44	124.40 ± 0.12	55.06 ± 0.21	61.28 ± 0.29	114.08 ± 1.62	222.27 ± 1.18	213.12 ± 0.83	243.25 ± 0.78
5	3-methyl-1-butanol	nd	0.59 ± 0.03	nd	nd	nd	nd	nd	nd	61.32 ± 6.03
6	2-heptanol	nd	Nd	nd	0.65 ± 0.04	nd	nd	nd	nd	nd
7	1-hexanol	nd	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	3.28 ± 0.61	nd
8	1-butanol	6.32 ± 0.72	9.08 ± 1.48	4.95 ± 1.14	2.68 ± 0.06	1.52 ± 0.48	2.27 ± 0.37	18.72 ± 0.67	32.83 ± 0.19	8.57 ± 0.58
9	Trans-3-hexen-1-ol	6.46 ± 0.05	9.80 ± 1.04	4.99 ± 0.62	1.37 ± 0.14	1.64 ± 0.32	2.32 ± 0.25	19.28 ± 1.42	61.22 ± 0.77	8.04 ± 0.10
10	Furfuryl alcohol	nd	1.46 ± 0.23	1.58 ± 0.01	1.96 ± 0.07	2.04 ± 0.05	1.99 ± 0.07	3.62 ± 0.03	4.51 ± 0.49	5.95 ± 0.08
11	2-phenylethanol	nd	6.50 ± 0.21	28.39 ± 4.85	11.77 ± 0.10	15.60 ± 0.34	15.06 ± 0.35	15.92 ± 0.13	20.89 ± 0.13	14.04 ± 0.27
	<i>Total higher alcohols</i>	134.68	121.61	231.17	126.87	167.52	244.60	510.08	712.87	594.36
<i>Acetates (6)</i>										
12	Isobutyl acetate	nd	nd	nd	nd	0.22 ± 0.02	nd	nd	nd	2.05 ± 0.07
13	Isoamyl acetate	nd	4.91 ± 0.59	73.46 ± 1.36	0.57 ± 0.05	1.52 ± 0.15	19.97 ± 0.85	nd	1.39 ± 0.19	12.82 ± 0.67
14	Ethyl acetate	12.71 ± 0.40	1.27 ± 0.10	nd	nd	nd	nd	10.84 ± 0.42	14.09 ± 0.60	9.26 ± 0.06

Table 3 continued

No.	Compounds	Uninoculated medium	Yeast strains (After fermentation)									
			<i>S. cerevisiae</i> UFLA CA11	<i>P. anomala</i> UFLA CAF70	<i>T. delbruekii</i> UFLA CAF58	<i>C. tropicalis</i> UFLA CES-Y573	<i>K. marxianus</i> UFLA CHI-1	<i>H. uvarum</i> UFLA CAF76	<i>P. guilliermondii</i> UFLA CAF725	<i>P. stipitis</i> NCYC 1541		
15	Propyl acetate	nd	nd	2.04 ± 0.17	nd	nd	nd	0.83 ± 0.00	nd	nd	nd	nd
16	Furfuryl acetate	4.81 ± 1.51	6.14 ± 0.91	1.45 ± 0.11	2.05 ± 0.11	2.84 ± 0.14	2.06 ± 0.49	10.37 ± 1.55	16.36 ± 0.49	4.48 ± 0.23	38.53 ± 0.29	67.13
17	Phenylethyl acetate	5.78 ± 0.27	2.39 ± 0.14	6.95 ± 1.98	2.86 ± 0.23	2.58 ± 0.52	77.25 ± 0.49	26.66 ± 1.12	8.47 ± 0.32	40.31	47.87	67.13
	<i>Total acetates</i>	23.30	14.71	83.91	5.49	7.17	100.11	47.87	40.31	47.87	40.31	67.13
	<i>Ethyl esters (1)</i>											
18	Ethyl butyrate	nd	0.61 ± 0.02	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3.32 ± 0.11
	<i>Total ethyl esters</i>	0.00	0.61	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.32
	<i>Aldehydes (4)</i>											
19	Acetaldehyde	30.95 ± 0.18	10.46 ± 0.80	20.22 ± 0.01	20.93 ± 0.83	28.51 ± 0.09	21.23 ± 0.47	30.41 ± 0.52	52.64 ± 2.16	34.04 ± 2.70	319.87 ± 0.25	363.32
20	Butyraldehyde	nd	4.43 ± 0.59	387.55 ± 7.86	5.53 ± 0.19	9.40 ± 0.11	295.43 ± 1.44	4.35 ± 0.15	22.05 ± 2.20	42.57 ± 0.33	9.42 ± 0.56	117.27
21	Octanal	nd	nd	nd	2.48 ± 0.51	0.98 ± 0.05	nd	10.35 ± 0.36	nd	nd	nd	nd
22	Furfural	46.14 ± 0.93	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	<i>Total aldehydes</i>	77.09	14.89	407.77	28.94	38.88	316.66	45.11	117.27	45.11	117.27	363.32
	<i>Terpenes (6)</i>											
23	Linalool	6.82 ± 0.03	7.37 ± 0.67	9.80 ± 0.24	6.98 ± 0.14	6.86 ± 0.52	6.69 ± 0.37	9.26 ± 0.82	7.90 ± 0.04	9.58 ± 0.07	4.46 ± 0.04	10.13 ± 0.89
24	a-Terpeniol	2.32 ± 0.13	2.18 ± 0.27	1.92 ± 0.00	1.52 ± 0.06	1.39 ± 0.00	1.71 ± 0.13	4.32 ± 0.09	2.73 ± 0.02	3.51 ± 0.29	4.71 ± 0.25	9.46 ± 0.29
25	Verbenone	3.45 ± 0.15	2.97 ± 0.22	2.86 ± 0.20	3.01 ± 0.13	7.01 ± 1.82	nd	4.51 ± 0.48	4.71 ± 0.25	4.71 ± 0.25	4.71 ± 0.25	9.46 ± 0.29
26	b-Citronellol	3.89 ± 0.03	1.73 ± 0.31	22.73 ± 2.44	2.58 ± 0.40	11.34 ± 0.16	8.04 ± 1.03	29.86 ± 0.44	4.71 ± 0.25	4.71 ± 0.25	4.71 ± 0.25	9.46 ± 0.29
27	Geraniol	1.02 ± 0.31	nd	1.15 ± 0.13	0.84 ± 0.20	nd	1.15 ± 0.05	3.46 ± 0.32	nd	nd	nd	nd

