

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE AROMAS DE FRUTAS
POR MICRORGANISMOS PECTINOLÍTICOS
UTILIZANDO-SE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Dissertação de Mestrado

MARIANA UENOJO

Engenheira de Alimentos

Campinas

2003

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

Uenojo, Mariana
Ue5p Produção e caracterização de aromas de frutas por
microrganismos pectinolíticos utilizando-se resíduos
agroindustriais / Mariana Uenojo. – Campinas, SP: [s.n.], 2003.

Orientador: Glaucia Maria Pastore
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Pectina. 2.Fermentação. 3.Aroma. 4.Resíduos industriais.
5.Bagaço. 6.Cromatografia de gás. I.Pastore, Gláucia Maria.
II.Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia
de Alimentos. III.Título.

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE AROMAS DE FRUTAS
POR MICRORGANISMOS PECTINOLÍTICOS
UTILIZANDO-SE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Dissertação de Mestrado

Ciência de Alimentos

MARIANA UENOJO

Engenheira de Alimentos

Profa. Dra. Glaucia Maria Pastore

Orientadora

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos para a obtenção
de título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Campinas, de de 2003.

Profa. Dra. Glaucia Maria Pastore

Orientadora

Profa. Dra. Margarida Yamaguchi

Membro

Profa. Dra. Gabriela Alves Macedo

Membro

Profa. Dra. Hilary Castle de Menezes

Membro

*“Acredite num amor que lhe é conservado como uma herança
e fique certo de que há nesse amor uma força e uma bênção
a que não se arrancará mesmo se for para muito longe”.*

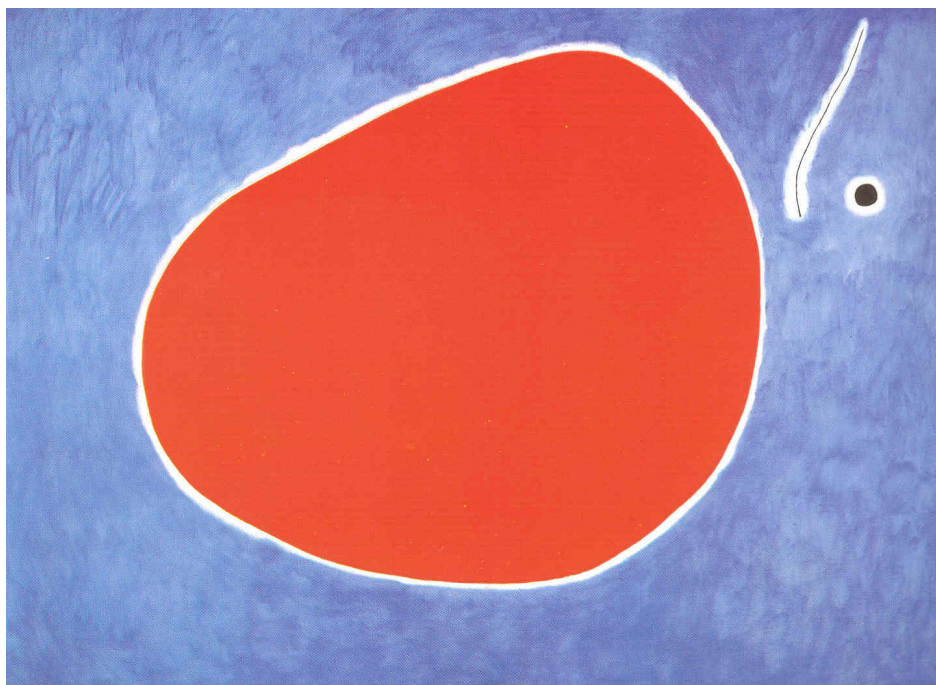
Rainer Maria Rilke

Aos meus pais Maria e Akira

À minha irmã Juliana

Aos meus melhores amigos do homem Argos, Aton e Friga

Dedico



O vôo da libélula diante do sol, 1968, Joan Miró.

“A ordem que nossa mente imagina é como uma rede, ou uma escada, que se constrói para alcançar algo. Mas depois deve-se jogar a escada, porque se descobre que, mesmo servindo, era privada de sentido”.

Umberto Eco

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais pelo amor, carinho, apoio, confiança e incentivo para a realização deste trabalho.

À minha irmã Juliana pelo amor, amizade e incentivo.

À professora Glaucia pela amizade e orientação.

Ao meu amigo Joaquim, pelo seu apoio, estímulo e ensinamentos para que eu cumprisse mais esta etapa. E principalmente por sua grande amizade.

À querida Berenice, que sempre me incentivou.

Ao Haroldo, pela amizade e companheirismo. E pelas inúmeras caronas de e para São Paulo!

Às amigas que conquistei nestes dois anos e meio de mestrado, Cleber, Lauro, Mario, CD, Ana Paula, Rosi, Lu Fleuri, Andréia, Biba.

A todos os meus amigos da turma 96, que sempre estiveram ao meu lado, me incentivando, me apoiando, me corrigindo.

Ao Instituto Agrônomo de Campinas – IAC, pelas cascas de café.

À Chácara Santa Adélia, pelo bagaço de uva.

À FAPESP pela bolsa concedida.

A todos da FEA, que desde 1996 tem contribuído para a minha aprendizagem, ampliação e aprimoramento de meus conhecimentos.

Cada um que passa em nossa vida
passa sozinho,
pois cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra.

Cada um que passa em nossa vida
passa sozinho,
mas não vai só,
nem nos deixa sós:
leva um pouco de nós mesmos,
deixa um pouco de si mesmo.
Essa é a maior responsabilidade em nossas vidas
e a prova evidente
de que duas pessoas não se encontram ao acaso.

Antoine de Saint-Exupéry

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	XIX
ÍNDICE DE TABELAS	XXI
RESUMO.....	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO	5
1.1. Substâncias pécticas	5
1.2. Enzimas pectinolíticas	7
1.2.1. Enzima desmetoxilante ou desesterificante	10
1.2.2. Enzimas despolimerizantes	11
1.2.2.1. Hidrolases	11
1.2.2.2. Liases.....	11
1.2.2.3. Protopectinases	12
1.3. Metabolismo microbiano da pectina.....	12
1.4. Produção de aromas por microrganismos.....	14
1.5. Compostos de aroma	15
1.5.1. Álcoois.....	16
1.5.2. Grupo benzoato	17
1.5.3. Fenilacetato.....	18
1.5.4. Cinamato.....	18
1.5.5. Butanona.....	19
1.5.6. Pirazinas	19
1.5.7. Terpenos	19
1.5.8. Lactonas.....	21
1.5.9. Ésteres.....	21
1.5.10. Compostos sulfurados	22
1.6. Utilização de resíduos agroindustriais para produção de aromas.....	23

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1. Substâncias pécicas e enzimas pectinolíticas	25
2.2. Produção de aromas de frutas por microrganismos.....	29
3. OBJETIVOS	35
4. MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1. Seleção de microrganismos pectinolíticos.....	36
4.2. Meio de cultura para determinação de atividade pectinolítica	36
4.3. Determinação de atividade pectinolítica.....	37
4.3.1. Atividade de poligalacturonase (PG).....	37
4.3.2. Atividade de pectina liase (PMGL)	38
4.4. Seleção de linhagens produtoras de aromas de frutas	38
4.5. Produção de aromas de frutas em meio contendo resíduo agroindustrial	39
4.6. Tratamento das amostras	40
4.7. Análise dos compostos de aroma formados	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	42
5.1. Seleção de microrganismos produtores de pectinases.....	42
5.2. Determinação de atividade pectinolítica.....	43
5.2.1. Atividade de poligalacturonase (PG).....	47
5.2.2. Atividade de pectina liase (PMGL)	51
5.3. Seleção de linhagens produtoras de aromas de frutas	55
5.4. Produção de aromas frutais em meio contendo resíduos agroindustriais.....	65
5.5. Separação e identificação dos compostos voláteis formados	67
6. CONCLUSÕES.....	78
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
ANEXO 1.....	103
ANEXO 2.....	107
ANEXO 3.....	113

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1. Estrutura de uma molécula de pectina	7
FIGURA 1.2. Modo de ação das pectinases em uma molécula de pectina	10
FIGURA 1.3. Esquema do metabolismo da pectina em bactérias.....	13
FIGURA 5.1. Alteração de pH do meio durante 96 horas de fermentação.....	45
FIGURA 5.2. Atividade de poligalacturonase durante 96 horas de fermentação	49
FIGURA 5.3. Atividade de pectina liase durante 96 horas de fermentação.....	53
FIGURA 5.4. Linhagem 70	57
FIGURA 5.5. Linhagem 73	59
FIGURA 5.6. Linhagem 74	61
FIGURA 5.7. Linhagem 144	63
FIGURA 5.8. Compostos formados pela linhagem 70 em meio casca de café seco.....	69
FIGURA 5.9. Compostos formados pela linhagem 73 em meio casca de café seco.....	70
FIGURA 5.10. Compostos formados pela linhagem 74 em meio casca de café seco.....	71
FIGURA 5.11. Compostos formados pela linhagem 144 em meio casca de café seco.....	72
FIGURA 5.12. Compostos formados pela linhagem 70 em meio bagaço de uva.....	73
FIGURA 5.13. Compostos formados pela linhagem 73 em meio bagaço de uva.....	74
FIGURA 5.14. Compostos formados pela linhagem 74 em meio bagaço de uva.....	75
FIGURA 5.15. Compostos formados pela linhagem 144 em meio bagaço de uva.....	76

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1.1. Classificação das enzimas pécticas.....	9
TABELA 5.1. Microrganismos pectinolíticos e correspondentes diâmetros de halos.....	43
TABELA 5.2. Variação de pH do meio durante as 96 horas de fermentação.....	44
TABELA 5.3. Unidade de atividade de PG durante as 96 horas de fermentação.....	47
TABELA 5.4. Unidades de atividades de PMGL durante as 96 horas de fermentação.....	51
TABELA 5.5. Aromas percebidos pelos provadores em meio <i>casca de café seco</i>	65
TABELA 5.6. Aromas percebidos pelos provadores em meio <i>bagaço de uva</i>	66
TABELA 5.7. Compostos voláteis separados e identificados por CG-EM e respectivos índices de Kovats (IK).....	68
TABELA 5.8. Compostos formados pela linhagem 70, meio casca de café, durante 120 horas de fermentação.....	69
TABELA 5.9. Compostos formados pela linhagem 73, meio casca de café, durante 120 horas de fermentação.....	70
TABELA 5.10. Compostos formados pela linhagem 74, meio casca de café, durante 120 horas de fermentação.....	71
TABELA 5.11. Compostos formados pela linhagem 144, meio casca de café, durante 120 horas de fermentação.....	72
TABELA 5.12. Compostos formados pela linhagem 70, meio bagaço de uva, durante 120 horas de fermentação.....	73
TABELA 5.13. Compostos formados pela linhagem 73, meio bagaço de uva, durante 120 horas de fermentação.....	74
TABELA 5.14. Compostos formados pela linhagem 74, meio bagaço de uva, durante 120 horas de fermentação.....	75
TABELA 5.15. Compostos formados pela linhagem 144, meio bagaço de uva, durante 120 horas de fermentação.....	76

RESUMO

As pectinases foram algumas das primeiras enzimas a serem utilizadas comercialmente nas preparações de vinhos e sucos de frutas na década de 1930 e seu uso tem aumentado consideravelmente, especialmente nas indústrias de alimentos, bebidas e vinhos, têxtil e de papel e celulose. Atualmente essas enzimas correspondem à cerca de 20% do mercado mundial de enzimas e são produzidas naturalmente por plantas, fungos, leveduras e bactérias. Estes microrganismos podem ser inoculados em meios contendo resíduos provenientes do processamento de produtos agrícolas, utilizados como fonte de carbono para a produção de compostos de maior valor agregado, como etanol, proteínas, enzimas, aminoácidos e compostos de aroma.

O aroma é o resultado de misturas de compostos químicos de vários grupos funcionais, como álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos, lactonas e ésteres e pode determinar a qualidade de um alimento, levando o consumidor à aceitação ou a rejeição de um produto. Sua produção por processos biotecnológicos tem grande importância devido ao aumento da preferência do consumidor por aditivos alimentares naturais ou por compostos de origem biológica.

Vários microrganismos isolados de café e de materiais relacionados com café, como casca de café, folhas de pé de café, terra de cafezal, água de lavagem de café, foram selecionados quanto à produção de enzimas pectinolíticas pelo método da placa, através de zonas claras de degradação de pectina ao redor da colônia.

Os 18 microrganismos pectinolíticos selecionados, das 104 linhagens testadas, foram inoculados em meio líquido contendo pectina como fonte de carbono e fermentados a 30°C, 100 rpm por um período de até 96 horas, para a determinação de atividade

pectinolítica de poligalacturonase (PG) e de pectina liase (PMGL). Também foram inoculados em meio frutose e extrato de levedura e fermentados a 25°C, 100 rpm por 72 horas para verificar a capacidade de produção de aromas de frutas.

As linhagens 2, 9, 20, 39, 70, 74 e 99 apresentaram unidades de atividade de PG superiores a 80 μ mol de ácido galacturônico/mL de extrato bruto enzimático/minuto e os microrganismos 17, 18, 31, 37, 73, 74 e 125 apresentaram unidades de atividade de PMGL superiores a 1000 η mol de produtos insaturados/mL de extrato bruto enzimático/minuto.

Quanto a produção de aromas frutais, os microrganismos 13, 70, 73, 74, 125 e 144 apresentaram os melhores descritores e as maiores intensidades de aromas percebidos segundo um painel não treinado de provadores.

De acordo com a capacidade de produção de pectinases e de produção de aromas frutais, as linhagens 70, 73, 74 e 144 foram selecionadas para fermentação em meio contendo casca de café seco e bagaço de uva como resíduos agroindustriais, pois foram capazes de produzir aromas a partir da degradação da pectina constituinte do resíduo, apresentando os melhores descritores e as maiores intensidades de aromas.

Em ambos os meios de cultura, os compostos voláteis formados apresentaram descrições como frutal, doce, floral, fermento, ácido, solvente. Foram separados e identificados por cromatografia gasosa e espectrometria de massas como acetona, acetato de etila, etanol, isobutanol, álcool isopentílico (álcool amílico), acetoína (2-butanona-3-hidroxi), ácido acético, ácido isobutírico, ácido butírico, ácido 2-metil butanóico, álcool benzílico e 2-feniletanol produzidos em diferentes combinações e em diferentes concentrações pelos quatro microrganismos selecionados, durante as 120 horas de fermentação.

ABSTRACT

Pectinases were some of the first enzymes used in commercial applications of wines and fruit juices since 1930 and their use has increased considerably, specially in food, brewery and wine, textile, pulp and paper industries. Today, these enzymes account for approximately 20% of the world enzyme market. Plants, fungi, yeasts, and bacteria naturally produce these enzymes. These microorganisms can be inoculated in a medium containing agro-industrial residues from processing agricultural products, used as carbon source for the production of value-added products such as ethanol, enzymes, proteins, amino acids and flavor compounds.

Flavor is the result of combination of chemical compounds and several functional groups such as alcohols, acids, aldehydes, ketones, lactones and esters. It can determine the quality of food and lead to consumer acceptance or rejection of a product. The flavor compounds synthesis by biotechnological processes play an important role due to an increasing consumer preference natural food additives and other compounds from biological origin.

Several microorganisms isolated from coffee seeds and leaves, soil taken from plantations and waste water from the coffee seeds washing process due to their capacity to produce pectinolytic enzymes in clear halos around colonies by plate assay.

From 104 strains 18 strains were inoculated in medium containing pectin as carbon source and were fermented at 30°C and 100 rpm for 96 hours to determine pectinolytic activity of polygalacturonase (PG) and pectin lyase (PMGL). These microorganisms were inoculated in medium containing fructose and yeast extract and were fermented at 25°C and 100 rpm to verify the capacity of flavor compound production.

The strains 2, 9, 20, 39, 70, 74, and 99 showed activity units of PG higher than 80 μmol galacturonic acid/mL/minute and strains 17, 18, 31, 37, 73, 74 and 125 showed activity units of PMGL higher than 1000 ηmol unsaturated products/mL/minute. The microorganisms 13, 70, 73, 74, 125 and 144 showed good descriptors of flavor perceived and the most intensities of flavor according non trained painel listing. The microorganisms 70, 73, 74, and 144 were selected to perform fermentation in medium containing coffee husk and grape bagasse at 25°C and 100 rpm for 120 hours, because these microorganisms are able to produce flavor by pectin degradation.

In the both media, the flavor compounds showed descriptors as frutal, sweet, floral, ferment, acid and solvent. The compounds were separated and identified by gas chromatography and mass spectrometry. Acetone, ethyl acetate, ethanol, isobutanol, isopentyl alcohol (amyl alcohol), acetoin (3-hydroxi-2-butanone), acetic acid, isobutyric acid, butyric acid, 2-methyl-butanoic acid, benzyl alcohol and 2-phenyl ethanol were produced in different combinations and different concentrations by the 4 microorganisms.

1. INTRODUÇÃO

1.1. SUBSTÂNCIAS PÉCTICAS

Substâncias pécticas são macromoléculas glicosídicas de alto peso molecular que formam o maior componente da lamela média das paredes primárias de células de vegetais superiores (Alkorta et al., 1998). Quimicamente são um complexo coloidal de polissacarídeos ácidos, composto de resíduos de ácido galacturônico unidos por ligações α -1,4, parcialmente esterificados por grupos metil (Villariño et al., 1993; Limberg et al., 2000b; Kashyap et al., 2001) e parcial ou completamente neutralizadas por uma ou mais bases (íons sódio, potássio ou amônio) (McCready, 1970; Sakai et al., 1993; Kashyap et al., 2001).

As substâncias pécticas são insolúveis em muitos solventes orgânicos. São solúveis em água, dimetilsulfóxido, formamida e glicerol (quente). A solubilidade em água diminui com o aumento do grau de polimerização e muitas vezes é precedida por um lento intumescimento. Soluções aquosas de 1 a 2% (p/v) tem viscosidade relativamente alta, proporcional à massa molecular e também é influenciada pelo grau de esterificação, força iônica, pH e temperatura. Em soluções alcalinas, a baixas temperaturas ocorre saponificação dos grupos metil éster e, a altas temperaturas ocorre despolimerização do polissacarídeo (Sakai et al., 1993).

A Sociedade Americana de Química (American Chemical Society) classificou as substâncias pécticas em: protopectina, ácido pectínico, ácido péctico e pectina, sendo estes três últimos total ou parcialmente solúveis em água (Alkorta et al., 1998; Kashyap et al., 2001).

Protopectina é insolúvel em água, é a forma nativa unida com outros constituintes das células vegetais (Whitaker, 1994) e em condições de hidrólise restrita produzem ácidos pectínicos ou pectina (McCready, 1970; Maiorano, 1990; Sakai et al., 1993; Kashyap et al., 2001). **Ácido péctico** é uma designação aplicada a substâncias pécticas compostas de ácido poligalacturônico coloidal (Sakai et al., 1993; Kashyap et al., 2001) onde os grupos carboxilas estão essencialmente livres de grupos metil éster (Sakai et al., 1993; Whitaker, 1994; Kashyap et al., 2001) e seus sais são pectatos neutros ou ácidos (McCready, 1970; Maiorano, 1990). **Ácido pectínico** é um grupo de compostos contendo ácido poligalacturônico coloidal com poucos grupos metil éster (McCready, 1970; Sakai et al., 1993; Whitaker, 1994) e em condições adequadas são capazes de formar géis com açúcares e ácidos e, se o conteúdo de metoxilas for apropriadamente baixo, com certos íons. Seus sais são pectinatos normais ou ácidos (McCready, 1970).

O termo geral **pectina** (figura 1.1) designa ácidos pectínicos solúveis em água, com grau variável de grupos metil éster e um grau de neutralização capaz de formar gel com açúcares e ácidos em condições adequadas (Sakai et al., 1993). Consiste em uma estrutura de ligações axiais de unidades de ácido α -1,4-D-galacturônico e contém moléculas de L-ramnose, arabinose, galactose e xilose como correntes laterais (Alkorta et al., 1998; Lang & Dörnenburg, 2000) e os grupos carboxila do ácido galacturônico são parcialmente esterificados por grupos metil (Alkorta et al., 1998).

A forma nativa da pectina está localizada nas paredes celulares dos vegetais e pode estar interligada com outros polissacarídeos estruturais e proteínas para formar as protopectinas insolúveis (Kashyap et al., 2001).

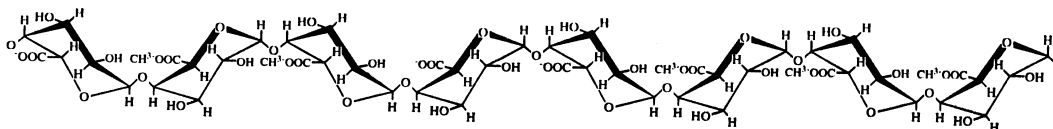


FIGURA 1.1. Estrutura de uma molécula de pectina. Não estão incluídos resíduos de galactose, arabinose e xilose (Alkorta et al., 1998).