Table 3 continued

No.	Compounds	Uninoculated medium	Yeast strains (After fermentation)									
			<i>S. cerevisiae</i> UFLA CA11	<i>P. anomala</i> UFLA CAF70	<i>T. delbruekii</i> UFLA CAF58	<i>C. tropicalis</i> UFLA CES-Y573	<i>K. marxianus</i> UFLA CHI-1	<i>H. uvarum</i> UFLA CAF76	<i>P. guilliermondii</i> UFLA CAF725	<i>P. stipitis</i> NCYC 1541		
28	Guaiacol	2.04 ± 0.07	1.10 ± 0.09	1.33 ± 0.26	1.08 ± 0.15	3.62 ± 0.39	nd	nd	nd	nd	7.49 ± 0.52	
	Total terpenes	21.54	15.35	39.80	16.00	30.23	17.59	51.40	18.85	41.12		
	<i>Volatile acids (5)</i>											
29	Isobutyric acid	2.13 ± 0.08	0.96 ± 0.08	3.02 ± 0.78	0.94 ± 0.03	1.35 ± 0.02	3.77 ± 0.15	3.09 ± 0.27	1.30 ± 0.28	nd		
30	Butyric acid	nd	0.93 ± 0.03	nd	nd	nd	0.65 ± 0.04	nd	nd	8.78 ± 0.45		
31	Octanoic acid	2.04 ± 0.11	1.29 ± 0.07	nd	nd	nd	2.38 ± 0.35	nd	nd	nd		
32	Nonanoic acid	nd	nd	nd	nd	nd	0.56 ± 0.07	nd	nd	nd		
33	Decanoic acid	1.58 ± 0.20	1.11 ± 0.38	nd	0.95 ± 0.13	nd	nd	2.51 ± 0.23	3.83 ± 0.13	8.75 ± 0.07		
	Total volatile acids	5.75	4.29	3.02	1.89	1.35	7.36	5.60	5.13	17.53		
	<i>Others (2)</i>											
34	1,1-dietoxyethane	nd	nd	1.48 ± 0.04	nd	nd	nd	nd	nd	nd		
35	2,3-butanedione	2.20 ± 0.42	5.97 ± 1.08	2.14 ± 0.24	1.36 ± 0.06	0.57 ± 0.01	0.60 ± 0.06	5.17 ± 0.88	4.13 ± 0.18	1.14 ± 0.12		
	Total others	2.20	5.97	3.62	1.36	0.57	0.60	5.17	4.13	1.14		

nd not detected

Figure 1 shows the Principal Component Analysis (PCA) performed on the data from Table 3, it indicates the relationship between the composition of the volatile compounds and the yeast strains. PCA reduces the dimensionality of a data set consisting of a large number of interrelated variables, while retaining as much as possible of the variation present in the data set. This is achieved by transforming to a new set of variables, the principal components (PCs), which are uncorrelated and ordered so that the first few retain most of the variation present in the original variables (Jolliffe, 2002). The first two principal components, PC1 and PC2, accounted for 55.35 % of total variance (34.61 and 20.71 %, respectively). The PC1 enabled the differentiation between the yeasts strains (Fig. 1b). In the positive side of PC1 and the negative side of PC2, the strains *H. uvarum* UFLA CAF76 and *P. P. guilliermondi* UFLA CAF725 were correlated with higher concentrations of octanal (21), 1-butanol (8), furfuryl acetate (16), trans-3-hexen-1-ol (9), ethyl acetate (14), acetaldehyde (19), 2-methyl-1-propanol (3) e 1-propanol (2) (Fig. 1a, b). *P. stipitis* NCYC 1541 was positively characterized in PC1 and PC2 by butyric acid (30), isobutyl acetate (12), ethyl butyrate (18), 3-methyl-1-butanol (5) and verbenone (25). In the negative side of PC1 and the positive side of PC2, the strains *H. uvarum* UFLA CAF70 and *K. marxianus* UFLA CH1-1 were correlated mainly with isoamyl acetate (13) and propyl acetate (15). The uninoculated medium is located at negative values of PC1 and PC2, characterized by the contribution of furfural (Fig. 1a, b).

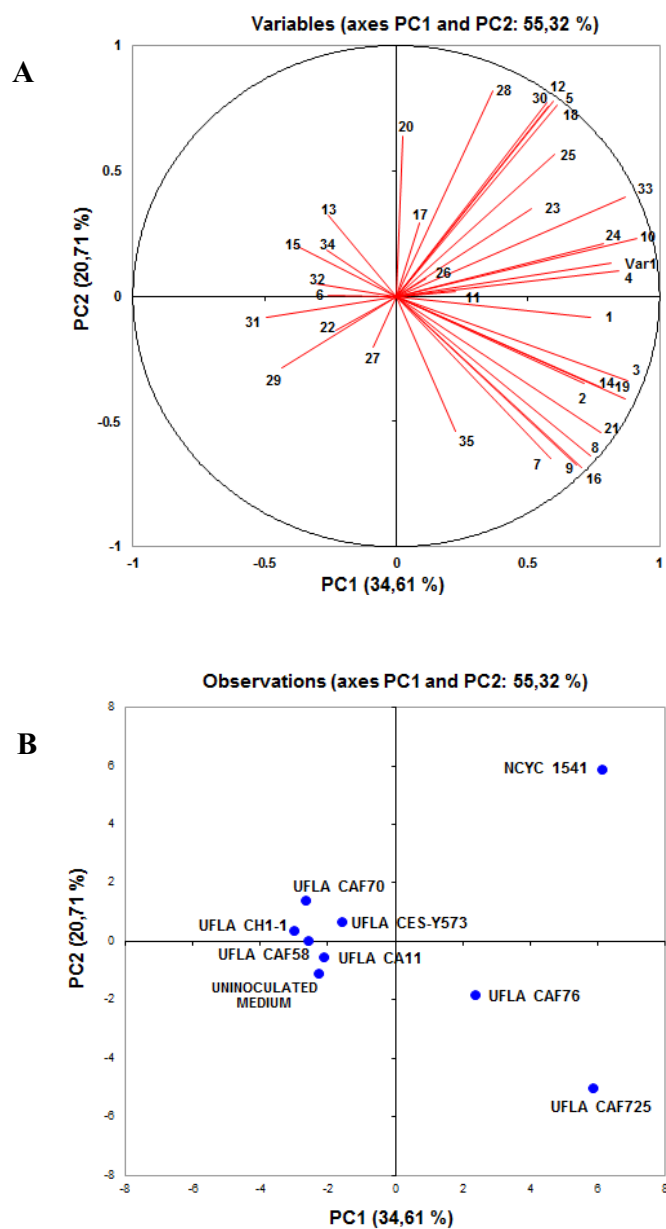


Fig. 1. Principal component analysis of volatile compounds (A) in coffee residues fermented by eight yeast strains (B). The numbers 1-35 correspond to the volatile compounds detailed in Table 3.

3.4. Evaluation of the effect of the culture medium composition and the inoculum size on fermentation performance

Three variables were tested for the improvement of fermentation performance with the yeast *H. uvarum* UFLA CAF76. The variables were coffee pulp concentration, yeast extract concentration and inoculum size (Table 4). The higher ethanol concentrations were achieved in the assays 5, 6, 9 and 10 with values ranging from 20.39 to 21.02 g/L (letter *a* in the Scott-Knott test), these assays also had the best productivities (Q_p). These assays contained the higher concentration of coffee pulp (12%), the yeast extract varied between 1 and 2 g/L, as well as, the inoculum size (0.3 and 2 g/L). Therefore, the greater coffee pulp concentration and the addition of yeast extract enhanced the ethanol production. Regarding the ethanol yield ($Y_{p/s}$) and the efficiency (E_f), the assays 4 to 12 showed the higher values, varying within the range of 0.459–0.479 g/g and 90.3–93.8%, respectively (Table 4).