1.2. ENZIMAS PECTINOLÍTICAS

As pectinases foram uma das primeiras enzimas a serem utilizadas comercialmente nas preparações de vinhos e sucos de frutas ao redor de 1930 (Bhat, 2000; Kashyap et al., 2001). Durante as duas últimas décadas, o uso de celulases, hemicelulases e pectinases têm aumentado consideravelmente, especialmente nas indústrias de alimentos, bebidas e vinhos, têxtil e de papel e celulose (Bhat, 2000). Entretanto, uma enzima torna-se de valor comercial somente se houver demanda ou possuir propriedades que atendam aos requerimentos técnicos e econômicos do processo em escala industrial (Bravo et al., 2000).

As substâncias pécticas podem ser degradadas por enzimas pectinolíticas, produzidas em diferentes combinações pelas plantas e por microrganismos como fungos, leveduras e bactérias (Sakai et al., 1993; Gainvors et al., 1994), muito utilizadas nas indústrias de sucos de frutas, vegetais e vinhos, para melhorar a extração de óleos e no tratamento e degomagem de fibras da indústria têxtil (Taragano & Pilosof, 1999; Zeng & Shetty, 2000; Blandino et al., 2001; Lima et al., 2002).

A combinação de pectinases, celulases e hemicelulases, chamadas coletivamente de enzimas de maceração, são usadas na extração e clarificação de sucos de frutas e vegetais

para aumentar o rendimento e melhorar o processamento sem o aumento de custos. São empregadas em duas etapas: (1) após corte, para macerar a polpa até a liquefação parcial ou total da fruta para aumentar o rendimento, diminuir o tempo de processamento e melhorar a extração dos componentes da fruta e (2) após a extração, pectinases são aplicadas para clarificação, diminuir a viscosidade para posterior concentração e filtração e estabilidade do produto final (Bhat, 2000; Bravo et al., 2000).

Outras aplicações de pectinases incluem: redução de amargor excessivo em cascas de citrus, restaurar o aroma perdido durante secagem e melhorar a firmeza de pêssego e pickles processados (Bhat, 2000).

A habilidade para sintetizar enzimas pectinolíticas é muito comum entre os grupos de microrganismos e são preferidos em escala industrial, pois cerca de 90% das enzimas produzidas podem ser secretadas no meio de cultura (Blandino et al., 2001; Bravo et al., 2000). Uma grande variedade de bactérias (*B. polymyxa*, *Erwinia* ssp, *E. carotovora*, *Ps. syringae*), leveduras (*Kl. fragilis*, *Kl. marxianus*) e de fungos (*Aspergillus niger*, *Trichoderma lignorum*, *T. reesei*, *T. harzianum*, *T. longibrachiatum*, *T. viride*) são conhecidos como bons produtores de enzimas pectinolíticas (De Gregório et al., 2002). A síntese destas enzimas sofre a influência dos componentes do meio de crescimento, particularmente da fonte de carbono (tipo e concentração), pela presença de indutores (pectina e derivados) (Blandino et al., 2001), pH e temperatura de cultivo (Bravo et al., 2000). Substratos típicos são resíduos agroindustriais como cascas de frutas cítricas, bagaço de beterraba doce e extratos de farelo de trigo (Blandino et al., 2001) que podem ser aproveitados desde que se escolha o microrganismo apropriado ou adaptado para a finalidade desejada (Bravo et al., 2000).

A classificação das enzimas pécticas está baseada no ataque ao esqueleto galacturônico (Alkorta et al., 1998), pela preferência de substrato (pectina, ácido péctico ou protopectina), ação por transeliminção ou hidrólise e por clivagem randômica (endoenzima ou despolimerizante) ou terminal (exoenzima) (Sakai et al., 1993; Zeng & Shetty, 2000; Kashyap et al., 2001).

Existem basicamente três tipos de pectinases (figura 1.2): **pectina esterase** (desesterificante ou desmetoxilante) que remove os grupos metil éster, as **despolimerizantes** que incluem as enzimas hidrolíticas e as liases e as **protopectinases** que solubilizam protopectina para formar pectina (Sakai et al., 1993). Estas enzimas foram classificadas e nomeadas de acordo com a Enzyme Commission (EC), segundo as recomendações da IUPAC-IUB (tabela 1.1.).

TABELA 1.1. Classificação das enzimas pécticas.

Tipo de pectinase		Nome sugerido pela EC	Sigla	Nome comum	Número EC
desesterificante		polimetilgalacturonase esterase	PMGE	pectina esterase	3.1.1.11
Despolimerizante	hidrolase	endo poligalacturonase	endo-PG	poligalacturonase	3.2.1.15
		exo poligalacturonase 1	exo-PG 1	poligalacturonase	3.2.1.67
		exo poligalacturonase 2	exo-PG 2	poligalacturonase	3.2.1.82
		endo polimetilgalacturonase	endo-PMG	pectina hidrolase	
	liase	exo polimetilgalacturonase	exo-PMG	pectina hidrolase	
		endo poligalacturonase liase	endo-PGL	pectato liase	4.2.2.2
		exo poligalacturonase liase	exo-PGL	pectato liase	4.2.2.9
		endo polimetilgalacturonato liase	endo-PMGL	pectina liase	4.2.2.10
		exo polimetilgalacturonato liase	exo-PMGL	pectina liase	

Pectinases que atuam sobre oligogalacturonatos não estão incluídas na tabela porque não são muito abundantes e possuem pouco interesse industrial na degradação de pectina.

Fonte: Alkorta et al., 1998.

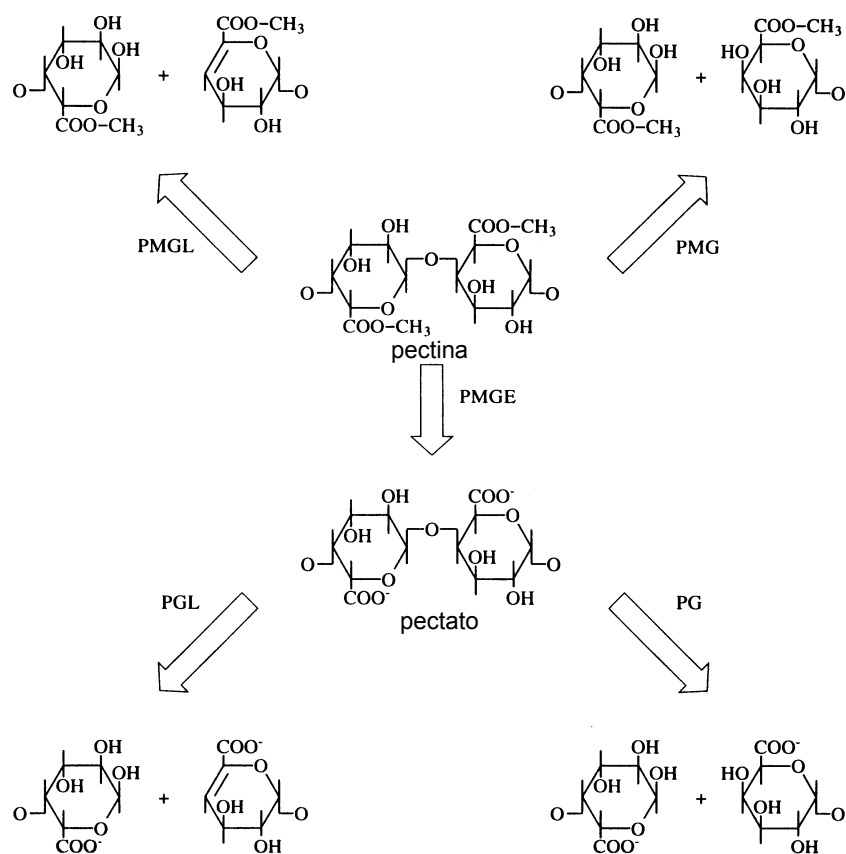


FIGURA 1.2. Modo de ação das pectinases em uma molécula de pectina. PMGL: polimetilgalacturonato liase. PMG: polimetilgalacturonase. PMGE: polimetilgalacturonato esterase (pectina esterase). PGL: poligalacturonato liase (pectato liase). PG: poligalacturonase (Alkorta et al., 1998).

1.2.1. ENZIMA DESMETOXILANTE OU DESESTERIFICANTE

A **pectina esterase** (polimetilgalacturonato esterase, PMGE) catalisa a hidrólise dos grupos metil éster da pectina, liberando metanol e pectato (Alkorta et al., 1998; Shen et al., 1999). Estão presentes em praticamente todas as preparações enzimáticas comerciais e podem estar envolvidas em mudanças das substâncias pécicas durante o amadurecimento, estocagem e processamento de frutas e vegetais (Alkorta et al., 1998). Geralmente iniciam o ataque na posição adjacente ao do grupo carboxila livre (Whitaker, 1994).

1.2.2. ENZIMAS DESPOLIMERIZANTES

As enzimas despolimerizantes são classificadas de acordo com a clivagem hidrolítica (hidrolases) ou transeliminativa (liases) das ligações glicosídicas; mecanismos endo- (randômica) ou exo- (a partir do final da molécula) de ação e preferência por ácido pécico ou pectina como substrato. Envolvem as hidrolases (catalisam a hidrólise de ligações α -1,4) e as liases (catalisam β -eliminação) (Gainvors et al., 1994; Alkorta et al., 1998).

1.2.2.1. HIDROLASES

As hidrolases incluem as polimetilgalacturonases e as poligalacturonases, podem apresentar ação endo- (hidrólise randômica) ou exo- (hidrólise sequencial) (Kashyap et al., 2001).

A **polimetilgalacturonase** (PMG) presumivelmente hidrolisa ligações α -1,4 de polimetilgalacturonatos (Rizzatto, 1999). Apesar de ser citada em algumas literaturas, sua existência é questionada por alguns autores (Sakai et al., 1993; Rizzatto, 1999).

A **poligalacturonase** (PG) hidrolisa α -1,4 ligações glicosídicas entre dois resíduos do ácido pécico (Mutlu et al., 1999). As poligalacturonases fúngicas são úteis pela alta atividade enzimática e possuir pH ótimo de atividade na região levemente ácida (Zheng & Shetty, 2000).

1.2.2.2. LIASES

As **liases**, também chamadas transeliminases, rompem ligações glicosídicas resultando em galacturonídeos com uma ligação insaturada entre os carbonos 4 e 5 do final não redutor do ácido galacturônico formado (Kashyap et al., 2001). Podem apresentar ação endo- (hidrólise randômica) ou exo- (hidrólise sequencial) (Kashyap et al., 2001).

A **pectina liase** (polimetilgalacturonato liase, PMGL) quebra as ligações por transeliminação do hidrogênio dos carbonos das posições 4 e 5 da porção aglicona do substrato (pectina) (Gainvors et al., 1994; Whitaker, 1994; Karam & Belarbi, 1995).

A **pectato liase** (poligalacturonato liase, PGL) catalisa a clivagem de ligações α -1,4 de ácido pécico (Kashyap et al., 2001) e requerem Ca^{2+} para atividade (Sakai et al., 1993; Mayans et al., 1997).

1.2.2.3. PROTOPECTINASES

Esta enzima solubiliza protopectina liberando pectina altamente polimerizada e solúvel (Alkorta et al., 1998; Kashyap et al., 2001). São classificadas em dois tipos: o tipo A reage com a região de ácido poligalacturônico da protopectina e a do tipo B reage com as cadeias de polissacarídeos que podem se conectar com as cadeias de ácido poligalacturônico e os constituintes das paredes celulares (Alkorta et al., 1998).

1.3. METABOLISMO MICROBIANO DA PECTINA

O metabolismo de pectina por fungos é muito pouco conhecido, mas o metabolismo de bactérias tem sido muito estudado. A degradação bacteriana de poligalacturonatos leva a produção de ácido D-galacturônico e ácido 4-deoxi-L-treo-5-hexoseulose urônico, metabolizados pelas vias metabólicas Entner-Doudoroff e pelo ciclo do ácido tricarboxílico (Maiorano, 1990), mostradas na figura 1.3.

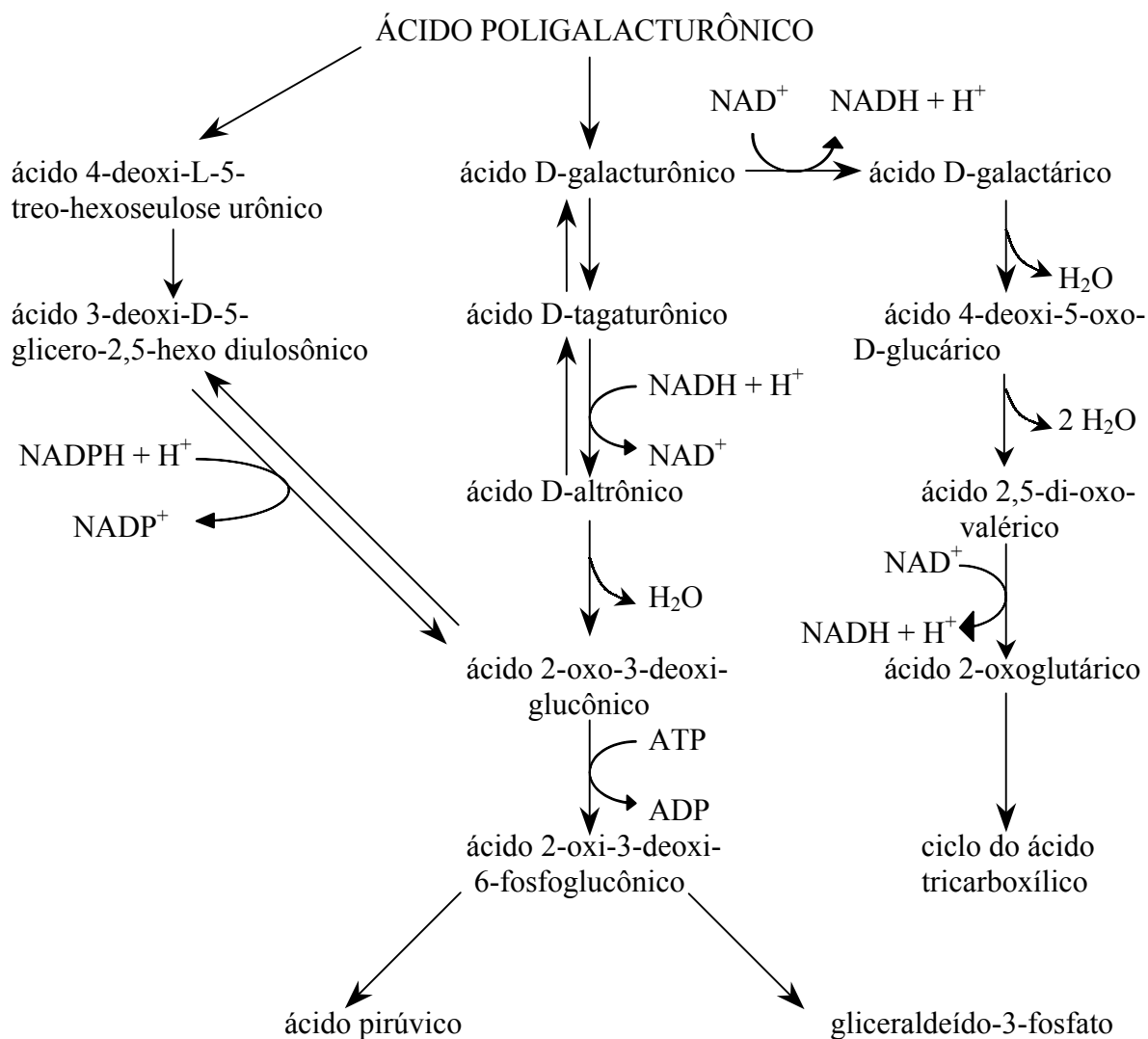


FIGURA 1.3. Esquema do metabolismo da pectina em bactérias (Maiorano, 1990).

1.4. PRODUÇÃO DE AROMAS POR MICRORGANISMOS

O aroma é conhecido como um fator importante na determinação da qualidade do gosto e do sabor de um alimento (Linthorpe et al., 1999). Sua percepção é um processo dinâmico de uma série de eventos (Piggott, 2000) e leva o consumidor à aceitação ou a rejeição de um produto (Mestres et al., 2000).

Muitos compostos de aroma são produzidos via síntese química ou pela extração do material natural, das quais as plantas são a maior fonte de óleos essenciais e aromas, mas o seu uso depende da dificuldade de fatores de controle como as condições do tempo e pragas em plantas. Uma maneira alternativa na produção de aromas está baseada na biossíntese microbiana ou bioconversão (Kempler, 1983; Janssens et al., 1992; Soares et al., 2000; Pandey et al., 2000a). Compostos de aroma e fragrâncias obtidos por processos biotecnológicos têm grande importância na indústria de alimentos, de cosméticos, química e farmacêutica devido ao aumento da preferência do consumidor por aditivos alimentares naturais e outros compostos de origem biológica (Janssens et al., 1992; Medeiros et al., 2000; Huang et al., 2001).

A maioria dos aromas naturais é o resultado de misturas de compostos químicos, biologicamente ativos, apresentando estruturas complexas de vários grupos funcionais, encontrados em baixas concentrações. Os compostos químicos responsáveis pelos aromas característicos são álcoois, ácidos, ésteres, cetonas, lactonas, aldeídos (Gómez et al., 1994; Marques, 1998; Rosillo et al., 1999) e outras moléculas complexas que resultam do metabolismo secundário de plantas ou podem ser obtidas de fontes animais. Certos fungos, leveduras e bactérias também possuem potencial para o metabolismo secundário e podem produzir aromas e fragrâncias (Marques, 1998). Fungos do gênero *Ceratocystis* produzem

uma grande quantidade de aromas de frutas ou de flores (pêssego, abacaxi, banana, citrus e rosa), dependendo da cepa e das condições de cultivo. *Ceratocystis frimbriata* tem potencial para síntese de éster, cresce rapidamente e produz uma grande variedade de aromas (Soares et al., 2000; Pandey et al., 2000a).

1.5. COMPOSTOS DE AROMA

Muitos microrganismos são capazes de sintetizar compostos de aroma quando cultivados em meios de culturas adequados, demonstrando sua habilidade de conversão, que podem necessitar de diversas etapas químicas (Kempler, 1983).

Vários compostos voláteis de aromas foram identificados a partir da introdução e melhoramento de diversas técnicas instrumentais em química orgânica, como cromatografia gasosa e espectrometria de massa (Janssens et al., 1992).

Uma estratégia eficiente para detecção de compostos de aroma, segundo Ferreira et al. (2002), seria classificá-los atendendo-se a acessibilidade analítica das moléculas ativas de odor nas seguintes categorias:

Categoria 1: compostos facilmente acessíveis do ponto de vista analítico. Este grupo compreende compostos presentes em níveis relativamente altos (acima de 1mg/mL) que podem ser determinados após um simples isolamento e análise em cromatografia gasosa com detector de ionização de chama. Acetaldeído, álcoois superiores e alguns acetatos, ácidos graxos e etil ésteres são exemplos típicos.

Categoria 2: compostos de acessibilidade analítica intermediária. A análise destes compostos é possível após isolamento e pré-concentração e então se faz a cromatografia gasosa e espectrometria de massa. São compostos com bom comportamento cromatográfico e concentração entre 0,1 µg/L e 0,1 mg/L. Neste grupo estão fenóis voláteis, algumas

lactonas, derivados de vanilina, alguns ésteres minoritários e alguns isoprenóides como β -damascenona e β -ionona.

Categoria 3: compostos de acessibilidade analítica difícil. É um grupo heterogêneo formado por compostos cuja análise é muito difícil devido ao mau comportamento cromatográfico e baixa estabilidade química. Compostos voláteis sulfurosos, aldeídos, alquil metoxipirazinas, furaneol e sotolon e alguns tióis aromáticos são desta categoria. A análise destes compostos requer o desenvolvimento de métodos específicos de isolamento, detecção ou uso de derivação química.

Os diversos grupos de aroma estão representados a seguir.

1.5.1. ÁLCOOIS

Álcoois primários e secundários são compostos de aroma importantes em alimentos. 2-metilpropanol e 3-metilbutanol são derivados da redução de aldeídos provenientes dos aminoácidos valina e leucina pela degradação de Strecker. Etanol, derivado de lactato pela via das pentoses-fosfato, tem função aromática limitada em queijos e apesar de ser encontrado em grandes quantidades, é o precursor de diversos ésteres. Metil cetonas são reduzidas a seus álcoois secundários correspondentes, sendo o 2- heptanol e 2-nonanol os mais freqüentes.

O 1-octen-3-ol (aroma de cogumelo), juntamente com o 3-octanona, são originários dos ácidos linoleico e linolênico, biossintetizados por reações catalisadas enzimas em presença de oxigênio atmosférico (Larsen, 1998). Álcoois amílicos (2- e 3-metilbutanol) causam aromas frutados em concentrações de 50 mg/L para o 2-metilbutanol e 1 mg/L para o 3-metilbutanol (Smogrovicová & Dömeny, 1999).

Caracterizado por uma delicada fragrância de pétalas de rosas, o 2-feniletanol, seguido de álcool etílico, é muito utilizado como aromas nas indústrias de alimentos e como fragrância nas indústrias de cosméticos e perfumes. Também são muito usados para modificar a composição de aroma de alimentos com formulações aromáticas frutais, sorvetes, balas, pudins e gomas de mascar (Huang et al., 2001).