The selection of the best assay was made according to economic aspects. For 1 or 2 g/L of yeast extract, there were no significant differences among the values of each parameter, hence to reduce costs in the process can be chosen 1 g/L. Likewise, the parameters were not influenced by the inoculum size, since there were no significant differences between the assays whose coffee pulp and yeast extract concentrations were kept constants. Thus, the lower concentration of inoculum (0.3 g/L) may be used for optimizing time and lowering the costs. Therefore, the assay 5 was selected for the fermentation in 1 L. The assay 5 had high ethanol concentration, high ethanol yield ($Y_{p/s}$), high productivity (Q_p) and high conversion efficiency (E_f) with values of 20.39 g/L, 0.474 g/g, 0.849 g/L h and 92.89%, respectively (Table 4). These values were greater than those achieved in the screening step by the same yeast (UFLA CAF76), probably due to the addition of yeast extract and increase of coffee pulp to 12%, consequently the sugar content increased, improving the fermentation parameters.

The ethanol yield obtained with assay 5 was greater than reported in previous studies that used different coffee wastes as substrate. For example, Mussatto et al. (2012) achieved 11.7 g/L of ethanol from 54 g/L of initial sugars, in a fermentation of spent coffee ground hydrolysates. A mixture of coffee pulp and mucilage underwent to acid hydrolysis and fermented with commercial baker's yeast showed an ethanol yield of 25.44 g/L, from 64.40 g/L of total sugars (Navia et al., 2011). For coffee residue waste, Choi et al. (2012) found that fermentation with *S. cerevisiae* KCTC 7906, produced 15.3 g/L of ethanol from 40.2 g/L of fermentable sugars, after a popping pretreatment and enzymatic hydrolysis.

Table 4
Results of ethanol production and kinetics parameters after 24 h of fermentation in different medium compositions and inoculum sizes of *H. uvarum* UFLA CAF76

Assays	Variables			Parameters				
	Coffee pulp (% w/v)	Yeast extract (g/L)	Inoculum size (dry weight g/L)	Ethanol (g/L)	$Y_{p/s}$ (g/g)	Q_p (g/L h)	E_f (%)	Conv. (%)
1	12	0	0.3	13.14 ± 0.14 ^c	0.419 ^b	0.547 ^c	82.104 ^b	74.348 ^d
2	12	0	2	15.57 ± 0.30 ^b	0.436 ^b	0.649 ^b	85.420 ^b	82.061 ^c
3	6	0	0.3	15.15 ± 0.10 ^b	0.446 ^b	0.631 ^b	87.532 ^b	99.028 ^a
4	6	0	2	15.16 ± 0.08 ^b	0.475 ^a	0.631 ^b	93.232 ^a	99.171 ^a
5	12	1	0.3	20.39 ± 0.25 ^a	0.474 ^a	0.849 ^a	92.887 ^a	95.356 ^b
6	12	1	2	20.67 ± 0.26 ^a	0.459 ^a	0.861 ^a	90.029 ^a	97.280 ^a
7	6	1	0.3	15.70 ± 0.11 ^b	0.479 ^a	0.654 ^b	93.883 ^a	97.510 ^a
8	6	1	2	15.78 ± 0.08 ^b	0.467 ^a	0.657 ^b	91.587 ^a	97.775 ^a
9	12	2	0.3	21.02 ± 0.16 ^a	0.471 ^a	0.876 ^a	92.362 ^a	97.384 ^a
10	12	2	2	20.93 ± 0.86 ^a	0.472 ^a	0.872 ^a	92.483 ^a	97.694 ^a
11	6	2	0.3	15.62 ± 0.44 ^b	0.466 ^a	0.651 ^b	91.443 ^a	97.946 ^a
12	6	2	2	16.01 ± 0.13 ^b	0.474 ^a	0.667 ^b	92.995 ^a	98.285 ^a

Values followed by the same letter are not significantly different at the 0.05 level (Scott-Knott test)
 $Y_{p/s}$: ethanol yield factor; Q_p : ethanol volumetric productivity; E_f : conversion efficiency from sugars to ethanol; Conv: percentage of sugars consumed.

3.5. Fermentation with optimized conditions

The fermentation in 1 L of medium was performed with 12% of coffee pulp, 1 g/L yeast extract and 0.3 g/L (dry weight) of inoculum size. In this fermentation, *H. uvarum* UFLA CAF76 achieved the highest ethanol yield factor ($Y_{p/s}$) in all stages of this study, with a value of 0.48 g/g. Consistent with $Y_{p/s}$, the E_f value was also higher (94.81 %), as well as, the $Conv$ value (96.55 %). The ethanol productivity (Q_p) was 0.55 g/L h. These values are better than those found in other studies of ethanol production from different coffee raw materials. For example, fermentation of spent coffee grounds hydrolysates by *S. cerevisiae* RL-11 yielded an $Y_{p/s}$ of 0.26 g/g, Q_p of 0.49 g/l h, and E_f of 50.2% (Mussatto et al., 2012). Another study reported that fermentation of wet coffee pulp hydrolysate by *S. cerevisiae* achieved an ethanol yield of 0.46 g/g and showed an efficiency of 40% (Shenoy et al., 2011). Fermentation of coffee residue waste treated with enzymatic hydrolysis obtained a maximum ethanol yield of 89.9% (Choi et al., 2012). Kwon et al. (2013) after fermentation with *S. cerevisiae* found ethanol yields of 0.46 g/g for hydrolyzate of spent coffee grounds and 0.43 g/g for hydrolyzate of lipid extracted coffee grounds.

It can be observed that our production of ethanol by fermentation of coffee pulp and wastewater was quite satisfactory in comparison to literature data, since all those studies used acid or enzymatic hydrolysis of raw material. With this in mind, a possibility to further improve ethanol production obtained in this study would be to add pretreatment steps (i.e. acid or enzymatic hydrolysis/saccharification) to release more fermentable sugars. On another hand, it can be note that all those authors used *S. cerevisiae* in the fermentation. This study found that *H. uvarum* UFLA CAF76 was able to produce ethanol from coffee residues in similar or better yields. Therefore, further research should be carried out on the potential of this strain for ethanol production from these residues. Coffee residues could be used widely for fermentation process,

since fermentable sugars are available in high concentration and high ethanol production may be achieved.

After the fermentation, sucrose, glucose and fructose remained in concentrations of 0.26 g/L, 0.53 g/L and 0.19 g/L, respectively. It had been reported that *H. uvarum* strains showed a fructophilic character, having a preferential consumption of fructose respect to glucose (De Benedictis et al., 2011), which was confirmed with our results.

Table 5 shows the twenty-one volatile compounds found in coffee residues fermented with a pure culture of *H. uvarum* UFLA CAF76. Apiculate yeasts have been reported as producers of aroma compounds, mainly in winemaking (Hong et al., 2013; De Benedictis et al., 2011; Moreira et al., 2011; Fleet, 2003). Here the volatile profile obtained was similar to that found in the screening stage, with a slight decrease in concentrations, probably due to the different origin of coffee wastewater that was discussed previously. Following the most commercially interesting volatile compounds will be addressed.

The group more abundant was the higher alcohols; the oxygenation by stirring contributes to their production (Estela Escalante et al., 2011). One of the most interesting higher alcohols is the 2-phenylethanol, an aromatic alcohol with a rose-like odor widely used in perfumery, cosmetics and food industry. This aroma compound was produced during the fermentation with *H. uvarum* UFLA CAF76 (14.56 µg/L) as well as phenylethyl acetate (16.42 µg/L), a derivative with rose, honey and apple odors. The ability of apiculate yeasts to produce these compounds was reported previously (Moreira et al., 2008, 2011). Currently, most of consumers prefer natural food additives and since the 2-phenylethanol extracted from plants has high price in the market (US\$ 1,000 per kg), the microbial fermentation is a good and efficient alternative for its production in a relatively inexpensive method (Eshkol et al., 2009). The production cost could be even lower if the raw materials are agroindustrial

residues. The 2-phenylethanol is produced naturally by various yeast strains from the catabolism of 2-phenylalanine via Ehrlich pathway (Longo and Sanromán, 2006). It had been reported that the presence of ethanol and 2-phenylethanol in the medium resulted in a synergistic inhibition, which reduced the tolerance of yeast to 2-phenylethanol and thus its production (Eshkol et al., 2009; Longo and Sanromán, 2006). Hence, in a further study with the purpose of producing 2-phenylethanol, this compound could be removed *in situ* with specialized resins for increase its production.

Other interesting group of aroma compounds for industry are the terpenes found mainly in plants, but fungi belonging to the ascomycetes and basidiomycetes also synthesize several important terpenes (Longo and Sanromán, 2006). These compounds were characterized by the production of linalool (sweet, fresh, citrus odor) and b-citronellol (fresh, rose-like odor) in concentrations of 11.61 $\mu\text{g/L}$ and 9.50 $\mu\text{g/L}$, respectively. They are two of the most flavor-active compounds due to their low sensory threshold (Longo and Sanromán, 2006). Terpenes can be present as free molecules or non-aromatic glycosylated precursors, and non-*Saccharomyces* species can release enzymes (e.g., β -glucosidase) with the capacity to hydrolyze these precursors producing their active aromatic forms useful for flavor and fragrance industries (Maturano et al., 2012).

There are no reports in the literature addressing the value addition to agroindustrial residues using *H. uvarum*. However, the most of volatile compounds produced by *H. uvarum* UFLA CAF76 in fermented coffee residues have been identified by several authors in wine fermentation (Hong et al. 2013; Duarte et al., 2012; De Benedictis et al., 2011; Moreira et al. 2011; Moreira et al. 2008), indicating the potential of this yeast for natural production of aromas.