1.5.2. GRUPO BENZOATO

A **vanilina** (3-metoxi-4-hidroxibenzaldeído) é um composto muito usado como agente aromatizante em alimentos e em algumas fragrâncias. Por muito tempo, a mais importante fonte de vanilina era o eugenol (principal componente do cravo), de custo elevado comparado com o da vanilina sintética. Com o aumento do interesse por produtos naturais, processos alternativos têm sido desenvolvidos, como métodos biotecnológicos envolvendo fungos como *Sporotrichum pulverulentum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Pycnoporus cinnabarinus* e *Pseudomonas fluorescens* para a produção de vanilina (Lomascolo et al., 1999).

Pela quantidade, o **benzaldeído** (odor de amêndoa) é a segunda maior molécula de aroma mais importante usada em indústrias de fragrâncias e de cosméticos, porém a sua extração natural leva a formação de produtos indesejáveis como o ácido ciânico e cianeto de hidrogênio. A bioconversão de precursores naturais apropriados, geralmente L-fenilalanina, oferece uma rota alternativa para a biossíntese de benzaldeído por espécies de *Ischnoderma benzoinum*, *Bjerkandera adusta* e *Polyporus tuberaster* (Lomascolo et al., 1999).

Antranilato de metila (ácido o-aminobenzóico metil éster) é um aroma característico de uvas, identificado em diversos óleos essenciais, obtido por bioconversão

de N-metil antranilato por espécies de *Trametes* e *Polyporus*, porém o processo é de custo elevado e produz compostos indesejáveis, sendo substituído por ácido antranílico, encontrado na hidrólise ácida de caseína e peptona (Lomascolo et al., 1999).

p-hidroxibenzaldeído é um componente típico de extrato de fava de baunilha, contribuindo para o aroma natural e original de baunilha. Alguns gêneros de *Phellinus* são capazes de sintetizar derivados de benzoato como benzoato de metila e ésteres de etila (aroma de frutas), p-tolualdeído (aroma de amêndoa), anisato de metila e salicilato de metila (aroma de anis), acetofenona, p-metilcetofenona e álcool p-metilbenzil (aromas frutado e de florescência de laranja) (Lomascolo et al., 1999).

1.5.3. FENILACETATO

Metil fenilacetato e etil ésteres estão associados com odores de frutas e podem ser quimicamente sintetizados. Traços de fenilacetaldeído (odor de jacinto) têm sido encontrados em culturas de *Agaricus bisporus* e fenilacetato metil éster em culturas de *Sarcodontia setosa* e *Trametes odorata* e 2-feniletanol pode ser formado por bioconversão de precursores apropriados como asparagina ou L-fenilalanina (Lomascolo et al., 1999).

1.5.4. CINAMATO

Cinamaldeído (aroma de canela), cinamato metil éster (odor de rosa) e álcool cinamílico (odor de jacinto) podem ser sintetizados por diversos microrganismos como espécies de *Polyporus* e cepas de *Lentinus lepideus*, que transformam metil p-coumarato para p-metioxicinamato metil éster na presença de metionina (Lomascolo et al., 1999).

1.5.5. BUTANONA

Dentre os compostos do tipo butanona, a framboesa cetona (aroma de framboesa), fenil butan-2-ona (odor de flor) e gingerona (aroma de gengibre) são muito usados nas indústrias de aromas. A framboesa cetona pode ser sintetizada quimicamente pela condensação de acetona e p-hidroxibenzaldeído e sua produção biotecnológica pode ser significativa por espécies de *Nidularia* quando cultivadas em meio nutriente peptona (Lomascolo et al., 1999). Diacetil e pentan-2,3-diona (dicetonas vicinais) têm aromas e sabores característicos descritos como amanteigado, de mel ou de café e são percebidos à concentração de 0,1-0,14 mg/L, em concentrações acima de 1 mg/L, o aroma percebido é de queijo (Smogrovicová & Dömeny, 1998).

1.5.6. PIRAZINAS

As pirazinas são compostos heterocíclicos contendo nitrogênio, e que contribuem significativamente no aroma de muitos alimentos, dando características de assado ou nozes e de sementes de café ou cacau. Normalmente estes compostos são formados através de reação de Maillard, mas também foram isolados de vegetais, apresentando aroma de ervilha ou de verde (Kempler, 1983; Janssens et al., 1992). Algumas pirazinas utilizadas como agentes de aroma são 3-metoxi-isopropil-pirazina (aroma de ervilha, batata), 2-metoxi-3-isobutil-pirazina (aroma de pimenta), 2,5-dimetil-pirazina (aroma de nozes) (Kempler, 1983).

1.5.7. TERPENOS

Terpenos e seus derivados, os terpenóides, são a mais diversa classe de substâncias na natureza, extensivamente aplicados em indústrias como compostos de aroma e de fragrâncias (Schrader & Berger, 2001) e os maiores constituintes responsáveis pelas

características odoríferas de óleos essenciais. Como os terpenos são facilmente oxidados e polimerizados, devem ser removidos dos óleos essenciais (Kempler, 1983; Janssens et al., 1992), pois podem causar off-flavors indesejáveis e precipitação (Schrader & Berger, 2001).

Microrganismos como *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Aspergillus* e *Penicillium*, possuem grande capacidade de biossíntese *de novo* e de biotransformação e bioconversão de precursores de terpenos (Schrader & Berger, 2001). Gêneros de *Ceratocystis* têm sido muito pesquisados e os terpenos mais importantes produzidos por cepas deste microrganismo são citronelol (aroma de rosa), geraniol (aroma de rosa, doce), linalol (aroma doce, citrus, floral), nerol (aroma doce, floral, rosa), α -terpineol (aroma doce, floral, frutal) (Kempler, 1983; Janssens et al., 1992).

Monoterpenos dióis têm sido identificados em uva e mostos de vinho. Em uvas, estes compostos foram classificados em três categorias:

Categoria 1: compostos livres do aroma, comumente dominados por linalool, geraniol e nerol, juntamente com pirano e furano, formas oxidadas do linalool. Dependendo do tratamento do suco da uva, podem ser encontrados neste grupo o citronelol, α -terpineol, ho-trienol, nerol óxido, mircenol e orcimol, juntamente com outros óxidos, aldeídos e hidrocarbonetos.

Categoria 2: formas polihidroxiladas dos monoterpenos ou polióis livres do aroma, que não contribuem diretamente com o aroma, sendo que alguns deles são reativos e podem romper-se em compostos mais voláteis, por exemplo o diendiol (3,7-dimetilocta-1,5-dien-3,7-diol) pode formar ho-trienol e nerol óxido.

Categoria 3: monoterpenos glicosilados, que também não contribuem diretamente com o aroma e são mais abundantes que as formas não glicosiladas e os polióis (Mateo & Jiménez et al., 2000).

1.5.8. LACTONAS

Os isômeros *cis* e *trans* da furanona, conhecidos como lactona de carvalho ou uísque lactona, são componentes naturais do carvalho, extraídos pelo vinho durante a maturação em barris de carvalho (Raunkjaer et al., 2001). São compostos agradáveis utilizados pelas indústrias de aromas (Kempler, 1983), associadas com odores como frutal, de coco, amanteigado, doce ou de nozes (Kempler, 1983; Janssens et al., 1992).

Candida, *Saccharomyces*, *Penicillium notatum*, *Cladosporium butyri*, *Cl. suaveolens* e *Sarcina lutea* produziram lactonas quando cultivadas em meio contendo ceto-ácidos (Kempler, 1983). *Trichoderma viride* é capaz de produzir 6-pentil-2-pirona (aroma de coco) e *Sporobolomyces odoratus* é uma levedura que produz 4-decalactona (aroma de pêssego) por síntese *de novo* (Janssens et al., 1992).

1.5.9. ÉSTERES

Os ésteres são um grupo de compostos de aroma importante em frutas, presentes consideravelmente em baixas concentrações, geralmente entre 1 e 100 ppm, podendo ser sintetizados por microrganismos, gerando aroma de maçã, pêra, abacaxi, morango e melão (Kempler, 1983).

Ésteres acetato, como acetato de etila, acetato de hexila, acetato de isoamila e acetato de 2- feniletila, são reconhecidos como compostos importantes em aroma de vinho e em outras bebidas alcoólicas derivadas de uvas (Rojas et al., 2001). Butirato de etila, isovalerato de etila e hexanoato de etila, responsáveis por aromas frutais, são produzidos

por culturas de *Pseudomonas*, que em queijos e leites são considerados indesejáveis (Kempler, 1983; Janssens et al., 1992).

1.5.10. COMPOSTOS SULFURADOS

Em geral, o aroma de alimentos e bebidas é influenciado por diversos compostos diferentes, dentre eles, as estruturas contendo enxofre, uma classe importante de compostos químicos devido ao seu caráter de impacto e à sua abundância (cerca de 10% dos compostos voláteis detectados em alimentos e bebidas) (Mestres et al., 2000). As propriedades sensoriais dependem da posição do átomo de enxofre na molécula e da concentração, apesar de baixas concentrações destes compostos poderem gerar altas intensidades de odor. Alguns destes compostos, como dimetil sulfito, metionol, metional, 4-metiltio-1-butanol, têm sido identificados como aromas de impacto favoráveis em alimentos e bebidas como carne, café, milho, laranja, maracujá, trufas, espécies de alho e cerveja. Algumas vezes estes compostos sulfurados são responsáveis por odores desagradáveis (off-flavors) e sua presença indica condições desfavoráveis de preparo ou armazenamento (Mestres et al., 2000).

Os compostos sulfurados em vinhos são classificados em duas categorias, de acordo com o ponto de ebulição: os compostos altamente voláteis (ponto de ebulição inferior a 90°C) e os compostos menos voláteis (ponto de ebulição superior a 90°C). Sulfito de hidrogênio, etanetiol e metanetiol estão entre os compostos altamente voláteis, presentes em vinhos em concentrações maiores que o threshold, caracterizando odor de ovos podres, alho, cebola e repolho, mas não apresentam problemas no vinho, pois são volatilizados rapidamente e dimetil sulfito contribui para o buquê de vinhos (Moreira et al., 2002).

Entre os compostos menos voláteis, 3-metiltio-1-propanol (metionol) em concentrações acima do threshold contribui com odor de couve-flor. Outros compostos sulfurados menos voláteis encontrados em vinhos em concentrações abaixo do threshold estão 2-mercaptoetanol (odor de aves), 2-metil-tetrahidrotiofeno-3-ona (odor metálico, gás natural), 2-metiltioetanol (feijão francês), etil-3-metiltiopropionato (odor metálico, de enxofre), ácido acético-3-metiltiopropiléster (batatas cozidas) e 4-metiltiobutanol (cebolinha) (Moreira et al., 2002).

1.6. UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA PRODUÇÃO DE AROMAS

A economia brasileira é uma das mais importantes economias do mundo baseadas na agricultura, produzindo e exportando café, açúcar de cana, soja, mandioca, frutas, entre outros, o que significa uma ótima contribuição para o desenvolvimento da economia. Entretanto, a grande produção desses materiais agrícolas gera uma grande quantidade de resíduos (Soccol & Vandenberghe, 2003). Nos últimos anos houve um aumento na tentativa de tornar mais eficiente a utilização desses resíduos cuja disposição no meio ambiente causam sérios problemas de poluição. Uma das aplicações em potencial desses resíduos pode ser a sua utilização como fonte de carbono em bioprocessos para obtenção de produtos químicos e de produtos de maior valor agregado como etanol, proteínas, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos, metabólitos secundários biologicamente ativos e compostos de aroma (Medeiros et al., 2000; Soccol & Vandenberghe, 2003).

Resíduos de processamento de café estão sendo utilizados como substrato para a produção de compostos de aroma por fungos e leveduras para a aplicação na indústria de alimentos. As leveduras cultivadas em resíduos de café possuem a capacidade de produzir

um forte aroma alcoólico com notas frutais, devido à presença de compostos como etanol, acetaldeído, acetato de etila, isobutanol, acetato de isobutila, etil-3-hexanoato e acetato de isoamila (Pandey et al., 2000c). Resíduos de processamento de café, ricos em pectina, podem ser utilizados por microrganismos capazes de sintetizar enzimas pectinolíticas para degradar a pectina presente no meio e utilizá-la como substrato para a produção de aromas frutais.

Ceratocystis fimbriata produz intenso aroma de fruta em meio de fermentação composto de farelo de trigo, bagaço de cana e de mandioca (Medeiros et al., 2000) e aroma de abacaxi foi obtido em meio contendo bagaço de mandioca, polpa de maçã e amaranto (Pandey et al., 2000a). *Rhizopus oryzae* foi capaz de produzir compostos voláteis como acetaldeído e 3-metil butanol em resíduos agroindustriais tropicais (Medeiros et al., 2000).

Com o advento da inovação biotecnológica, principalmente na área de enzimas e tecnologia das fermentações, novas perspectivas estão sendo criadas (Brand et al., 2000). Casca e polpa de café tem grande potencial para utilização como substrato em bioprocessos e na obtenção de produtos de maior valor agregado. A aplicação de resíduos de agroindústrias em bioprocessos é uma forma de utilizar substratos alternativos e, de alguma maneira, solucionar problemas de poluição que possam causar (Pandey et al., 2000b).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. SUBSTÂNCIAS PÉCTICAS E ENZIMAS PECTINOLÍTICAS

Hennies (1996) obteve melhores atividades de pectinase por *P. italicum* em fermentação semi-sólida utilizando bagaço de laranja peletizado obtido de indústria de citrus, a pH 4,5 e temperatura de cultivo de 45°C. Essa atividade aumentava com a adição de sacarose tanto em fermentação submersa quanto em semi-sólida.

Rizzatto (1999) utilizou bagaço de laranja industrializado lavado e não lavado para a produção de pectinases por *P. italicum* e *A. niger*. Observou que a concentração de açúcares pré-existentes no bagaço não lavado permitiu maior crescimento micelial e maior produção de enzimas.

Soares et al. (1999) selecionaram cepas de *Bacillus* sp pelo método da placa através de zona clara ao redor da colônia para identificar os microrganismos pectinolíticos. A atividade pectinolítica de poligalacturonase foi máxima a pH 6,0 e temperatura ótima entre 40° e 55°C. Observaram que praticamente não havia mudanças de estabilidade enzimática com a variação de temperaturas abaixo de 50°C e variações de pH entre 6 e 8.

Cepas de *Rhizopus* sp, *Phanerochaete* sp e de *Aspergillus* sp foram isoladas e selecionadas de acordo com a capacidade de crescimento em ágar extrato de casca de café proposto por Brand et al. (2000), mostrando sua resistência a fatores tóxicos presentes no meio, como cafeína, taninos e polifenóis. Os melhores resultados da degradação de cafeína e de taninos foram obtidos em pH entre 5,5 e 6,0 e umidade entre 60 e 65%. A suplementação do meio com solução de nutrientes não mostrou qualquer influência na velocidade de detoxificação dos compostos nem no crescimento microbiano, mostrando

que não é necessário enriquecer o meio de cultura, e que a própria casca do café contém minerais necessários para o desenvolvimento dos microrganismos.

Bravo et al. (2000) utilizaram caldo de cana com 12° Brix suplementado com 0,28 a 0,40 g/100 mL de sulfato de amônio e 0,50 a 1,05 g/100 mL de pectina para a produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*, obtendo-se as maiores atividades enzimáticas em 48 horas de fermentação a 28°C, 150 rpm e pH 5,0. Observaram que a concentração de sulfato de amônio afetava e a concentração de pectina não afetava significativamente a atividade de PG.

Kashyap et al. (2000) isolaram cepas de *Bacillus* sp de solo e de unidades de processamento de frutas com alta atividade pectinolítica. Observaram que a combinação de extrato de levedura e pectina mostrou-se o melhor meio para a produção de pectinases. O estudo do efeito do pH e da temperatura sobre o crescimento microbiano demonstrou que a máxima produção de pectinases era ao redor do pH neutro (7,2) e a 37°C houve a maior produção de enzimas.

Zheng & Shetty (2000) utilizaram resíduos de indústrias de processamento de frutas (morango e maçã) para a produção de poligalacturonase em fermentação em estado sólido por *Lentinus edodes*. A atividade enzimática aumentava significativamente nos estágios iniciais de crescimento e atingiu o nível máximo em 40 dias, nos meios contendo as polpas. A polpa de morango foi o melhor substrato para produção de poligalacturonase, seguido da polpa de maçã. A atividade enzimática máxima para o meio contendo polpa de morango foi à temperatura de 50°C e pH 5,0.

Blandino et al. (2001) utilizaram farinha de trigo em fermentação submersa para a produção de pectinases por *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus awamori*. Atividade de endo-poligalacturonase foi observada após 24 horas de cultivo para ambos os fungos, obtendo-se

um valor máximo entre o quinto e o sétimo dia de fermentação. Entretanto, quando uma pequena quantidade de pectina foi adicionada ao meio, as atividades de poligalacturonase foram maiores.

Bonnin et al. (2001b) purificaram endo-poligalacturonase de meios de cultura contendo pectina de beterraba, que mostrou especificidade por ligações α -1,4 entre duas unidades de ácido galacturônico e hidrólise preferencial de ligações próximas aos finais não redutores.

Hellín et al. (2001) utilizaram polpa de limão para o cultivo de *Rhizopus nigricans* e observaram que a etapa de autoclavagem durante o preparo do meio de cultivo solubilizava uma mistura complexa de poli-, oligo- e monossacarídeos da polpa de limão, e estes carboidratos (glicose, frutose e oligômeros de ácido galacturônico) são utilizados para crescimento e produção de poligalacturonases.

Rha et al. (2001) cultivaram fungos por um período de seis dias em meio contendo pectina cítrica como fonte de carbono. Exo-poligalacturonase I (66 kDa) foi detectada após seis dias de fermentação e exo-poligalacturonase II (70 kDa) foi observada entre 3 e 5 dias e desapareceu após promover crescimento micelial. Em meio contendo ácido poligalacturônico, o comportamento foi similar.

Piccoli-Valle et al. (2001) observaram a atividade de pectina liase produzida por *P. griseoroseum* em biorreatores em diferentes condições de aeração, em meio mineral suplementado com extrato de levedura e sacarose. A máxima atividade enzimática e a maior quantidade de biomassa foram obtidas quando não houve injeção de ar, em meio adicionado de 60 mM de sacarose e pH entre 6,3 e 7,2.

Takayanagi et al. (2001) verificaram que a atividade de poligalacturonase de leveduras aumentou em frações de mosto de uva usando-se o bagaço fresco ou aquecido durante os primeiros estágios de fermentação, e que as cascas e as sementes foram necessárias para a indução de produção de enzimas e para o crescimento das leveduras presentes no bagaço. Três tipos de poligalacturonases (I, II e III) foram separados por cromatografia utilizando-se DEAE Sepharose. Os resultados indicaram que PG-I apresentou atividade de endoenzima, com pH ótimo de 3,5 e PG-II e PG-III apresentaram atividades de exoenzima, com pH ótimo de 4,5.

De Gregorio et al. (2002) utilizaram polpa de limão para a produção de pectinases por *A. niger* e *T. viride* a fim de aproveitamento de resíduos das indústrias de sucos, por fermentação submersa. *A. niger* mostrou uma produção significativa de enzimas iniciando-se no sétimo dia de fermentação e a produção máxima ocorrendo no décimo quarto dia. *T. viride* apresentou produção de poligalacturonase mais lentamente, atingindo o máximo no vigésimo quinto dia de fermentação.

Martins et al. (2002) estudaram enzimas pectinolíticas termoestáveis produzidas por microrganismos termófilos em fermentação sólida, por sofrerem menos proteólise e por serem mais resistentes à desnaturação mecânica que as enzimas produzidas por mesófilos. Observaram que o fungo termófilo *T. aurantiacus*, quando cultivado em meio contendo farelo de trigo, bagaço de laranja e a mistura destes materiais com bagaço de cana, produz poligalacturonase e pectina liase.

2.2. PRODUÇÃO DE AROMAS DE FRUTAS POR MICRORGANISMOS

Ferreira et al. (1996a) observaram as diferenças de composição de voláteis de vinho correspondente à presença ou ausência de casca durante a fermentação, a origem e a variedade das uvas. Concluíram que a composição de voláteis nos vinhos é afetada pela origem e pela variedade das uvas e isso pode ser efetivamente utilizado para identificação do vinho. Essas duas variáveis possuem um alto grau de interação e ambas têm uma influência na composição dos vinhos, principalmente os compostos relacionados ao metabolismo de aminoácidos e os gerados da peroxidação de ácidos graxos.

Nielsen & Richelieu (1999) estudaram diferentes condições de fermentação para *Oenococcus oeni* que influenciaram na degradação dos ácidos málico e cítrico, produzindo diferentes concentrações de diacetil e acetoína. Em condições semiaeróbias, a concentração de diacetil era maior que em condições anaeróbias, já a concentração de acetoína apresentava comportamento oposto, ou seja, era maior em condições anaeróbias que em condições semiaeróbias.

Christen et al. (2000) detectaram notas alcoólicas durante a fermentação de cepas de *Rhizopus* e notas frutais em fermentação de *Ceratocystis fimbriata* em resíduos agroindustriais. Verificaram que a produção de compostos voláteis dependia mais do meio que da cepa. A maior produção de voláteis foi obtida com meio amaranto e foi aumentada com a adição de soluções salinas minerais. Etanol foi o volátil mais encontrado e sua produção foi favorecida pela alta relação C/N e baixa aeração, associado com o cultivo estático, promovendo a atividade fermentativa.

Os resultados sensoriais obtidos por Medeiros et al. (2000) mostraram que meio sólido composto por farelo de palma e bagaço de mandioca cultivado por *K. marxianus*

produz intenso aroma característico de frutas. Farelo de semente de girassol produziu aroma suave e polpa de maçã e bagaço de cana não produziram nenhum aroma.

Soares et al. (2000) utilizaram fermentação em estado sólido com polpa de café e detectaram odores no espaço livre das culturas dependendo da quantidade de glicose adicionada. Em altas concentrações de glicose (46 g/100 g de matéria seca), um efeito limitante foi observado em termos de intensidade de aroma. A baixas concentrações de glicose (20 g/100 g de matéria seca), a produção de compostos foi rápida, atingindo um máximo após 40 horas, mantido no mesmo nível por mais de 140 horas. A níveis intermediários de concentração de glicose (35 g/100 g de matéria seca), o aumento de compostos voláteis foi mais lento e o máximo foi atingido após 280 horas.

Falqué et al. (2001) analisaram monoterpenos, álcoois superiores, ésteres etil, ácidos graxos, acetatos, fenóis voláteis e compostos sulfurados por CG e CG-MS de 4 variedades de vinhos da Galícia (Albariño, Loureira, Treixadura e Dona Branca) dos anos de 1992 a 1995. A composição de aromas foi similar para cada vinho obtido de uvas de diferentes anos, porém o perfil aromático (valor de unidade de odor, OUV=[concentração do composto]/[threshold]) variou notadamente dependendo da variedade empregada. Ésteres etil, acetato de etila e álcoois superiores foram os compostos dominantes em todos os vinhos e a maior diferença entre os 4 tipos de vinhos pôde ser atribuída a variação de intensidade dos atributos frutal e floral devido aos ésteres etil, acetatos, monoterpenos e 2-feniletanol.

Ferreira et al. (2001) verificaram a composição de voláteis de aroma de 4 tipos diferentes de vinhos tintos espanhóis, produzidos em diferentes áreas e com diferentes tipos de uvas. Foram encontrados e identificados 69 compostos de aromas diferentes por cromatografia gasosa e olfatometria. Os perfis dos vinhos foram qualitativamente similares,

mas observaram a existência de diferenças quantitativas importantes em aproximadamente metade dos aromas dos vinhos, provenientes dos componentes da uva, liberados pela madeira, formados por bactérias ácido-láticas ou durante o armazenamento.

Hansson et al. (2001) observaram os efeitos de açúcares e pectina na liberação de aromas em sistemas modelos. Notaram que a adição de sacarose, açúcar invertido (20-60%) e xarope de glicose (60%) aumentaram consideravelmente a liberação de muitos compostos voláteis. Quando a pectina foi adicionada nas mesmas concentrações da sacarose, o efeito da liberação de voláteis não foi o mesmo, havendo diminuição no composto limoneno.

Huang et al. (2001) cultivaram *Pichia fermentans* em meio líquido suplementado com fenilalanina e estudaram o efeito do pH inicial do meio, temperatura de cultivo e velocidade de rotação para a produção de 2-feniletanol e 2-fenilacetato. A quantidade de compostos aromáticos formados foi máxima em pH entre 8,5 e 10, temperatura de cultivo entre 30° e 35°C e velocidade de rotação entre 200 e 250 rpm.

Rojas et al. (2001) selecionaram 11 cepas de leveduras não-*Saccharomyces* e duas *Saccharomyces* de vinho e verificaram a produção de acetato de etila, acetato de geranil, acetato de isoamila, acetato de linalil e acetato de 2-feniletila pela adição de álcoois a serem esterificados em solução de decano em placa de ágar glicose com 24 h de incubação. Somente três microrganismos produziram mais que um éster acetato e foram escolhidos para a produção dos ésteres. *Hanseniaspora* e *Pichia* foram capazes de esterificar vários álcoois, como etanol, geraniol, álcool isoamílico e 2-feniletanol. Nenhuma cepa esterificou linalol, talvez por ser um álcool terciário. Condições altamente aeróbias favoreceram a produção de ésteres não acetato como caproato e caprilato de etila por *Saccharomyces*. Concluíram que o potencial de leveduras não-*Saccharomyces* de vinho em produzir ésteres acetato pode ser empregado para melhorar as propriedades sensoriais de vinho.

Van der Sluis et al. (2001a) verificaram a capacidade de *Candida versatili* e *Zagosccharomyces rouxii* imobilizadas em gel de polietileno óxido, de produzirem compostos de aroma como 4-etil guaiacol, etanol e metionol. Observaram que a produção de 4-etil guaiacol por células de *C. versatili* imobilizadas ou livres foram semelhantes quando cultivadas em meio contendo ácido ferúlico. Células imobilizadas de *Z. rouxii* produziram altas concentrações de metionol, etanol, n-propanol, álcoois isobutílico, isoamílico e amílico.

Granchi et al. (2002) caracterizaram o comportamento fermentativo de leveduras apiculata isoladas de amostras de vinhos. Observaram que *Hanseniaspora osmophila* e *Kloeckera corticis* não geraram grandes variabilidades nas quantidades de etanol ou de produtos secundários formados. A alta tolerância ao etanol de *H. osmophila* e *K. corticis* afeta o desenvolvimento e a velocidade de fermentação de populações de *Saccharomyces*, alterando a composição do suco de uva. Glicerol, álcoois superiores e ácido acético foram produzidos em altas concentrações. A adição de dióxido de enxofre em mosto sintético causou um aumento na produção de acetaldeído por *H. osmophila* e *K. corticis* e não causou alteração na formação de outros produtos da fermentação.

Valero et al. (2002) utilizaram duas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* em fermentação de mosto de uva com e sem oxigênio inicial para verificar a produção de álcoois superiores e ésteres. A linhagem *campensis* exibiu menor atividade fermentativa que a linhagem *cerevisiae*, produzindo menores quantidades de etanol. Verificaram que *Saccharomyces cerevisiae* linhagem *cerevisiae* pode ser usada em mostos sem oxigenação para melhorar as propriedades sensoriais e a linhagem *campensis* pode melhorar o aroma e ser usado para obtenção de vinhos com menor conteúdo de etanol ou com gosto doce moderado se o conteúdo de açúcar inicial for maior que a sua capacidade de metabolizá-lo.

O comportamento de *Kloeckera apiculata*, *Candida pulcherrima* e *Saccharomyces cerevisiae* foram estudados por Zohre & Erten (2002), com culturas puras e misturadas em suco de uva. A análise relativa de voláteis indicou que as fermentações por *Saccharomyces cerevisiae* em culturas puras e misturadas tiveram as maiores produções relativas de álcoois superiores (álcoois isoamílico, amílico, isobutanol e 1-propanol). Álcool isoamílico, isobutanol e 1-propanol apresentaram níveis muito abaixo do threshold e somente álcool isoamílico foi encontrado em concentrações que poderiam contribuir com as propriedades sensoriais dos vinhos produzidos com culturas puras e misturadas de *Saccharomyces cerevisiae*. *Kloeckera apiculata* e *Candida pulcherrima* em culturas puras produziram grandes quantidades de acetato de etila, que conferem aroma frutal ao vinho e produz odor de solvente se exceder 200 mg/mL.

Dias et al. (2003) estudaram os efeitos da produção de 4-etilfenol por *Dekkera bruxellensis* em meio contendo glicose. O substrato foi consumido para a produção de etanol durante a fase exponencial de crescimento e, após o consumo de glicose, houve a utilização do etanol para a produção de 4-vinilfenol durante a fase estacionária de crescimento. A produção de 4-etilfenol é resultado de duas reações consecutivas. Um metabólito intermediário (4-vinilfenol) foi testado se poderia ser usado como precursor de 4-etilfenol na ausência e na presença de ácido p-cumárico. Ao ser adicionado 4-vinilfenol no meio de cultura, a produção de 4-etilfenol procedeu da mesma forma que no meio de glicose como única de fonte de carbono e a velocidade de crescimento, produção de etanol, consumo e produção de ácido acético foram similares ao meio suplementado com ácido p-cumárico e em meio contendo etanol como única fonte de carbono.

Plata et al. (2003) reportaram a produção de acetato de etila e acetato de isoamila por 7 leveduras e as compararam em termos de sua capacidade de produzir dois ésteres em

meio sintético. *P. membranaefaciens* e *C. guilliermondii* produziram pequenas quantidades dos dois ésteres e também de etanol e álcool isoamílico. Acetato de etila foi detectado após 24 h e acetato de isoamila somente no décimo dia, provavelmente devido à baixa atividade enzimática apresentada pelos microrganismos.

Polychroniadou et al. (2003) verificaram que o crescimento e fermentação de *Saccharomyces cerevisiae* em mosto de uva são muito mais rápidos que em suco ou mosto de maçã. Os principais voláteis em vinho e em cidra foram propanol, acetato de etila, acetaldeído e metanol. Álcoois isobutílico e amílico foram menores em vinhos em comparação com cidras, mas sua presença pode ser considerada desvantajosa devido a sua toxicidade a altas concentrações, e pode explicar a maior resistência à deterioração de cidras em relação aos vinhos.

3. OBJETIVOS

1. Selecionar microrganismos previamente isolados de alta atividade pectinolítica.
2. Estudar meios de cultura de baixo custo, compostos de resíduos agroindustriais, como casca de café seco e bagaço de uva, para produção de aromas frutais, mediante degradação de pectina presente no meio por microrganismos pectinolíticos.
3. Separação e identificação dos compostos voláteis produzidos por cromatografia gasosa e espectrometria de massa.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PECTINOLÍTICOS

Os microrganismos pectinolíticos foram selecionados através do método da placa proposto por McKay (1988). O meio constituía de 1,25% de solução de pectina cítrica (Sigma) pH 5,5 (autoclavado separadamente), 50 mM de fosfato de potássio pH 5,5, 6,7 g/L de extrato de levedura, 0,2% de glicose e 0,5% de ágar, autoclavado a 121°C e 1 atm de pressão por 15 minutos e vertido em placas de Petri estéreis. Os microrganismos foram inoculados por picada e incubados a 30°C de 2 a 4 dias, conforme desenvolvimento da colônia. Após incubação, as placas foram reveladas com uma solução 0,05% de vermelho-rutênio por 5 minutos e lavadas com água destilada. A formação de halo vermelho púrpuro ao redor da colônia contrastando com o restante claro da placa significou que o microrganismo foi capaz de degradar a pectina, ou seja, produtor de pectinase.

4.2. MEIO DE CULTURA PARA DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE PECTINOLÍTICA

O meio líquido para crescimento microbiano e determinação de atividade pectinolítica foi proposto por Kashyap et al. (2000), constituído de 1% de extrato de levedura, 1% de pectina cítrica (Sigma), pH 5,5, autoclavado a 121°C e 1 atm de pressão por 15 minutos. Os microrganismos selecionados foram inoculados em 50 mL de meio e incubados em shaker rotatório a 30° C, 100 rpm por até 96 horas.

A cada 24 horas de fermentação as culturas foram centrifugadas a 10000 rpm por 20 minutos a 0°C para separação do sobrenadante livre de células e posterior determinação de atividade pectinolítica e medida do pH. O sobrenadante foi armazenado em frascos de vidro

de 50 mL com tampa de borracha, lacrados com anel de alumínio e congelados em freezer até o momento da análise.

4.3. DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE PECTINOLÍTICA

4.3.1. ATIVIDADE DE POLIGALACTURONASE (PG)

A atividade pectinolítica de **poligalacturonase** (PG) foi determinada pela medida da liberação de grupos redutores usando-se o método do ácido dinitrosalicílico (DNS), proposto inicialmente por Miller (1959).

A solução de DNS foi preparada dissolvendo-se, a quente, 10,6 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico e 19,8 g de NaOH em 1416,0 mL de água destilada. A seguir foram adicionados 7,6 mL de fenol fundido a 50°C e 8,3 g de metabissulfito de sódio.

500 µL de substrato – solução 0,5% de pectina cítrica (Sigma), preparada em tampão acetato pH 4,5 – foram incubados a 40°C por 15 minutos para estabilização de temperatura. A seguir, 500 µL de extrato enzimático foram adicionados ao substrato e a reação incubada a 40°C por 40 minutos. Após a adição de 1 mL de solução de DNS, a mistura foi mantida em ebulição por 8 minutos para formação de cor, resfriados em banho de gelo e adicionados 8,0 mL de solução 50 mM de tartarato duplo de sódio-potássio para estabilização de cor.

A absorbância foi medida em espectrofotômetro Beckman Coulter, modelo DU640, a 540 nm, contra o branco. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de ácido galacturônico por minuto (UA = µmol/mL/min) segundo uma curva padrão estabelecida com ácido α-D-galacturônico (Fluka Chemica, massa molecular 212,16) como açúcar redutor.

4.3.2. ATIVIDADE DE PECTINA LIASE (PMGL)

A atividade pectinolítica de **pectina liase** (polimetilgalacturnato liase, PMGL) foi baseada no aumento da absorbância decorrente da formação de produtos urônicos 4,5 insaturados, proposto inicialmente por Albersheim (1966). A dupla ligação conjugada entre os C4 e C5 resulta na absorbância a 235 nm na luz ultravioleta.

Um mL de substrato – solução 0,5% de pectina cítrica (Sigma) em tampão citrato-fosfato pH 5,5 – foi incubado em banho a 40°C por 15 minutos para estabilização de temperatura. Em seguida 1,0 mL de extrato enzimático foi adicionado e a reação incubada a 40°C por 1 hora e 3,5 mL de HCl 0,5 M foram adicionados para paralisar a reação.

O coeficiente de extinção molar dos produtos insaturados $\epsilon_{235} = 5550 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ foi utilizado para o cálculo de atividade $UA = (\Delta A / \epsilon_{235}) \cdot 10^9$ (nmol/mL/min), onde ΔA é o aumento de absorbância por minuto.

4.4. SELEÇÃO DE LINHAGENS PRODUTORAS DE AROMAS DE FRUTAS

Os microrganismos pectinolíticos produtores de aromas de frutas foram selecionados em um meio de cultura contendo 5% de frutose e 0,5% de extrato de levedura. 50 mL do meio foram adicionados em frascos erlenmeyer de 250 mL e autoclavados a 121°C e 1 atm de pressão por 15 minutos. Após resfriamento do meio as linhagens foram inoculadas e os frascos incubados em shaker rotatório a 25°C e 100 rpm por 72 horas para avaliar a capacidade do microrganismo em produzir algum aroma de fruta.

As linhagens foram selecionadas segundo um painel não treinado de provadores, através de descrições sensoriais percebidas e intensidades dos aromas.

4.5. PRODUÇÃO DE AROMAS DE FRUTAS EM MEIO CONTENDO RESÍDUO AGROINDUSTRIAL

O meio de cultivo para a produção de aromas frutais por microrganismos pectinolíticos constituía de 10% (p/v) de resíduo agroindustrial – casca de café seco ou bagaço de uva – e 2% (p/v) de glicose. 50 mL de meio foram incubados em frascos erlenmeyer de 250 mL, autoclavados a 121°C e 1 atm de pressão por 15 minutos, resfriados, inoculados com as linhagens selecionadas e acondicionados em shaker rotatório a 25°C, 100 rpm por um período de até 120 horas.

O teor de pectina (determinação de ácido galacturônico) foi obtido segundo McCready & McComb (1952). Os açúcares solúveis de 10 g de resíduo foram extraídos com 100 mL de etanol 70% por 1 hora. A fase sólida foi separada e seca em estufa a 30°C por aproximadamente 30 minutos. Um grama do extrato seco foi umedecido com álcool etílico 95% e 200 mL de solução de verseno 0,5% (sal tetrasódico de ácido etilenoaminatetracético) foram adicionados, o pH foi ajustado para 11,5 com NaOH 1N e incubado a 25°C por 30 minutos para desesterificação da pectina e pectinatos. Após esse período, o pH da mistura foi ajustado para 5,0-5,5 com ácido acético glacial e 100 mg de pectinase comercial (Vinozym FCE G, Novo Nordisk) foram adicionados, permanecendo em banho a 25°C por 1 hora para hidrólise das substâncias pécticas. A solução foi filtrada em papel de filtro Whatman número 1 e o volume elevado a 250 mL em balão volumétrico. A quantificação de ácido galacturônico foi realizada com a solução obtida, segundo a metodologia do ácido dinitrosalicílico.

4.6. TRATAMENTO DAS AMOSTRAS

Após cada período de 24 horas os frascos foram retirados do shaker e as amostras centrifugadas a 10000 rpm, 0°C por 20 minutos e filtradas em papel de filtro Whatman número 1 para separação das células livres e outras partículas em suspensão.

Os filtrados foram extraídos com três porções consecutivas de 5 mL de solvente orgânico, éter:hexano na proporção 1:1. As porções orgânicas foram separadas e acondicionadas em frascos de vidro de 50 mL com septo de borracha e lacre de alumínio e armazenadas em freezer até o momento da análise cromatográfica, quando as amostras foram concentradas com fluxo de nitrogênio gasoso até um volume final de 2 mL e acondicionadas em flaconetes de vidro de 5 mL.

4.7. ANÁLISE DOS COMPOSTOS DE AROMA FORMADOS

Para a análise cromatográfica dos compostos de aroma formados foi utilizado um cromatógrafo gasoso Chrompack CP 9001 com detector de ionização de chama (FID) e uma coluna capilar de sílica fundida e polietileno glicol como fase ligada HP Innowax (30 m X 0,25 mm X 0,25 µm). As análises foram realizadas utilizando-se a temperatura inicial da coluna de 40°C por 1 minuto, aumentando-se gradativamente de 5°C por minuto até atingir 200°C, onde permaneceu por 5 minutos. A temperatura do injetor foi fixada em 220°C e a do detector em 250°C, empregando como gás de arraste o hélio na vazão de 1,0 mL por minuto em sistema de injeção splitless. O volume de amostra utilizado para injeção foi 1 µL e 2-heptanol foi utilizado como padrão interno.

Os compostos voláteis foram analisados em um cromatógrafo gasoso Shimadzu modelo 17-A, equipado com um detector de massas modelo QP 5000, nas mesmas

condições cromatográficas descritas anteriormente com a temperatura do detector em 250°C e voltagem de ionização 70 eV.

O índice de Kovats dos composto foi utilizado como um dado complementar para a confirmação de identidade dos compostos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE PECTINASES

A seleção de microrganismos produtores de pectinases foi realizada segundo a metodologia proposta por McKay (1988), de acordo com o item 4.1.

Das 104 linhagens testadas, 18 foram positivas, ou seja, apresentaram halo de degradação vermelho púrpura ao redor do halo da colônia. Isto pode ser atribuído ao fato de que o isolamento dos microrganismos foi realizado de forma direcionada, ou seja, de fontes ricas em pectina, como grãos de café, cascas de café, folhas de pé de café e frutas cítricas e de materiais relacionados com café, como água de lavagem de café despulpado e terra de cafezal.

Os valores de diâmetro total (colônia mais halo), diâmetro de colônia e diâmetro de halo (diâmetro total menos o de colônia) estão apresentados na tabela 5.1. Os microrganismos 15, 17, 31, 37, 39, 70, 98, 99, 125 e 144 apresentaram diâmetros de halos maior ou igual a 1,0 cm.

Das linhagens testadas, 81 cresceram no meio contendo pectina como fonte de carbono, mas não foi possível detectar o halo claro de degradação além do halo da colônia. Cinco microrganismos não cresceram neste meio.

TABELA 5.1. Microrganismos pectinolíticos e correspondentes diâmetros de halos.

Linhagem	Halo total (cm)	Halo de colônia (cm)	Halo de pectinase (cm)
2	1,5	1,0	0,5
9	3,5	3,0	0,5
13	2,5	2,0	0,5
15	2,5	1,5	1,0
17	2,5	1,5	1,0
18	2,5	2,0	0,5
19	2,5	1,9	0,6
20	3,0	2,0	1,0
31	5,0	2,0	3,0
37	6,0	4,0	2,0
39	7,0	5,0	2,0
70	3,0	2,0	1,0
73	4,0	3,5	0,5
74	3,3	3,0	0,3
98	4,0	2,0	2,0
99	4,0	1,0	3,0
125	1,3	0,3	1,0
144	3,5	1,0	2,5

5.2. DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE PECTINOLÍTICA

As amostras fermentadas retiradas a cada 24 horas foram centrifugadas para separação do sobrenadante para medida de pH e determinação de atividade pectinolítica de PG e PMGL.

A tabela 5.2 e a figura 5.1 mostram a variação de pH do meio durante as 96 horas de fermentação, o pH inicial era de 5,5.

TABELA 5.2. Variação de pH do meio durante as 96 horas de fermentação.

Linhagem	Alteração pH com tempo de fermentação			
	24	48	72	96
2	5,17	5,16	5,17	5,19
9	5,64	6,77	7,67	7,47
13	4,92	6,32	6,15	7,65
15	5,35	7,44	7,38	7,38
17	5,14	5,21	6,65	6,44
18	5,39	7,59	7,8	7,72
19	5,23	7,63	7,87	7,68
20	5,56	7,76	8,45	8,63
31	5,26	7,62	7,89	7,86
37	5,78	7,19	8,15	8,59
39	5,13	6,53	7,43	8,34
70	4,76	4,89	5,03	5,42
73	6,44	8,19	8,26	8,17
74	4,55	4,92	5,18	5,69
98	5,54	7,82	8,29	8,37
99	5,79	7,8	7,95	7,65
125	5,14	5,18	5,21	5,49
144	5,15	6,11	6,01	5,98

Observa-se que, em geral, há um leve declínio de pH do meio nas primeiras 24 horas de fermentação e a partir de 48 horas o valor do pH volta a aumentar.