Table 5

Concentrations ($\mu\text{g/L}$) of volatile compounds in coffee residues fermented by *H. uvarum* UFLA CAF76

No.	Compounds	Uninoculated medium	After fermentation
<i>Higher alcohols</i>			
1	Methanol	108.69 ± 1.95	98.24 ± 5.14
2	1-propanol	nd	17.47 ± 1.04
3	2-methyl-1-propanol	nd	57.46 ± 1.69
4	2-methyl-1-butanol	nd	111.53 ± 2.48
5	1-butanol	6.60 ± 0.51	9.11 ± 1.46
6	Trans-3-hexen-1-ol	7.74 ± 0.28	12.07 ± 0.55
7	Furfuryl alcohol	nd	2.33 ± 0.24
8	2-phenylethanol	nd	14.56 ± 0.89
	<i>Total higher alcohols</i>	123.03	322.77
<i>Acetates</i>			
9	Ethyl acetate	14.91 ± 0.10	15.63 ± 0.49
10	Furfuryl acetate	1.29 ± 0.22	3.67 ± 0.36
11	Phenylethyl acetate	5.56 ± 0.49	21.98 ± 1.19
	<i>Total acetates</i>	21.76	41.28
<i>Aldehydes</i>			
12	Acetaldehyde	31.65 ± 2.08	30.44 ± 1.55
13	Butyraldehyde	nd	2.95 ± 0.43
	<i>Total aldehydes</i>	85.80	33.39
<i>Terpenes</i>			
14	Linalool	5.61 ± 0.04	17.22 ± 0.76
15	a-Terpeniol	2.75 ± 0.16	3.90 ± 0.42
16	Verbenone	1.85 ± 0.10	3.26 ± 0.65
17	b-Citronellol	2.74 ± 0.26	12.24 ± 0.66
18	Geraniol	1.54 ± 0.23	2.27 ± 0.20
	<i>Total terpenes</i>	15.12	33.89
<i>Volatile acids</i>			
19	Nonanoic acid	5.72 ± 0.19	3.20 ± 0.44
20	Decanoic acid	3.57 ± 0.10	6.17 ± 0.57
	<i>Total volatile acids</i>	15.18	9.37
<i>Others</i>			
21	2,3-butanedione	0.88 ± 0.08	1.63 ± 0.26
	<i>Total others</i>	0.88	1.63

According to Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2013), the state of Minas Gerais (Brazil) produce about 1.44 ton of coffee per hectare. According to this production, it is estimated the generation of 0.58 tons of coffee pulp in that area. Therefore, using the coffee pulp and coffee wastewater produced per hectare, as substrate for fermentation, it could be produced 125.67 L of bioethanol, 71.05 mg of 2-phenylethanol, 79,36 mg of phenylethyl acetate, 56.12 mg of linalool and 45.9 mg of b-citronellol, with the process described in this study.

On the other hand, phenolic compounds present in coffee pulp may produce lower absorption of amino acids and glucose, reduce food intake and lower digestibility of nutrients in ruminants, depending of the concentration (Waghorn and McNabb, 2003). These compounds were measured in the residual solid after the fermentation and it was found a concentration of 0.13 g/100 g of dry material. Compared with the concentration in the coffee pulp (2.62 g/100 g in dry matter), it can be noted a substantial decrease of total phenolic compounds. This means that the fermentation process could detoxify the coffee pulp and this solid residue could have a possible application in animal feed.

This was an initial work for test the potential of coffee residues to produce value-added compounds, so there are many aspects that can be studied and improved, as operational conditions (e.g. temperature, agitation, pH, oxygen availability, etc), hydrolysis pretreatments and production of other value-added compounds (e.g. single-cell protein, phytochemicals, antioxidant compounds, enzymes, organic acids). This work proposes a low-cost fermentation process that could be of industrial value for coffee processing industries, generating extra incomes from value-added compounds. Likewise, this technology could be a proper alternative for waste disposal and recovery, minimizing the negatives effects to the environment.

4. Conclusions

Coffee residues have a large potential as raw material for bioethanol and volatile compounds production. *H. uvarum* UFLA CAF76 presented the best fermentation performance, which improvement was achieved with 12% w/v of coffee pulp, 1 g/L of yeast extract and 0.3 g/L of inoculum. Under these conditions, interesting results of ethanol yield ($Y_{p/s}$), productivity (Q_p) and efficiency (E_f) were obtained. The profile of aroma compounds was characterized by the production of 2-phenylethanol, phenylethyl acetate, linalool and b-citronellol. *H. uvarum* demonstrated to be quite promising yeast for fermentations from coffee residues, further researches are necessary to elucidate and maximize their potential.

Acknowledgements

We are grateful for the financial support of this work to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

AOAC, 1970. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, eleventh ed. AOAC, Washington, USA. 1015p.

APHA, 1992. American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water, eighteenth ed. American Public Health Association, Washington, USA.

Avallone, S., Guyot, B., Brillouet, J.M., Olguin, E., Guiraud, J.P., 2001. Microbiological and biochemical study of coffee fermentation. *Current microbiology* 42 (4), 252-256.