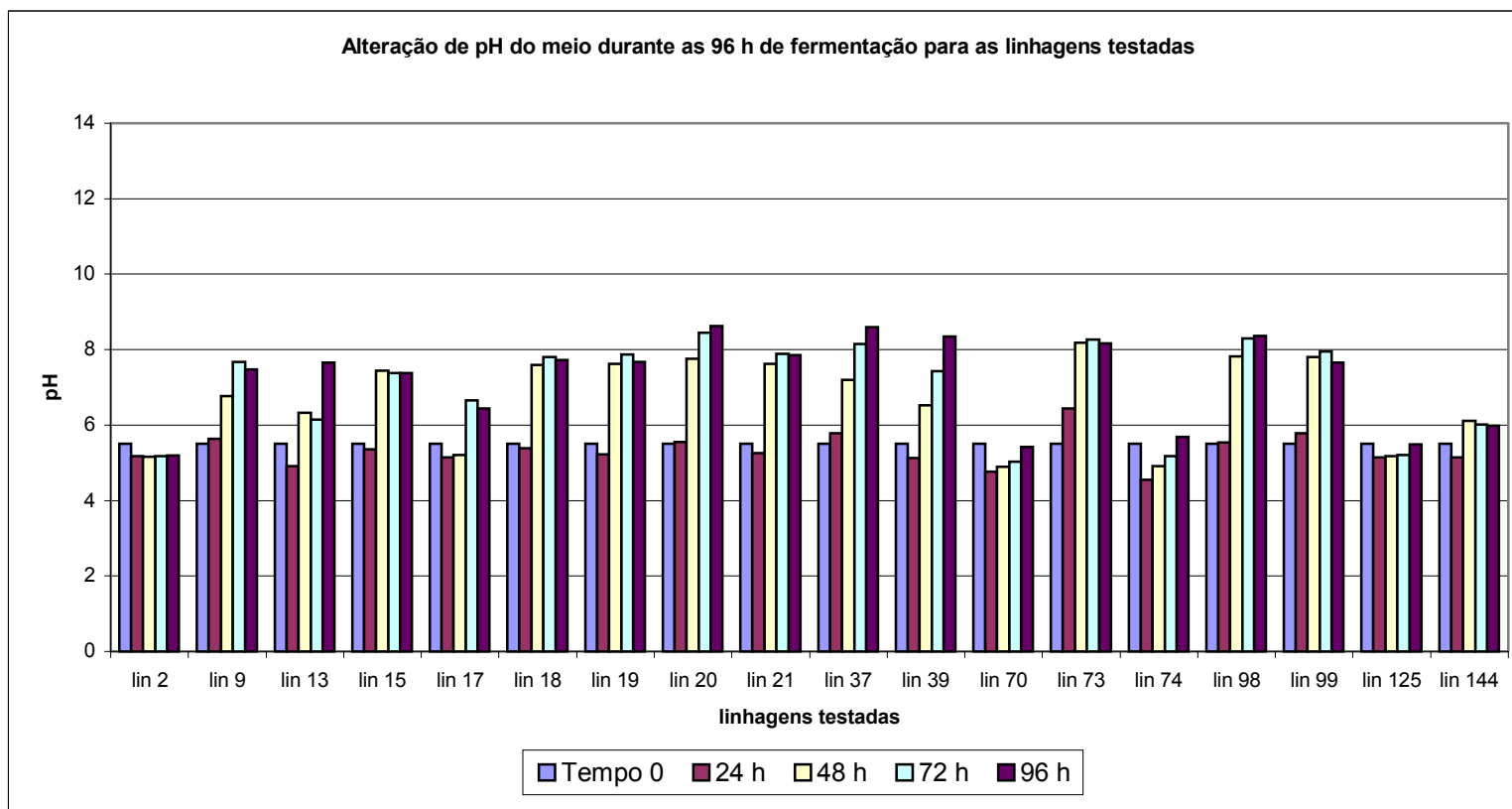


FIGURA 5.1. Alteração de pH do meio durante 96 horas de fermentação.

5.2.1. ATIVIDADE DE POLIGALACTURONASE (PG)

A atividade PG foi determinada pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS), com leitura de absorbância a 540 nm contra o branco. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido galacturônico por minuto.

A tabela 5.3 e a figura 5.2 mostram os valores de atividade obtidos durante as 96 horas de fermentação. Os microrganismos 2, 9, 20, 39, 70, 74 e 99 apresentaram unidades de atividade de PG superiores a 80 μmol de ácido galacturônico/mL de extrato bruto enzimático/minuto.

TABELA 5.3. Unidade de atividade de PG durante as 96 horas de fermentação.

Linhagem	UA de PG ($\mu\text{mol/mL/min}$)			
	24 h	48 h	72 h	96 h
2	148,88	84,60	89,78	35,12
9	52,00	34,18	91,61	16,82
13	27,08	38,34	32,98	20,21
15	6,15	28,25	11,02	13,26
17	13,99	47,47	42,89	0
18	37,69	47,30	34,88	0,42
19	23,32	22,07	24,73	29,86
20	81,63	97,07	132,58	122,58
31	6,60	30,50	38,65	10,00
37	6,98	0	0	0
39	149,36	67,38	44,43	67,70
70	118,12	95,49	115,80	83,07
73	8,17	28,53	26,13	22,10
74	80,49	118,20	116,48	91,20
98	48,26	35,32	27,12	5,72
99	57,03	103,16	30,43	15,34
125	80,44	25,40	36,65	39,93
144	37,09	51,80	37,43	37,72

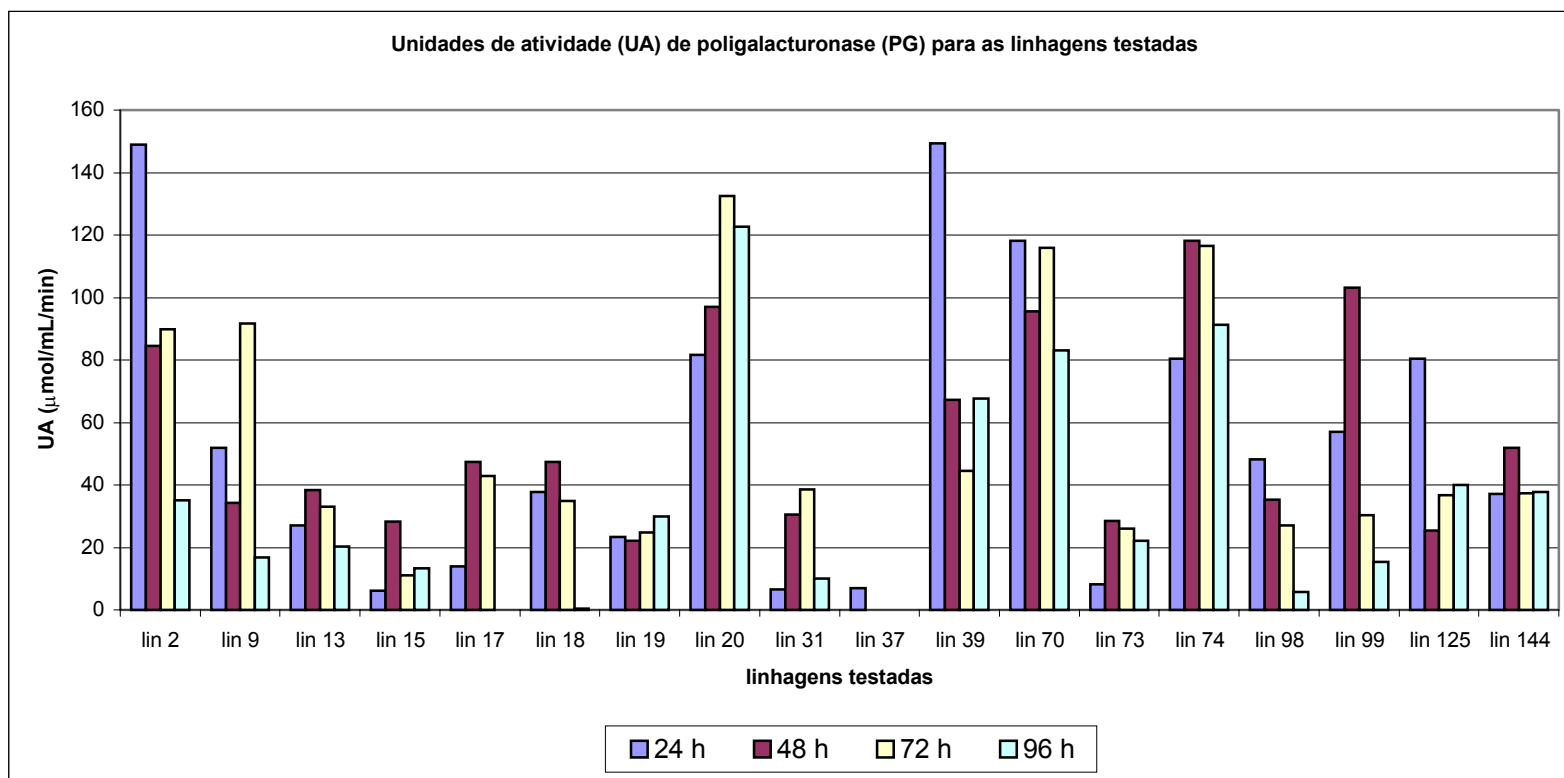


FIGURA 5.2. Atividade de poligalacturonase ($\mu\text{mol/mL/min}$) durante 96 horas de fermentação para as linhagens testadas.

5.2.2. ATIVIDADE DE PECTINA LIASE (PMGL)

A atividade de PMGL foi baseada no aumento da absorbância a 235 nm decorrente da formação de produtos insaturados.

Aa tabela 5.4 e a figura 5.3 mostram as atividades obtidas para PMGL durante as 96 horas de fermentação. As linhagens 17, 18, 31, 37, 73, 74 e 125 apresentaram unidades de atividade superiores a 1000 η mol de produtos insaturados/mL de extrato bruto enzimático/minuto.

TABELA 5.4. Unidades de atividades de PMGL durante as 96 horas de fermentação.

Linhagem	UA de PMGL (η mol/mL/min)			
	24 h	48 h	72 h	96 h
2	375,38	537,54	0,91	3,52
9	253,75	822,82	885,89	310,81
13	5223,72	0	0	94,59
15	0	894,89	0	2475,98
17	837,84	1249,25	169,67	611,11
18	1827,33	63,06	1418,92	102,10
19	0	256,76	611,11	297,30
20	888,89	76,58	0,00	1950,45
31	285,29	732,73	1993,99	2057,06
37	459,46	2572,07	1797,30	903,90
39	1247,75	0	132,13	741,74
70	0	414,41	0	250,75
73	1069,07	142,64	280,78	1959,46
74	552,55	211,71	572,07	1102,10
98	833,33	0	180,23	579,58
99	833,33	0	180,23	579,58
125	855,86	1019,52	4030,03	196,70
144	162,16	573,57	52,55	76,58

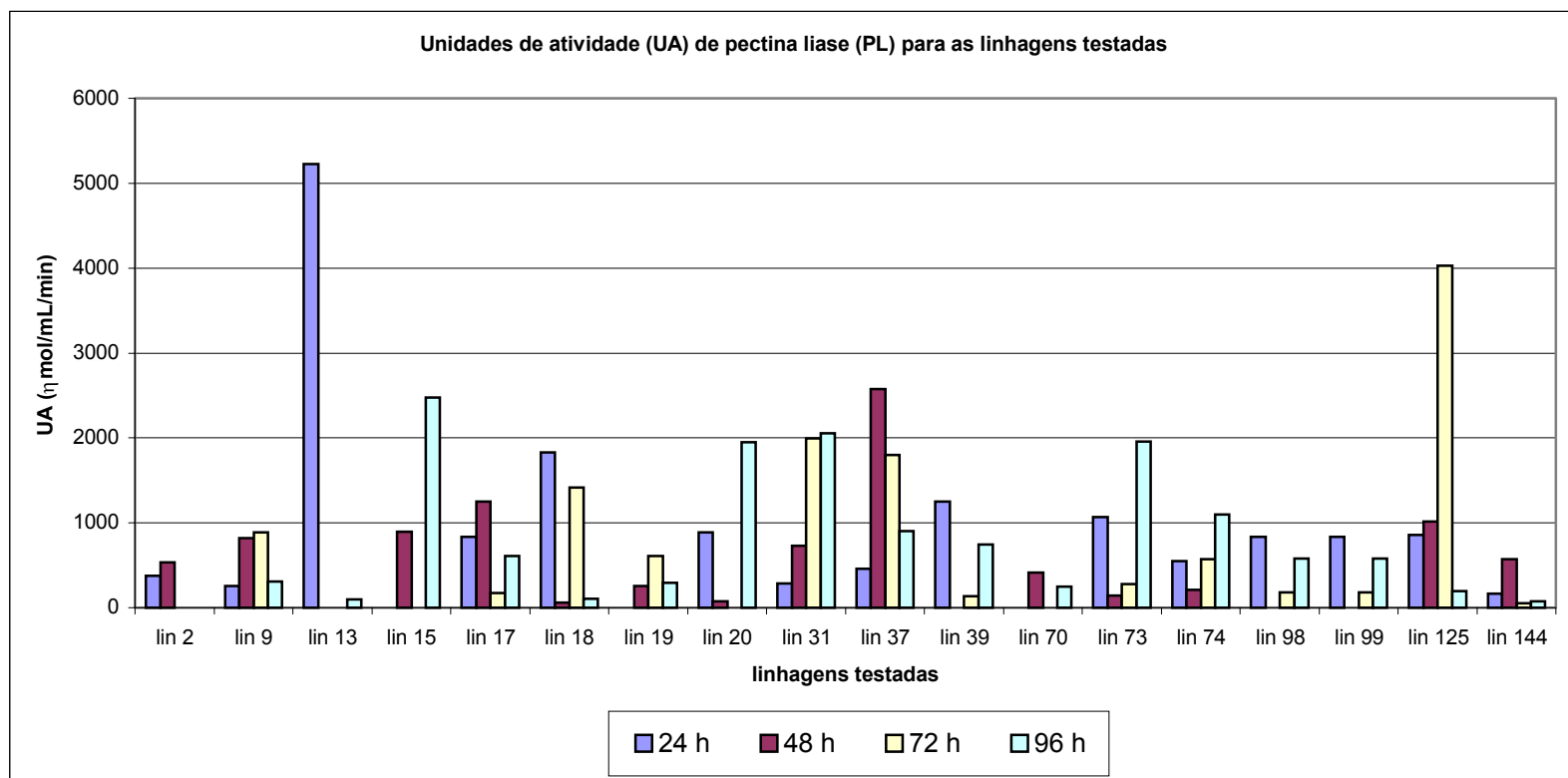


FIGURA 5.3. Atividade de pectina liase ($\eta\text{mol/mL/min}$) durante 96 horas de fermentação.

5.3. SELEÇÃO DE LINHAGENS PRODUTORAS DE AROMAS DE FRUTAS

Os microrganismos produtores de pectinases foram cultivados em meio frutose/extrato de levedura por 72 horas para verificar a capacidade de produção de aromas frutais. Apenas linhagens 2 e 37 não cresceram neste meio. As demais produziram aromas frutais agradáveis, de intensidades variáveis, de acordo com análise sensorial por um painel não treinado de provadores. Algumas das descrições de aromas citadas foram: frutal, abacaxi, pêra, banana, pêssego, laranja, doce, fermento e solvente.

As linhagens 13, 70, 73, 74, 125 e 144 foram as que apresentaram as maiores intensidades de aromas frutais, recebendo atribuição de valor igual ou maior a 4, correspondente a percepção de “aroma intenso” a “aroma muito intenso”, em uma escala de 1 a 5 na análise sensorial.

Observando-se os dados de atividade de PG e de PMGL, verificou-se que as linhagens 70, 73, 74 e 144, mostradas nas figuras 5.4 a 5.7, apresentaram boa atividade pectinolítica e também produziram aromas de frutas agradáveis durante a fermentação em frutose/extrato de levedura. Estas linhagens foram selecionadas para prosseguirem com as fermentações em meios de cultura contendo resíduos agroindustriais para a produção de aromas frutais.

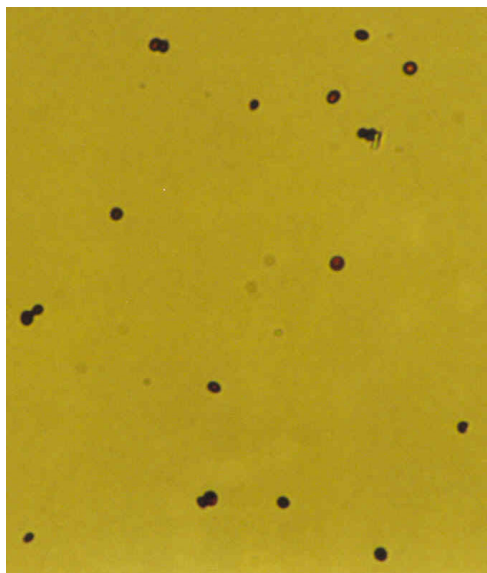


(a)

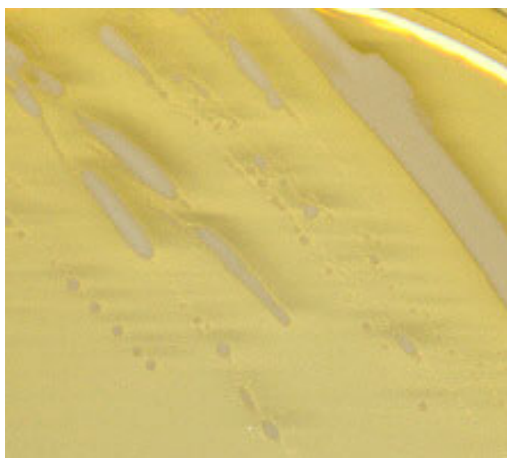


(b)

FIGURA 5.4. Linhagem 70. (a) Fotomicrografia de microcultivo com aumento de 400 vezes. (b) Detalhe de cultivo em placa.



(a)



(b)

FIGURA 5.5. Linhagem 73. (a) Fotomicrografia de coloração de Gram com aumento de 400 vezes. (b) Detalhe de cultivo em placa.

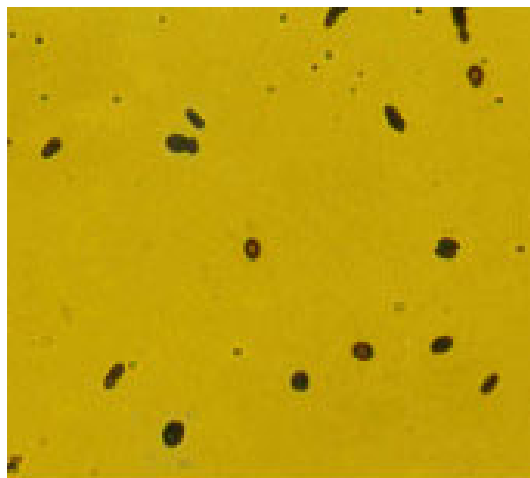


(a)

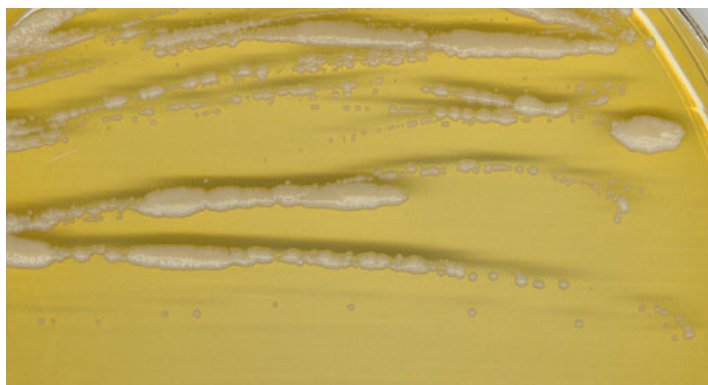


(b)

FIGURA 5.6. Linhagem 74. (a) Fotomicrografia de microcultivo com aumento de 400 vezes. (b) Detalhe de cultivo em placa.



(a)



(b)

FIGURA 5.7. Linhagem 144. (a) Fotomicrografia de coloração de Gram com aumento de 400 vezes. (b) Detalhe de cultivo em placa.

5.4. PRODUÇÃO DE AROMAS FRUTAIS EM MEIO CONTENDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Os resíduos agroindustriais escolhidos para serem utilizados como fonte de carbono para a produção de aromas frutais por microrganismos pectinolíticos foram casca de café seco e bagaço de uva.

Os meios de cultura preparados com 10% do resíduo (p/v), suplementados ou não com 1% de glicose (p/v), apresentaram resultados conforme mostrados nas tabelas 5.5 e 5.6, onde (+) significa a menor e (+++++) a maior intensidade de aromas percebidos pelos provadores.

TABELA 5.5. Aromas percebidos pelos provadores em meio *casca de café seco*.

Linhagem	Sem glicose	Intensidade	Glicose 1%	Intensidade
70	frutal	+++	frutal	+++++
	doce	++	manga, banana, pêssego	+++
73	frutal	+++	frutal banana, pêra	+++++
	doce	+++		+++
	fermentado	+++		
74	frutal	+++	frutal manga, laranja, frutas vermelhas	+++++
	doce	+++		+++
	floral	+++		
144	frutal	+++++	frutal	+++++
	banana, pêssego	+++	banana	+++++
	doce	+++++	doce	+++++
	ácido	+++++	ácido	+++++
			acetaldeído, acetato	+++

TABELA 5.6. Aromas percebidos pelos provadores em meio *bagaço de uva*.

Linhagem	Sem glicose	Intensidade	Glicose 1%	Intensidade
70	floral	+++	frutal	++++
	doce de uva	+++	doce	++
73	frutal	+	frutal doce fermento	+++
	floral	++++		++++
	doce	+++		+++
	fermento	++++		
74	frutal	+++	frutal	+++++
	floral	+++	banana, uva	+++
	doce	+++	fruta ácida	++++
144	floral frutal	+++	frutal	+++++
			doce	+++++
		++	solvente, acetato, acetona	+++++

Verificou-se que mesmo nos meios sem suplementação de glicose, houve crescimento microbiano e produção de aromas frutais, mostrando que as linhagens utilizam a pectina do meio como fonte de carbono para seu crescimento, o que não aconteceu com bagaço de cana seco, outro resíduo testado que possui um teor de pectina menor. O conteúdo de pectina (ácido galacturônico) obtido para a casca de café seco, bagaço de uva e bagaço de cana seco, conforme item 4.5, foram 14,7%, 5,9% e 3,7%, respectivamente.

Estas linhagens, quando cultivadas em meio contendo pectina cítrica como única fonte de carbono e extrato de malte como fonte de nitrogênio, são capazes de crescer e produzir aromas frutais.

Observou-se que os meios suplementados com glicose obtiveram intensidades de aroma mais elevadas. Foi verificada a melhor concentração de glicose, sendo testadas concentrações de 0,5%, 1%, 2%, 5% e 10% de glicose (p/v). As amostras com 72 horas de

fermentação foram analisadas por um painel não treinado de provadores, obtendo-se a concentração de 2% de glicose como sendo a melhor, ou seja, os meios que apresentaram as melhores descrições de aromas frutais e as maiores intensidades de aromas.

Os meios de cultura contendo 10% (p/v) de casca de café seco ou bagaço de uva, suplementados com 2% de glicose foram fermentados pelas linhagens 70, 73, 74 e 144 para a produção de aromas, retirando-se amostras a cada 24 horas até 120 horas e posterior análise cromatográfica dos compostos de aroma formados.

5.5. SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS FORMADOS

As amostras foram tratadas como no item 4.6 e as análises cromatográficas foram realizadas como descrito no item 4.7.

O anexo 1 mostra os componentes do cromatógrafo utilizado para as análises e o anexo 2 mostra os cromatogramas de algumas amostras analisadas.

Os compostos voláteis formados, separados e identificados por cromatografia gasosa e espectrometria de massas e os valores correspondentes do índice de Kovats estão apresentados na tabela 5.7. Os espectros de massas de alguns compostos identificados estão apresentados no anexo 3.

TABELA 5.7. Compostos voláteis separados e identificados por CG-EM e respectivos índices de Kovats (IK).

COMPOSTO	IK experimental	IK teórico
Acetona ¹	825	827
Acetato de etila ¹	876	878
Etanol ¹	945	944
Álcool isobutílico ²	1113	1116
Álcool isopentílico ³	1229	1230
3-metil-3-buten-1-ol ⁴	1256	—
3-metil-2-buten-1-ol ⁴	1307	—
2-butanona-3-hidroxi ²	1332	1333
Ácido acético ²	1480	1479
Ácido isobutírico ²	1593	1592
Ácido butírico ²	1656	1652
Ácido 2-metil butanóico ³	1673	1674
Álcool benzílico ⁴	1880	—
2-feniletanol ²	> 1900	> 1900

¹ compostos identificados por co-injeção de padrão puro e índice de Kovats.

² compostos identificados por co-injeção de padrão puro, espectrometria de massas e índice de Kovats.

³ compostos identificados por espectrometria de massas e índice de Kovats.

⁴ compostos tentativamente identificados.

A quantificação dos compostos acetona, acetato de etila, etanol, álcool isobutílico, 2-butanona-3-hidroxi, ácido acético, ácido isobutírico, ácido butírico e 2-feniletanol foi realizada segundo uma curva padrão para cada um dos compostos.

As tabelas 5.8 a 5.15 e as figuras 5.4 a 5.11 mostram os valores obtidos para os compostos formados para cada uma das linhagens em ambos os meios de cultura.

TABELA 5.8. Compostos formados pela linhagem 70, meio casca de café, durante 120 horas de fermentação.

Composto	C (mg/L)				
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
acetato etila	423,37	110,20	49,15	4,98	33,30
etanol	11,98	7,52	594,71	16,09	33,37
álcool isobutílico	68,44	12,82	—	—	—
ácido isobutírico	57,25	—	—	—	—
ácido butírico	13,03	—	9,01	—	—
2 feniletanol	5,83	5,92	1,38	0,25	0,56

(—) não detectado

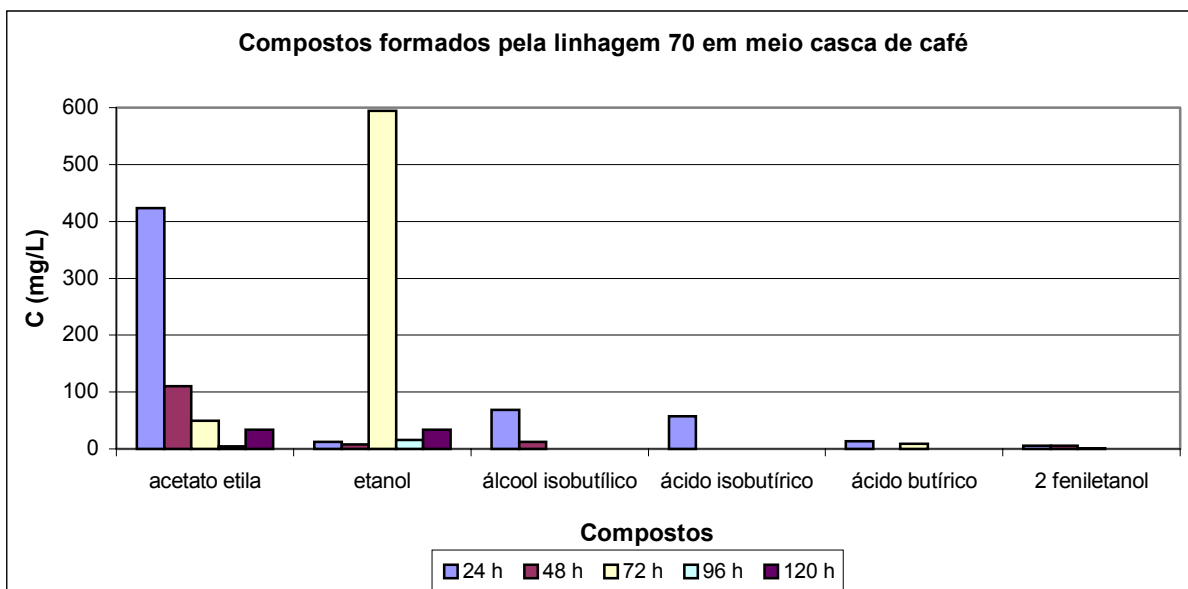


FIGURA 5.8. Compostos formados pela linhagem 70 em meio casca de café seco.

TABELA 5.9. Compostos formados pela linhagem 73, meio casca de café, durante 120 horas de fermentação.

Composto	C (mg/L)				
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
acetato etila	1380,12	1134,74	823,96	592,48	206,76
etanol	902,25	969,19	445,41	114,19	43,22
álcool isobutílico	161,33	197,61	158,92	168,30	159,96
ácido acético	—	154,62	112,74	165,56	62,05
ácido isobutírico	42,59	48,81	43,43	56,99	68,37
2 feniletanol	—	1,69	—	—	1,23

(—) não detectado

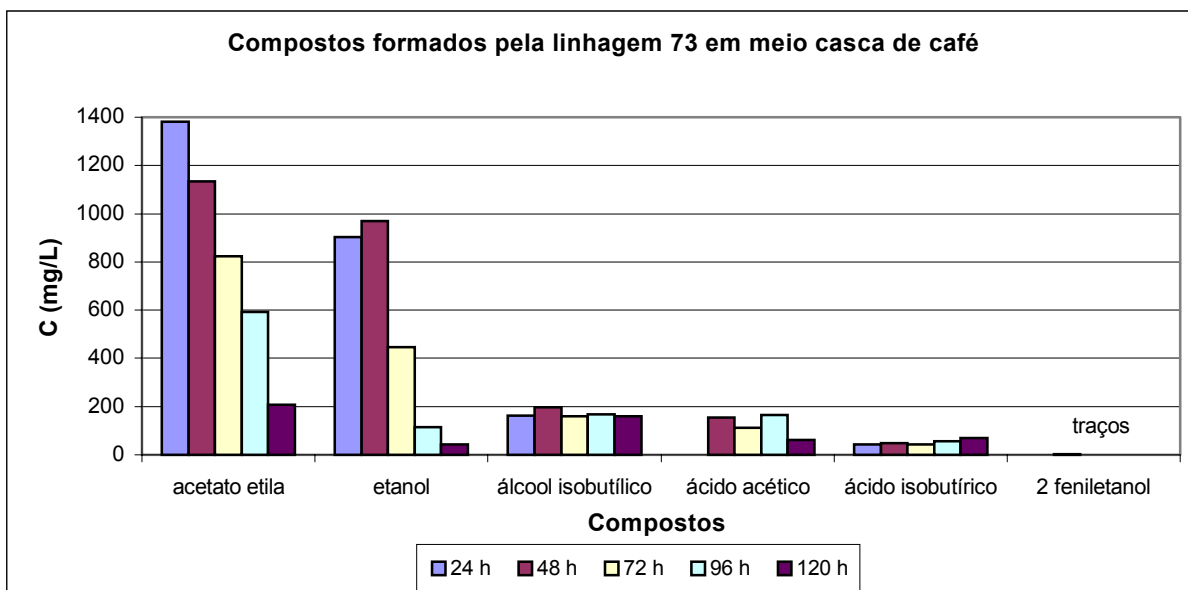


FIGURA 5.9. Compostos formados pela linhagem 73 em meio casca de café seco.

TABELA 5.10. Compostos formados pela linhagem 74, meio casca de café, durante 120 horas de fermentação.

Composto	C (mg/L)				
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
acetona	620,63	539,39	312,26	258,04	276,07
acetato etila	115,99	—	4,66	—	—
etanol	30,17	37,41	31,56	—	—
2 butanona 3 hidroxí	—	—	—	49,74	—
ácido acético	19,72	—	—	—	—
ácido butírico	6,05	5,60	6,70	5,89	3,60

(—) não detectado

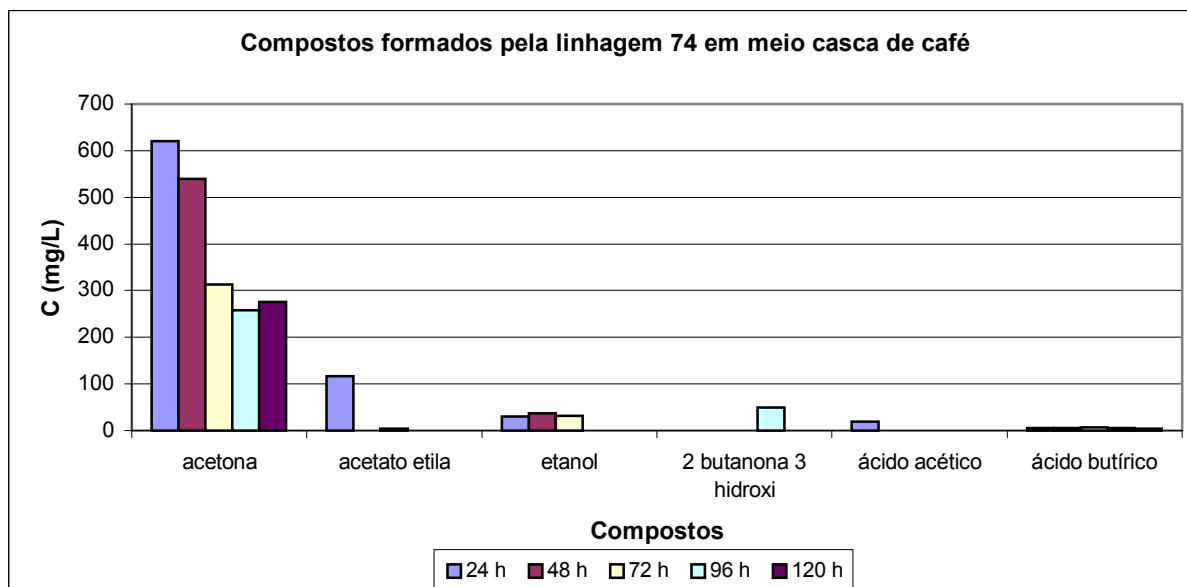


FIGURA 5.10. Compostos formados pela linhagem 74 em meio casca de café seco.

TABELA 5.11. Compostos formados pela linhagem 144, meio casca de café, durante 120 horas de fermentação.

Composto	C (mg/L)				
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
acetona	—	—	1,90	—	—
acetato etila	212,38	712,95	686,58	261,88	289,60
etanol	313,67	1345,03	112,63	355,07	315,95
álcool isobutílico	84,18	94,38	88,96	92,98	125,29
2 butanona 3 hidroxí	59,76	49,90	17,53	74,88	81,09
ácido acético	57,93	55,50	37,32	29,31	20,62
ácido isobutírico	27,69	36,09	38,19	16,67	26,77
ácido butírico	29,93	—	—	—	—
2 feniletanol	5,96	5,19	3,48	4,60	2,22

(—) não detectado

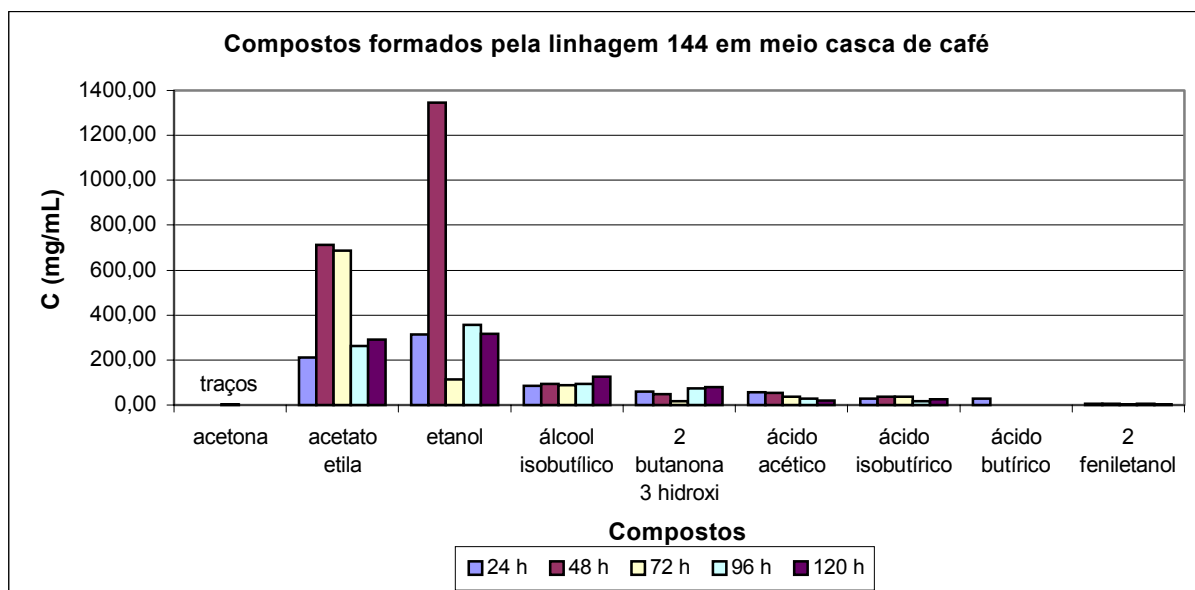


FIGURA 5.11. Compostos formados pela linhagem 144 em meio casca de café seco.

TABELA 5.12. Compostos formados pela linhagem 70, meio bagaço de uva, durante 120 horas de fermentação.

Composto	C (mg/L)				
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
acetato etila	50,97	75,96	68,13	14,53	–
etanol	–	104,54	–	–	–
álcool isobutílico	0,92	0,18	–	–	9,95
2 feniletanol	1,89	–	6,46	–	2,13

(–) não detectado

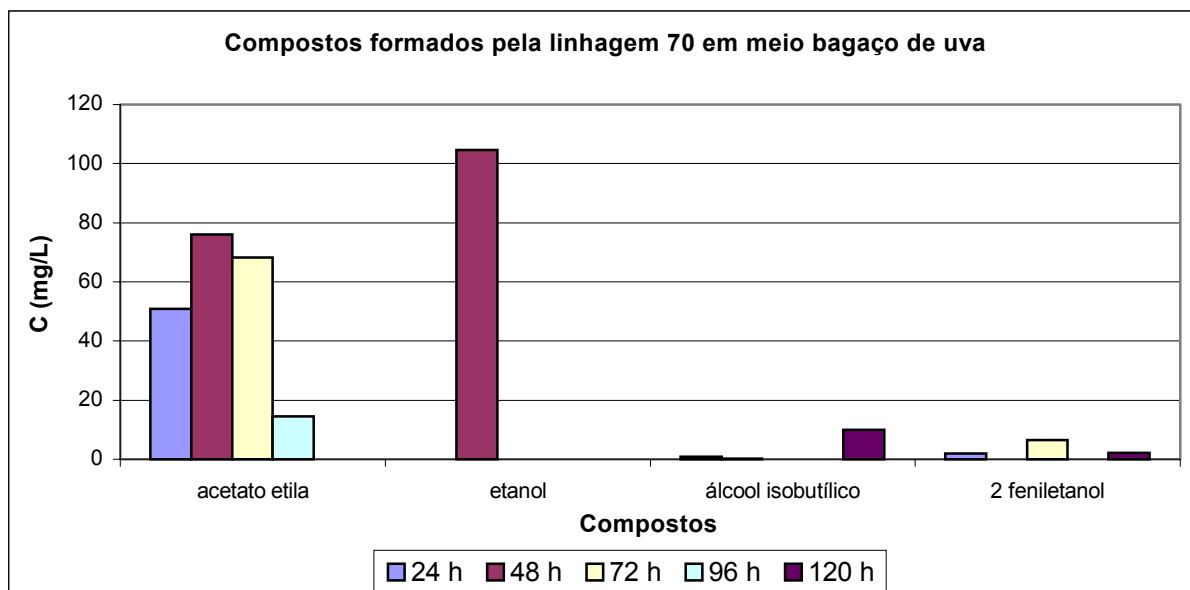


FIGURA 5.12. Compostos formados pela linhagem 70 em meio bagaço de uva.

TABELA 5.13. Compostos formados pela linhagem 73, meio bagaço de uva, durante 120 horas de fermentação.

Composto	C (mg/L)				
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
acetona	—	—	—	—	6,45
acetato etila	1458,06	1023,70	1116,34	—	—
álcool isobutílico	27,25	31,11	30,25	21,84	—
ácido isobutírico	44,20	72,37	122,38	101,48	68,02
2 feniletanol	1,67	—	—	—	—

(—) não detectado

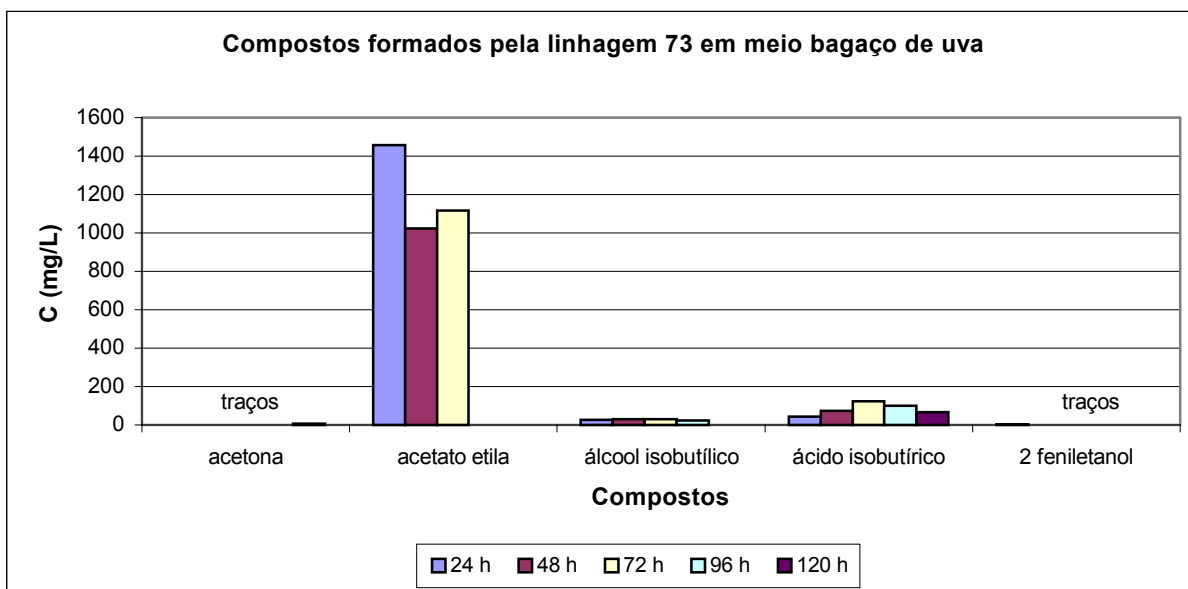


FIGURA 5.13. Compostos formados pela linhagem 73 em meio bagaço de uva.