Azzolini, M., Fedrizzi, B., Tosi, E., Finato, F., Vagnoli, P., Scrinzi, C., Zapparoli, G., 2012. Effects of *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed cultures on fermentation and aroma of Amarone wine. *European Food Research and Technology* 235 (2), 303-313.

Balat, M., Balat, H., 2009. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. *Applied Energy* 86 (11), 2273-2282.

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), 07–18.

Bitter, V., Muir, H.M., 1962. Modified uronic acid carbazole reaction. *Analytical Biochemistry* 4 (4), 330–334.

Choi, I.S., Wi, S.G., Kim, S-B., Bae, H-J, 2013. Conversion of coffee residue waste into bioethanol with using popping pretreatment. *Bioresource Technology* 125, 132-137.

CONAB, 2013. Companhia Nacional de Abastecimento. Available at: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_05_14_09_35_12_bol_etim_cafe_mai_2013.pdf. Accessed 06 March 2014.

COPAM. 2008. Deliberação Normativa Conjunta COPAM /CERH-MG nº 01, March 05, 2008. Available on: <http://www.siam.mg.gov.br/sla/download.pdf?idNorma=8151>

De Benedictis, M., Bleve, G., Grieco, F., Tristezza, M., Tufariello, M., 2011. An optimized procedure for the enological selection of non-*Saccharomyces* starter cultures. *Antonie van Leeuwenhoek* 99 (2), 189-200.

Duarte, L.C., Carvalheiro F., Neves, I., Girio, F.M., 2005. Effects of aliphatic acids, furfural, and phenolic compounds on *Debaryomyces hansenii* CCMI 941. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 121 (1–3), 413–425.

Duarte, W., Sousa, M., Dias, D., Schwan, R., 2011. Effect of co-inoculation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus fermentum* on the quality of the distilled sugar cane beverage cachaça. *Journal of Food Science* 76 (9), C1307-C1318.

Duarte, W., Amorim, J., Schwan, R., 2012. The effects of co-culturing non-*Saccharomyces* yeasts with *S. cerevisiae* on the sugar cane spirit (cachaça) fermentation process. *Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology* 103 (1), 175-194.

Elias, L.G., 1979. Chemical composition of coffee berry by-products, in: Braham, J.E., Bressani, R. (Eds.), *Coffee Pulp: Composition, Technology and*

Utilization. Publication 108e, International Development Research Centre, Ottawa, Ont., pp. 11–13.

Eshkol, N., Sendovski, M., Bahalul, M., Katz-Ezov, T., Kashi, Y., Fishman, A., 2009. Production of 2-phenylethanol from L-phenylalanine by a stress tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Journal of Applied Microbiology* 106 (2), 534-542.

Esquivel, P., Jiménez, V.M., 2012. Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International* 46 (2), 488-495.

Estela Escalante, W., Rychtera, M., Melzoch, K., Hatta Sakoda, B., Quillama Polo, E., Ludeña Cervantes, Sarmiento Casavilca, V., Chaquilla Quilca, G., 2012. Actividad fermentativa de *Hanseniaspora uvarum* y su importancia en la producción de bebidas fermentadas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 31 (1), 57-63.

Fleet, G.H., 2003. Yeast interactions and wine flavour. *International journal of food microbiology* 86 (1), 11-22.

Goshima, T., Tsuji, M., Inoue, H., Yano, S., Hoshino, T., Matsushika, A., 2013. Bioethanol production from lignocellulosic biomass by a novel *Kluyveromyces marxianus* strain. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 77 (7), 1505-1510.

Haddis, A., Devi, R., 2008. Effect of effluent generated from coffee processing plant on the water bodies and human health in its vicinity. *Journal of hazardous materials* 152 (1), 259-262.

Hong, Y.A., Park, H.D., 2013. Role of non-*Saccharomyces* yeasts in Korean wines produced from Campbell Early grapes: Potential use of *Hanseniaspora uvarum* as a starter culture. *Food microbiology* 34 (1), 207-214.

ICO, 2014. International Coffee Organization. Available at: <http://www.ico.org/>. Accessed 16 January 2014.

Jolliffe, I.T., 2002. *Principal Component Analysis*, second ed. Springer-Verlag Inc., New York.

Kwon, E.E., Yi, H., Jeon, Y.J., 2013. Sequential co-production of biodiesel and bioethanol with spent coffee grounds. *Bioresource Technology* 136, 475-480.

Longo, M., Sanromán, M., 2006. Production of Food Aroma Compounds: microbial and enzymatic methodologies. *Food Technology and Biotechnology* 44 (3), 335–353.

Maturano, Y.P., Rodríguez Assaf, L.A., Toro, M.E., Nally, M.C., Vallejo, M., Castellanos de Figueroa, L.I., Combina M., Vazquez, F., 2012. Multi-enzyme production by pure and mixed cultures of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts during wine fermentation. *International journal of food microbiology* 155 (1), 43-50.