TABELA 5.14. Compostos formados pela linhagem 74, meio bagaço de uva, durante 120 horas de fermentação.

Composto	C (mg/L)				
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
acetato etila	17,31	12,84	9,47	–	–
etanol	–	179,15	–	–	–
álcool isobutílico	0,39	1,46	0,55	–	2,64
2 feniletanol	–	–	1,86	–	–

(–) não detectado

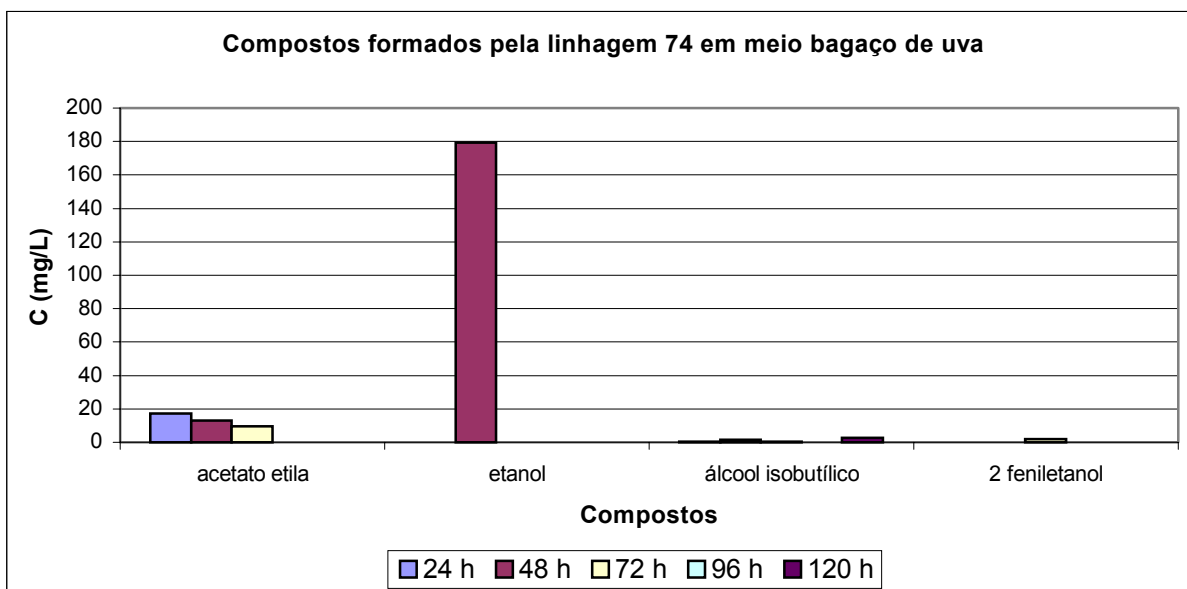


FIGURA 5.14. Compostos formados pela linhagem 74 em meio bagaço de uva.

TABELA 5.15. Compostos formados pela linhagem 144, meio bagaço de uva, durante 120 horas de fermentação.

Composto	C (mg/L)				
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
acetona	–	–	–	1,56	1,53
acetato etila	75,23	1372,23	2026,71	771,73	–
etanol	83,38	–	12,15	–	–
álcool isobutílico	17,34	36,35	46,10	57,84	42,56
2 butanona 3 hidroxí	–	–	31,94	61,97	51,72
ácido acético	–	17,20	43,62	79,69	–
ácido isobutírico	12,73	24,11	22,94	31,09	23,09

(–) não detectado

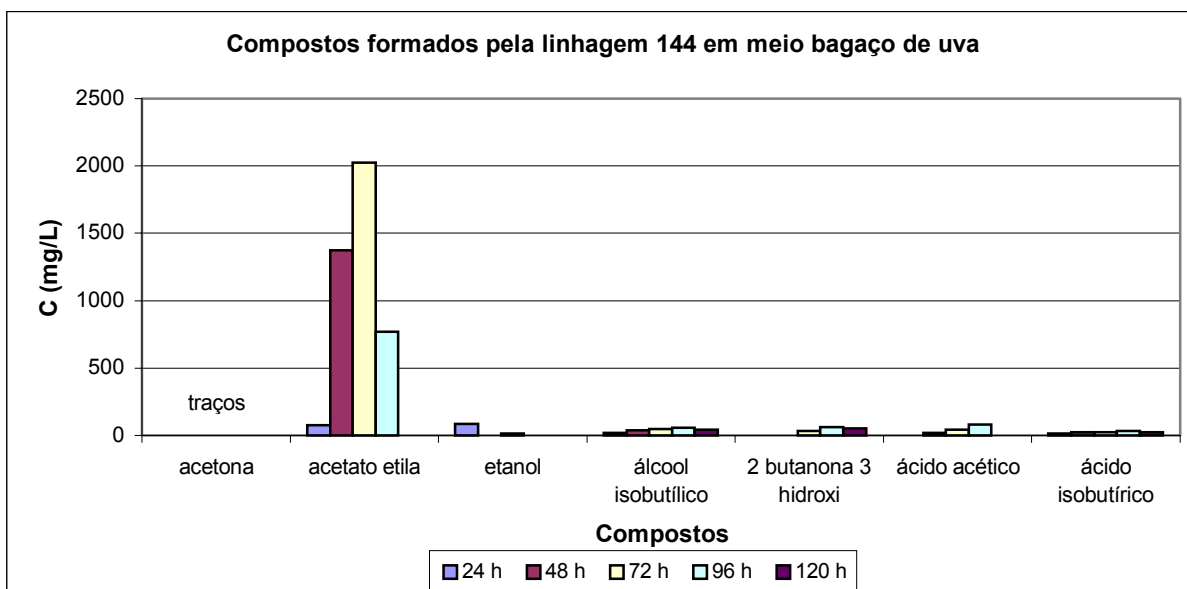


FIGURA 5.15. Compostos formados pela linhagem 144 em meio bagaço de uva.

Segundo um painel não treinado de provadores, o meio casca de café apresenta os melhores descritores de aromas e as maiores intensidades de aromas que o meio bagaço de uva. As análises cromatográficas indicam uma quantidade maior de compostos formados neste meio e em maiores concentrações.

Acetato de etila foi o composto formado por todas as linhagens, em ambos os meios, seguido de etanol.

As linhagens 73 e 144 mostraram ser as melhores produtoras de aromas em ambos os meios, produzindo uma maior quantidade de compostos e em maiores concentrações que as linhagens 70 e 74.

6. CONCLUSÕES

Das 104 linhagens testadas, 18 apresentaram halo de degradação vermelho púrpura além do halo de colônia. Isto pode ser atribuído ao fato de que o isolamento dos microrganismos foi realizado de forma direcionada, isto é, de fontes contendo pectina, como café e frutas cítricas e materiais relacionados com café.

Dentre os microrganismos pectinolíticos, as linhagens 70, 73, 74 e 144 foram as que apresentaram os melhores e mais agradáveis aromas de frutas durante a fermentação em meio frutose/extrato de levedura, sendo selecionadas para prosseguirem com as fermentações em meios de cultura constituídos de resíduos agroindustriais contendo pectina. Estas linhagens, quando cultivadas em meio contendo pectina cítrica como única fonte de carbono, se desenvolveram e produziram aromas frutais, demonstrando sua capacidade de metabolizar pectina através da produção de enzimas pectinolíticas e posterior produção de aromas frutais, e quando cultivados nos meios contendo resíduos sem suplementação de glicose também foram capazes de se desenvolver e de produzir aromas.

Os resíduos agroindustriais utilizados para produção de aromas foram casca de café seco e bagaço de uva, suplementados com glicose, pois apresentaram maior intensidade de aroma.

De acordo com as análises realizadas por CG-EM, os compostos formados durante o período de fermentação foram acetona, acetato de etila, etanol, álcool isobutílico, álcool isopentílico, 2-butanona-3-hidroxi, ácido acético, ácido isobutírico, ácido butírico, ácido 2-metil butanóico, álcool benzílico e 2-feniletanol, produzido em diferentes combinações e em diferentes concentrações pelas linhagens selecionadas.

De acordo com um painel não treinado de provadores, o meio casca de café foi o que produziu os melhores descritores e as maiores intensidades de aromas que o meio bagaço de uva. As análises cromatográficas mostraram que neste meio houve uma maior produção de compostos voláteis e em maiores concentrações.

As linhagens 73 e 144 foram as que produziram, em ambos os meios, os melhores aromas frutais, um maior número de compostos e em maiores concentrações que as linhagens 70 e 74, podendo ser utilizadas para a produção de compostos de aromas frutais em outros meios de cultura, visando a possível utilização destes compostos em alimentos.

Para a continuidade do trabalho, podemos sugerir o estudo das linhagens 73 e 144, em meios de cultura contendo outros tipos de resíduos agroindustriais para a produção de aromas frutais, outros tipos de extrações dos compostos de aroma formados durante a fermentação e o estudo da viabilidade de aplicação dos compostos formados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACREE, T. E.; ARN, H. **Flavornet – Gas chromatography-olfactometry (CGO) of natural products**. Disponível em: <<http://www.nysaes.cornell.edu/flavornet>>
2. ALBERSHEIN, P. Pectin lyase from fungi. **Methods in Enzymology**, v. 8, 628-631, 1966
3. ALEU, J.; COLLADO, I. G. Biotransformations by *Botrytis* species. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 13, 77-93, 2001
4. ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LLAMA, M. J.; SERRA, J. L. Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 33. n. 1, 21-28, 1998
5. ANSORENA, D.; GIMENO, O.; ASTIASARÁN, I.; BELLO, J. Analysis of volatiles compounds by CG-MS of a dry fermented sausage: chorizo de Pamplona. **Food Research International**, v. 34, 67-75, 2001
6. ANTOV, M. G.; PERICIN, D. M. Production of pectinases by *Polyporus squamosus* in two-fase system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, 467-472, 2001
7. AVALLONE, S.; BRILLOUET, J. M.; GUYOT, B.; OLGUIN, E.; GUIRAUD, J. P. Involvement of pectolytic micro-organisms in coffee fermentation. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, 191-198, 2002
8. AVALLONE, S.; GUIRAUD, J.-P.; GUYOT, B.; BRILLOUT, J.-M. Polysaccharide constituents of coffee-bean mucilage. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 8, 1308-1311, 2000
9. AVALLONE, S.; GUYOT, B.; BRILLOUET, J. M.; OLGUIN, E.; GUIRAUD, J. P. Microbiological and biochemical study of coffee fermentation. **Current Microbiology**, v. 42, 252-256, 2001

10. AZNAR, M.; LÓPEZ, R.; CACHO, J. F.; FERREIRA, V. Identification and quantification of impact odorants of aged red wines from Rioja. GC-olfactometry, quantitative GC-MS, and odor evaluation of HPLC fractions. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v. 49, 2924-2929, 2001
11. BHAT, M. K. Cellulases related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, 355-383, 2000
12. BICALHO, U. O.; CHITARRA, A. B.; CHITARRA, M. I. F.; COELHO, A. H. R. Modificações texturais em mamões submetidos à aplicação pós-colheita de cálcio e embalagem PVC. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24, n. 1, 136-146, 2000
13. BLANDINO, A.; DRAVILLAS, K.; CANTERO, D.; PANDIELLA, S. S.; WEBB, C. Utilization of whole wheat flour for the production of extracellular pectinases by some fungal strains. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 5, 497-503, 2001
14. BLUMENKRANTZ, N.; ASBOE-HANSEN, G. New method for quantitative determination of uronic acids. **Analytical Biochemistry**, v. 54, n. 2, 484-489, 1973
15. BOAS, B. M. V.; LICCIARD, R.; de MORAIS, A. R.; de CARVALHO, V. D. Seleção de extratores e tempo de extração para determinação de açúcares em café torrado. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 5, 1169-1173, 2001
16. BOAS, B. M. V.; LICCIARDI, R.; de MORAES, A. R.; de CARVALHO, V. D. Seleção de extratores e tempo de extração para determinação de açúcares em café torrado. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 5, 1169-1173, 2001
17. BONNIN, E.; BRUNEL, M.; GORUJ, Y.; LESAJE-MESSEN, L.; ASTHER, M.; RIBAULT, J.-F. *Aspergillus niger* I-1472 and *Pycnoporus cinnabarinus* MUCL 39533, selected for the biotransformation of ferulic acid to vanillin, are also able to produce

- cell wall polysaccharide – degrading enzymes and feruloyl esterases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, 70-80, 2001a
18. BONNIN, E.; Le GOFF, A.; KOIMER, R.; Van ALEBEEK, G.-J. W. M.; CHRISTENSEN, T. M. I. E.; VORAGEN, A. G. J.; ROEPSTORFF, P.; CAPRARI, C.; TRIBAULT, J.-F. Study of the mode of action of endopolygalacturonase from *Fusarium moniliforme*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1526, 301-309, 2001b
 19. BOULANGER, R.; CROUZET, J. Identification of the aroma components of acerola (*Malphigia glabra* L.): free and bound flavour compounds. **Food Chemistry**, v. 74, 209-216, 2001
 20. BRAND, D.; PANDEY, A.; ROUSSOS, S.; SOCCOL, C. R. Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, 127-133, 2000
 21. BRAVO. C. E. C.; de CARVALHO, E. P.; SCHWAN, R. F.; GÓMEZ, R. J. H. C.; PILON, L. Determinação de condições ideais para produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24 (edição especial), 137-152, 2000
 22. BVOCHORA, J. M.; ZVAUYA, R. Biochemical changes occurring during the application of high gravity fermentation technology to the brewing of Zimbabwean traditional opaque beer. **Process Biochemistry**, v. 37, 365-370, 2001
 23. CAMPERI, S. A.; HOURS, R. A.; ANDAY, R. M.; MIRANDA, M. Y.; CASCONE, O.; del CAÑIZO, A. N. Jugos de fruta sin methanol. **Ciencia Hoy**, v. 6, n. 33, 1996
 24. CASTILHO, L. R.; MEDRONHO, R. A.; ALVES, T. L. M. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 71, 45-50, 2000

25. CHRISTEN, P.; BRAMORSKI, A.; REVAH, S.; SOCCOL, C. R. Characterization of volatile compounds produced by *Rhizopus* strains grow on agroindustrial solid wastes. **Bioresource Technology**, v. 8, 211-215, 2000
26. CIANI, M.; FERRARO, L. Combined use of immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wines. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, 247-254, 1998
27. CORREDIG, M.; WICKER, L. Changes in the molecular weight distribution of three commercial pectins after value homogenization. **Food Hydrocolloids**, v. 15, 17-23, 2001
28. DAAS, P. J. H.; VORAGEN, G. J.; SCHOLS, H. A. Characterization of non-esterified galacturonic acid sequences in pectin with endopolygalacturonase. **Carbohydrate Research**, v. 326, 120-129, 2000
29. DAHL, S.; TAVARIA, F. K.; MALCATA, F. X. Relationships between flavour and microbiological profiles in Serra da Estrela cheese through ripening. **International Dairy Journal**, v. 10, 255-262, 2000
30. De GREGORIO, A.; MANDALANI, G.; ARENA, N.; NUCITA, F.; TRIPODO, M. M.; Lo CURTO, R. B. SCP and crude pectinase production by slurry-state fermentation of lemon pulps. **Bioresource Technology**, v. 83, 89-94, 2002
31. DEMIR, N.; ACAR, J.; SARIOGLU, K.; MUTLU, M. The use of commercial pectinase in the fruit juice industry. Part 3: Immobilized pectinase for mash treatment. **Journal of Food Engineering**, v. 47, 275-280, 2001
32. DEMYTTENAERE, J. C. R.; BELLGHEM, K. V.; DEKIMPE, N. Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)-limonene by fungi and the use of solid phase microextraction for screening. **Phytochemistry**, v. 57, 199-208, 2001

33. DIAS, L.; PEREIRA da SILVA, S.; TAVARES, M.; MALFEITO-FERREIRA, M.; LOUREIRO, V. Factors affecting the production of 4-ethylphenol by the yeasts *Dekkera bruxellensis* in enological conditions. **Food Microbiology**, v. 20, 377-384, 2003
34. DONG, L.; ZHOU, H.-W.; SONEGO, L.; LERS, A; LURIE, S. Ethylene involvement in the cold storage disorder of 'flavortop' nectarine. **Postharvest Biology and Technology**, v. 23, 105-115, 2001
35. FALQUÉ, E.; FERNÁNDEZ, E.; DUBOURDIEU. Differentiation of white wines by their aromatic index. **Talanta**, v. 54, 271-281, 2001
36. FERNANDES, L.; CÔRTE-REAL, M.; LOUREIRO-DIAS, M. C.; LEÃO, C. Glucose respiration and fermentation in *Zygosaccharomyces bailli* and *Saccharomyces cerevisiae* express different sensitivity patterns to ethanol and acetic acid. **Letters in Applied Microbiology**, v. 25, 249-253, 1997
37. FERNANDEZ, M.; ÚBEDA, J. F.; BRIONES, A. I. Typing of non *Saccharomyces* yeasts with enzymatic activities of interest in wine-making. **International Journal of Food Microbiology**, v. 59, 29-36, 2000
38. FERREIRA V.; AZNAR, M.; LÓPEZ, R.; CACHO, J. Quantitative gas chromatography-olfactometry carried out at different dilutions of an extract. Key differences in the odor profiles of four high-quality Spanish aged red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, 4818-4824, 2001
39. FERREIRA V.; FERNÁNDEZ, P.; CACHO, J. F. A study of factors affecting wine volatile composition and its application in discriminant analysis. **Lebensmittel, Wissenschaft und Technologie**, v. 29, 251-259, 1996a

40. FERREIRA V.; HERNÁNDEZ-ORTE, P.; ESCUDERO, A.; LÓPEZ, R.; CACHO, J. Semipreparative reversed-phase liquid chromatographic fractionation of aroma extracts from wine and other alcoholic beverages. **Journal of Chromatography A**, v. 864, 77-88, 1999
41. FERREIRA V.; LÓPEZ, R.; ESCUDERO, A.; CACHO, J. F. Quantitative determination of trace and ultratrace flavour active compounds in red wines through gas chromatographic-ion trap mass spectrometric analysis of microextracts. **Journal of Chromatography A**, v. 806, 349-354, 1998a
42. FERREIRA V.; SHARMAN, M.; CACHO, J. F.; DENNIS, J. New and efficient microextraction/solid-phase extraction method for the gas chromatographic analysis of wine volatiles. **Journal of Chromatography A**, v. 731, 247-259, 1996b
43. FERREIRA, V.; PEÑA, C.; LÓPEZ, R.; CRESPO, C.; CACHO, J. Concentration of small volumes of non polar solutions containing trace volatile compounds. **Journal of Chromatography A**, v. 824, 195-203, 1998b
44. FERREIRA, V.; PET'KA, J.; AZNAR, M. Aroma Extract Dilution Analysis. Precision and optimal experimental design. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, 1508-1514, 2002
45. FERRER, J.; PÁEZ, G.; MÁRMOL, Z.; RAMONES, E.; CHANDLER, C.; MARÍN, M.; FERRER, A. Agronomic use of biotechnologically processed grape wastes. **Bioresouce Technology**, v. 76, 39-44, 2001
46. FISHER, U.; STRASSER, M.; GUTZIER, K. Impact of fermentation technology on the phenolic and volatile composition of German red wines. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 35, 81-94, 2000

47. FRIEDRICH J. E.; ACREE, T. E. Gas chromatography olfactometry (CG/O) of dairy products. **International Dairy Journal**, v. 96, 235-241, 1998
48. GAINVORS, A.; FRÉZIER, V.; LEMARESQUIER, H.; LEQUART, C.; AIGLE, M.; BELARBI, A. Detection of polygalacturonase, pectin-lyase and pectin-esterase activities in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Yeast**, v. 10, n. 10, 1311-1319, 1994
49. GARDNER, N. J.; SAVARD, Y.; OBERMEIER, P.; CALDWELL, G.; CHAMPAGNE, C. P. Selection and characterization of mixed starter cultures for lactic acid fermentation of carrot, cabbage, beet and onion vegetable mixtures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, 261-275, 2001
50. GARRUTI, D. S. **Composição de voláteis e qualidade de aroma do vinho de caju**. Campinas, 2001. 218 p. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas.
51. GIRARD, B.; YUKSEL, D.; CLIFF, M. A.; DELAQUIS, P.; REYNOLDS, A. G. Vinification effects on the sensory, colour and CG profiles of Pinot noir wines from British Columbia. **Food Research International**, v. 34, 483-499, 2001
52. GNANASAMBANDAM, R.; PROCTOR, A. Preparation of soy hull pectin. **Food Chemistry**, v. 65, 461-467, 1999
53. GÓMEZ, E.; LAENCINA, J.; MARTINEZ, A. Vinification effects on changes in volatile compounds of wine. **Journal of Food Science**, v. 59, n. 2, 406-409, 1994
54. GRANCHI, L.; GANUCCI, D.; MESSINI, A.; VICENZINI, M. Oenological properties of *Hanseniaspora osmophila* and *Kloeckera corticis* from wines produced by spontaneous fermentations of normal and dried grapes. **FEMS Yeast Research**, v. 2, 403-407, 2002

55. GUILLOUX-BENATIER, M.; Le FUR, Y.; FEUILLAT, M. Influence of fatty acids on the growth of wine microorganisms *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 20, 144-149, 1998
56. HAMSAVENI, D. R.; PRAPULLA, S. G.; DIVAKAR, S. Response surface methodological approach for the synthesis of isobutyl isobutyrate. **Process Biochemistry**, v. 36, 1103-1109, 2001
57. HAN, B.-Z.; ROMBOUTS, F. M.; NOUT, M. J. R. A Chinese fermented soybean food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 65, 1-10, 2001
58. HANSSON, A.; ANDERSSON, J.; LEUFVÉN, A. The effect of sugars and pectin on flavor release from a soft drink-related model system. **Food Chemistry**, v. 72, 363-368, 2001
59. HART, H. E.; PARISH, M. E.; BURNS, J. K.; WICKER, L. Orange finisher pulp as substrate for polygalacturonase production by *Rhizopus oryzae*. **Journal of Food Science**, v. 56, n. 2, 1991
60. HELLÍN, P.; ROS, J. M.; LAENCINA, J. Changes in high and low molecular weight carbohydrates during *Rhizopus nigricans* cultivation on lemon peel. **Carbohydrate Polymers**, v. 45, 169-174, 2001
61. HENNIES, P. T. **Produção de pectinase de *Penicillium italicum* através de fermentação em meio semi-sólido**. Campinas, 1996. 68 p. Tese (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas.