Medeiros, A.B., Pandey, A., Christen, P., Fontoura, P. S., de Freitas, R.J., Soccol, C.R., 2001. Aroma compounds produced by *Kluyveromyces marxianus* in solid state fermentation on a packed bed column bioreactor. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 17 (8), 767-771.

Moreira, N., Mendes, F., Guedes de Pinho, P., Hogg, T., Vasconcelos, I., 2008. Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must. *International journal of food microbiology* 124 (3), 231-238.

Moreira, N., Pina, C., Mendes, F., Couto, J.A., Hogg, T., Vasconcelos, I., 2011. Volatile compounds contribution of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora uvarum* during red wine vinifications. *Food Control* 22 (5), 662-667.

Murthy, P. S., Madhava Naidu, M., 2012. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition—A review. *Resources, Conservation and Recycling* 66, 45-58.

Mussatto, S.I., Machado, E.M., Martins, S., Teixeira, J.A., 2011. Production, composition, and application of coffee and its industrial residues. *Food and Bioprocess Technology* 4 (5), 661-672.

Mussatto, S.; Machado, E.M.S.; Carneiro, L.M.; Teixeira, J. A., 2012. Sugars metabolism and ethanol production by different yeast strains from coffee industry wastes hydrolysates. *Applied Energy* 92, 763–768.

Navia, D.P.; Velasco, R.J.; Hoyos, J.L., 2011. Production and evaluation of ethanol from coffee processing by-products. *Vitae* 18 (3), 287-294.

Nelson, N.A., 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry* 135, 375–380.

Oberoi, H. S., Vadlani, P. V., Brijwani, K., Bhargav, V. K., Patil, R. T., 2010. Enhanced ethanol production via fermentation of rice straw with hydrolysate-adapted *Candida tropicalis* ATCC 13803. *Process Biochemistry* 45 (8), 1299-1306.

Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II: inhibitors and mechanism of inhibition. *Bioresource Technology* 74, 25-33.

Pandey, A., Soccol, C. R., Nigam, P., Brand, D., Mohan, R., Roussos, S., 2000. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal* 6 (2), 153-162.

Ponzoni, C., Gasparetti, C., Goretti, M., Turchetti, B., Pagnoni, U. M., Cramarossa, M. R., Forti, L., Buzzini, P., 2008. Biotransformation of acyclic monoterpenoids by *Debaryomyces* sp., *Kluyveromyces* sp., and *Pichia* sp. strains of environmental origin. *Chemistry & biodiversity* 5 (3), 471-483.

Ponzoni, C., Gasparetti, C., Goretti, M., turchetti, b.; pagnonia, u.; cramarossa, m.; forti, l.; buzzini, P. Biotransformation of acyclic monoterpenoids by *Debaryomyces* sp., *Kluyveromyces* sp., and *Pichia* sp. strains of environmental origin. *Chemistry & Biodiversity*, v. 5, p. 471 – 483, 2008.

Salgado, J.M., González-Barreiro, C., Rodríguez-Solana, R., Simal-Gándara, J., Domínguez, J.M., Cortés, S., 2012. Study of the volatile compounds produced

by *Debaryomyces hansenii* NRRL Y-7426 during the fermentation of detoxified concentrated distilled grape marc hemicellulosic hydrolysates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28 (11), 3123-3134.

Shenoy, D., Pai, A., Vikas, R., Neeraja, H., Deeksha, J., Nayak, C., Vaman, C., 2011. A study on bioethanol production from cashew apple pulp and coffee pulp waste. *Biomass and bioenergy* 35, 4107-4111.

Sobocan G., Glavic P., 2000. Optimization of ethanol fermentation process design. *Applied Thermal Engineering* 20 (6), 529-543.

Ulloa, J., Verreth, J., Amato, S., Huisman, E., 2003. Biological treatments affect the chemical composition of coffee pulp. *Bioresource Technology* 89 (3), 267-274.

Vandamme, E.J., 2003. Bioflavours and fragrances via fungi and their enzymes. *Fungal Diversity* 13, 153-166.

Van der Kamer, J.H., Van Ginkel, L., 1952. Rapid determination of crude fiber in cereals. *Cereal Chemistry* 29 (4), 23-25.

Van Soest, P.J., Wine, R.H., 1968. Determination of lignin and cellulose in acid detergent fiber with permanganate. *Journal of AOAC* 51, 780-785.

Vilela, D.M., Pereira, G.V.D. M., Silva, C.F., Batista, L.R., Schwan, R.F., 2010. Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). *Food microbiology* 27 (8), 1128-1135.

Waghorn, G.C., McNabb, W C., 2003. Consequences of plant phenolic compounds for productivity and health of ruminants. *Proceedings of the Nutrition Society* 62 (02), 383-392.