62. HUANG, C.-Jr; LEE, S.-L.; CHOU, C.-C. Production of 2-phenylethanol, a flavor ingredient, by *Pichia fermentans* L-5 under various culture conditions. **Food Research International**, v. 34, 277-282, 2001
63. IGYOR, M. A.; OGBONNA. A. C.; PALMER, G. H. Effect of malting temperature and mashing methods on sorghum wort composition and beer flavour. **Process Biochemistry**, v. 36, 1039-1044, 2001
64. JACOBS, M. B. **The chemical analysis of food and food products**. Van Nostrand Reinhold Company, 1958
65. JANSSENS, L.; DePOOTER, H. L.; SCHAMP, N. M.; VANDAMME, E. J. Production of flavours by microorganisms. **Process in Biochemistry**, v. 27, 195-215, 1992
66. JOSLYN, M. A. **Methods in food analysis** Academic Press, 1970
67. KALAPATHY, U.; PROCTOR, A. Effect of acid extraction and alcohol precipitation conditions on the yield and purity of soy hull pectin. **Food Chemistry**, v. 73, 393-396, 2001
68. KAR, F.; ARSLAN, N. Characterization of orange pell pectin and effect of sugars, L-ascorbic acid, ammonium persulfate, salts on viscosity of orange pell pectin solutions. **Carbohydrate Polymers**, v. 40, 285-291, 1999
69. KARAM, N. E.; BELARBI, A. Detection of polygalacturonases and pectin esterases in lactic acid bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, 559-563, 1995
70. KASHYAP, D. R.; CHANDRA, S.; KAUL, A.; TEWARI, R. Production, purification and characterization of pectinase from *Bacillus* sp. DT7. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 3, 277-282, 2000

71. KAYSHAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, 215-227, 2001
72. KEMPLER, G. M. Production of flavor compounds by microorganisms. **Advances in Applied Microbiology**, v. 29, 29-51, 1983
73. LANG, C.; DÖRNENBURG, H. Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 4, 366-375, 2000
74. LARSEN, T. O. Volatile flavour production by *Penicillium caseifulvum*. **International Dairy Journal**, v. 8, 883-887, 1998
75. LAW, B. A. Controlled and accelerated cheese ripening: the research base for new technologies. **International Dairy Journal**, v. 11, 383-398, 2001
76. LEE, K.-G.-K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds [*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et Perry]. **Food Chemistry**, v. 74, 443-448, 2001
77. LIMA, A. S.; ALEGRE, R. M.; MEIRELLES, A. J. A. Partitioning of pectinolytic enzymes in polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous two-phase systems. **Carbohydrate Polymers**, 2002, in press
78. LIMBERG, G.; KÖRNER, R.; BUCHHOLT, H. C.; CHRISTENSEN, T. M. I. E.; ROEPSTORFF, P.; MIKKELSEN, J. D. Analysis of different de-esterification mechanisms for pectin by enzymatic fingerprinting using endopectin lyase and endopolygalacturonase II from *A. niger*. **Carbohydrate Research**, v. 327, n. 3, 293-307, 2000a

79. LIMBERG, G.; KÖRNER, R.; BUCHHOLT, H. C.; CHRISTENSEN, T. M. I. E.; ROEPSTORFF, P.; MIKKELSEN, J. D. Quantification of the amount of galacturonic acid residues in blocksequences in pectin homogalacturonan by enzymatic fingerprinting with exo- and endo-polygalacturonase II from *A. niger*. **Carbohydrate Research**, v. 327, n. 3, 321-332, 2000b
80. LINFORTH, R. S. T.; BAEK, I.; TAYLOR, A. J. Simultaneous instrumental and sensory analysis of volatile release from gelatin and pectin/gelatins gels. **Food Chemistry**, v. 65, 77-83, 1999
81. Lo SCALZO, R.; PAPADIMITRU, C.; BERTOLO, G.; MAESTRELLI, D.; TORREGGIANI, D. Influence of cultivar and osmotic dehydration on aroma profiles of muskmelon (*Cucumismelo*, cv *reticulatus* Naud.) spheres. **Journal of Food Engineering**, v. 49, 261-264, 2001a
82. Lo SCALZO, R.; TESTONI, A.; GENNA, A. 'Annurca' apple fruit, a southern Italy apple cultivar: textural properties and aroma composition. **Food Chemistry**, v. 73, 333-343, 2001b
83. LOCKWOOD, G. B. Techniques for gas chromatography of volatile terpenoids from a range of matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 936, 23-31, 2001
84. LOMASCOLO, A.; STENTELAIRE, C.; ASTHER, M.; LESAGE-MEESSEN, L. *Basidiomycetes* as new biotechnological tools to generate natural aromatic flavours for the food industry. **Trends in Biotechnology**, v. 17, 282-289, 1999
85. LÓPEZ, R.; AZNAR, M.; CACHO, J.; FERREIRA, V. Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric determination. **Journal of Chromatography A**, 2002, in press

86. LÓPEZ, R.; FERREIRA, V.; HERNÁNDEZ, P.; CACHO, J. Identification of impact odorants of Young red wines made with Merlot, Cabernet Sauvignon and Grenache grape varieties: a comparative study. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, 1461-1467, 1999
87. MAIORANO, A. E. **Produção de pectinase por fermentação em estado sólido**. São Paulo, 1990. 262 p. Tese (Doutor em Engenharia Química) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo.
88. MANACHINI, P. L.; PARINI, C.; FORTINA, M. G. Pectic enzymes from *Aereobasisium pullulans* LV 10. **Enzyme Microbial and Technology**, v. 10, 682-685, 1988
89. MARQUES, D. B. **Produção e caracterização de aromas de frutas por *Pichia membranaefaciens***. Campinas, 1998. 136 p. Tese (Mestre em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas.
90. MARRIOTT, P. J.; SCHELLIE, R.; CORNWELL, C. Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. **Journal of Chromatography A**, v. 936, 1-22, 2001
91. MARTINS, E. S.; SILVA, D.; da SILVA, R.; GOMES, E. Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochemistry**, v. 37, 949-954, 2002
92. MATEO, J. J.; JIMÉNEZ, M. Monoterpenes in grape juice and wines. **Journal of Chromatography A**, v. 881, 557-567, 2000

93. MATEO, J. J.; JIMÉNEZ, M.; PASTOR, A.; HUERTA, T. Yeast starter cultures affecting wine fermentation and volatiles. **Food Research International**, v. 34, 307-314, 2001
94. MAYANS, O.; SCOTT, M.; CONNERTON, I.; GRAVESEN, T.; BENEN, J.; VISSER, J.; PICKERSGILL, R.; JENKINS, J. Two crystal structures of pectin lyase A from *Aspergillus* reveal a pH driven conformational change and striking divergence in the substrate-binding clefts of pectin and pectate lyases. **Structure**, v. 5, n. 5, 677-689, 1997
95. McCREADY, R. M. Pectin. In: JOSELYN, M. A. **Methods in food analysis**. Academic Press, 1970, 2nd edition, cap. XIX, p. 565-599
96. McCREADY, R. M.; McCOMB, E. A. Extraction and determination of total pectic materials in fruits. **Analytical Chemistry**, v. 24, n. 12, 1986-1988, 1952
97. McKAY, A. M. A plate assay method for the detection of fungal polygalacturonase secretion. **FEMS Microbiology Letters**, v. 56, 355-358, 1988
98. MEDEIROS, A. B. P.; PANDEY, A.; FREITAS, R. J. S.; CHRISTEN, P.; SOCCOL, C. R. Optimization of the production of aroma compounds by *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation using factorial design and response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, 33-39, 2000
99. MESEGUER, I.; AGUILAR, V.; GONZÁLEZ, M. J.; MARTÍNEZ, C. Extraction and colorimetric quantification of uronic acids of the pectin fraction in fruit and vegetables. **Journal of food composition and Analysis**, v. 11, 285-291, 1998
100. MESTRES, M.; BRISTO, O.; GUASH, J. Analysis of organic sulfur compounds in wine aroma. **Journal of Chromatography A**, v. 881, 569-581, 2000

101. MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, 426-428, 1959
102. MOLNÁR-PERL, I. Role of chromatography in the analysis of sugars, carboxylic acids and amino acids in food. **Journal of Chromatography A**, v. 891, 191-197, 2000
103. MOREIRA, N.; MENDES, F.; PEREIRA, O.; GUEDES de PINHO, P.; HOGG, T.; VASCONCELOS, I. Volatiles sulphur compounds in wine related to yeast metabolism and nitrogen composition of grape musts. **Analytica Chimica Acta**, v. 458, 157-167, 2002
104. MOSOOR, M. A.; KALAPATHY, U.; PROCTOR, A. Determination of polygalacturonic acid content in pectin extracts by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 74, 233-238, 2001
105. MUTLU, M.; SARIOGLU, K.; DEMIR, N.; ERCAN, M. T.; ACAR, J. The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part I: viscosimetric determination of enzyme activity. **Journal of Food Engineering**, v. 41, 147-150, 1999
106. NAIDU, G. S. N.; PANDA, T. Performance of pectolytic enzymes during hydrolysis of pectic substances under assay conditions: a statistical approach. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, 116-124, 1999
107. NIELSEN, J. C.; RICHELIEU, M. Control of flavor development in wine during and after malolactic fermentation by *Oenococcus oeni*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 2, 740-745, 1999
108. O'CONNELL, J. E.; FOX, P.F. Significance and applications of phenolic compounds in the production and quality of milk and dairy products: a review. **International Dairy Journal**, v. 11, 103-120, 2001

109. OOIKAAS, L. P.; WEBER, F. J.; BUITELAAR, R. M.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. **Trends in Biotechnology**, v. 18, n. 2, 356-360, 2000
110. ORTEGA, C.; LÓPEZ, R.; CACHO, J.; FERREIRA V. Fast analysis of important wine volatile compounds. Development and validation of a new method based on gas chromatographic-flame ionization detection analysis of dicloromethane microextracts. **Journal of Chromatography A**, v. 923, 205-214, 2001a
111. ORTEGA, L.; LÓPEZ, R.; CACHO, J.; FERREIRA, V. Use of solid-liquid distribution coefficients to determine retention properties of Porapak-Q resins. Determination of optimal conditions to isolate alkyl-methoxypyrazines and β -damascenone from wine. **Journal of Chromatography A**, v. 931, 31-39, 2001b
112. OTTLEY, C. Nutritional effects on new processing technologies. **Trends in Food Science and Technology**, v. 11, 422-425, 2000
113. OYEWOLE, O. B. Characteristics and significance of yeasts' involvement in cassava fermentation for 'fofu' production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 65, 213-218, 2001
114. PAGÁN, J.; IBARZ, A.; LLORCA, M.; PAGÁN, A.; BARBOSA-CÁNOVAS. Extraction and characterization of pectin from stored peach pomace. **Food Research International**, v. 34, 605-612, 2001
115. PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid-state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, 1153-1169, 2000a

116. PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; BRAND, D.; MOHAN, R.; RUSSOS, S. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocess. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, 153-162, 2000b
117. PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, 69-80, 2000c
118. PICCOLI-VALLE, R. H.; PASSOS, F. M. L.; PASSOS, F. J. V.; SILVA, D. O. Production of pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* in bioreactors in the absence of inducer. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, 135-140, 2001
119. PIGGOTT, J. R. Dynamism in flavour science and sensory methodology. **Food Research International**, v. 33, 191-197, 2000
120. PLATA, C.; MILLÁN, C.; MAURICIO, J. C.; ORTEGA, J. M. Formation of ethyl acetate by various species of wine yeasts. **Food Microbiology**, v. 20, 217-224, 2003
121. POLYCHRONIADOU, E.; KANELAKI, M.; ICONOMOPOULOU, M.; KOUTINAS, A. A.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Grape and apple wines volatile fermentation products and possible relation to spoilage. **Bioresource Technology**, v. 87, 337-339, 2003
122. PUGLISI, C. J.; ELSEY, G. M.; PRAGER, R. H.; SKOUROUMOUNIS, G. K.; SEFTON, M. A. Identification of a precursor to naturally occurring β -damascenone. **Tetrahedron Letters**, v. 42, 6937-6939, 2001
123. RAUNKJAER, M.; PEDERSON, D. S.; ELSEY, G. M.; SEFTON, M. A.; SKOUROUMOUNIS, G. K. Precursors to oak lactone: synthesis of gallate ester

- derivatives of 3-methyl-4-hydroxyoctanoic acid. **Tetrahedron Letters**, v. 42, 8717-8719, 2001
124. REHMAN, S.-U.; BANKS, J. M.; BRECHANY, E. Y.; MUIR, D. D.; McSWEENEY, P. L. H.; FOX, P. F. Influence of ripening temperature on the volatile profile and flavour of Cheddar cheese made from raw or pasteurised milk. **International Dairy Journal**, v. 10, 55-65, 2000
125. RHA, E.; PARK, H. J.; KIM, M. O.; CHUNG, Y. R.; LEE, C.-W.; KIM, J. W. Expression of exo-polygalacturonases in *Botrytis cinerea*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 201, 105-109, 2001
126. RIZZATTO, M. L. Estudo da produção de pectinases por *Penicillium italicum* IZ 1584 e *Aspergillus niger* NRRL 3122 por fermentação semi-sólida em bagaço de laranja industrializado. Campinas, 1999. 89 p. Tese (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas.
127. ROJAS, V.; GIL, V. J.; PIÑAGA, F.; MANZANARES, P. Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, v. 70, 283-289, 2001
128. ROMANO, P.; PARAGGIO, M.; TURBANTI, L. Stability in by product formation as a strain selection tool of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, 336-341, 1998
129. ROSILLO, L.; SALINAS, M. R.; GARIJO, J.; ALONSO, G. L. Study of volatiles in grapes by dynamic headspace analysis. Application to the differentiation of some *Vitis vinifera* varieties. **Journal of Chromatography A**, v. 847, 155-159, 1999

130. RYCHLIK, M.; BOSSET, J. O. Flavour and off-flavour compounds of Swiss Gruyère cheese. Identification of key odorants by quantitative instrumental and sensory studies. **International Dairy Journal**, v. 11, 903-910, 2001
131. SABATE, J.; CANO, J.; QUEROL, A.; GUILLAMÓN, J. M. Diversity of *Saccharomyces* strains in wine fermentations: analysis for two consecutive years. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, 452-455, 1998
132. SAKAI, T.; SAKAMOTO, T.; HALLAERT, J.; VANDAMME, E. Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. **Advances in Applied Microbiology**, v. 39, 213-294, 1993
133. SARIOGLU, K.; DEMIR, N.; ACAR, J.; MUTLU, M. The use of commercial pectinase in the fruit juice industry, part 2: Determination of the kinetic behaviour of immobilized commercial pectinase. **Journal of Food Engineering**, v. 47, 271-274, 2001
134. SAWADA, K.; UEDA, M. Enzyme processing of textiles in reverse micellar solution. **Journal of Biotechnology**, v. 89, 263-269, 2001
135. SCHNEIDER, R.; RAZUNGLES, A.; AUGIER, C.; BAUMES, R. Monoterpenic and norisoprenoidic glycoconjugates of *Vitis vinifera* L. cv. Melon B. as precursors of odorants in Muscadet wines. **Journal of Chromatography A**, v. 936, 145-157, 2001
136. SCHRADER, J.; BERGER, R. G. Biotechnological production of terpenoid flavor and fragrance compounds. In: REHN, H.-J.; REED, G.; PÜHLER, A.; STADLER, P. **Biotechnology**. Weinheim: Wiley – VCH, 2001, cap. 13, p. 373-422
137. SHARMA, S. K.; LIPTAY, A.; Le MAGUER, M. Molecular characterization, physical-chemical and functional properties of tomato fruit pectin. **Food Research International**, v. 30, n. 7, 543-547, 1998

138. SHEN, Z.; MANNING, G.; REESE, J. C.; REECK, G. R. Pectin methylesterase from the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae): purification and characterization. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 29, 209-214, 1999
139. SHERFI, S. A.; HAMAD, S. H. Microbiological and biochemical studies on Georgoush fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, 247-252, 2001
140. SIDES, A.; ROBARDS, K.; HELLIWELL, S. Developments in extraction techniques and their application to analysis of volatiles in foods. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 19, n. 5, 322-328, 2000
141. SILVA, C. F.; SCHWAN, R. F.; DIAS, E. S.; WHEALS, A. E. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, n. 2-3, 251-260, 2000
142. SMOGROVIKOVÁ, D.; DOMÉNY, Z. Beer volatile by product formation at different fermentation temperature using immobilized yeasts. **Process Biochemistry**, v. 34, 785-794, 1999
143. SOARES, M. M. C. N.; da SILVA, R.; GOMES, E. Screening of bacterial strains or pectinolytic activity: characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus* sp. **Revista de Microbiologia**, v. 30, n. 4, 299-303, 1999
144. SOARES, M.; CHRISTEN, P.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Fruit flavor production by *Ceratocystis frimbriata* grown on coffee husk in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 8, 857-861, 2000
145. SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, 205-218, 2003

146. SREENATH, H. K.; KOEGEL, R. G.; MOLDES, A. B.; JEFFIES, T. W.; STRAUB, R. J. Ethanol production from alfalfa fiber fractions by saccharification and fermentation. **Process Biochemistry**, v. 36, 1199-1204, 2001
147. SRIROTH, K.; CHOLLAKUP, R.; CHOTINEERANAT, S.; PIYACHOMKWAN, K.; OATES, C. G. Processing of cassava waste for improved biomass utilization. **Bioresource Technology**, v. 71, 63-69, 2000
148. STEPHAN, A.; BÜCKING, M.; STEINHART, H. Novel analytical tools for food flavors. **Food Research International**, v. 33, 199-209, 2000
149. TABASSUM, R.; RAJOKA, M. I. Methanogenesis of carbohydrates and their fermentation products by syntrophic methane producing bacteria isolated from freshwater sediments. **Bioresource Technology**, v. 72, 199-205, 2000
150. TAJCHAKAVIT, S.; BOYE, J. I.; COUTURE, R. Effect of processing on post-bottling haze formation in apple juice. **Food Research International**, v. 34, 415-424, 2001
151. TAKAYANAGI, T.; UCHIBORI, T.; YOKUTSUKA, K. Characteristics of yeast polygalacturonases induced during fermentation on grapes skins. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 52, n. 1, 41-44, 2001
152. TARAGANO, V. M.; PILOSOFF, A. M. R. Application of Dohrlert designs for water activity, pH, and fermentation time optimization for *Aspergillus niger* pectinolytic activities production activities production in solid-state and submerged fermentation. **Enzyme and Microbial technology**, v. 25, 411-419, 1999
153. TSUYUMU, S.; ISHII, S.; NAKAMURA, M. Plate assay for differentiation of different pectinases. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 53, n. 9, 2509-2511, 1989

154. UBEDA, J.; BRIONES, A. Characterization of differences in the formation of volatiles during fermentation within synthetic and grape musts by wild *Saccharomyces* strains. **Lebensmittel, Wissenschaft und Technologie**, v. 33, 408-414, 2000
155. VAILLANT, F.; MILLAN, A.; MILLAN, P.; DORNIER, M.; DECLoux, M.; REYNES, M. Co-immobilized pectinlyase and endo cellulase on chitin and Nylon supports. **Process Biochemistry**, v. 35, 989-996, 2000
156. VALERO, E.; MOYANO, L.; MILLAN, M. C.; MEDINA, M.; ORTEGA, J. M. Higher alcohols and esters production by *Saccharomyces cerevisiae*. Influence of the initial oxygenation of the grape must. **Food Chemistry**, v. 78, 57-61, 2002
157. Van der SLUIS, C.; STOFFELEN, C. J. P.; CASTELEIN, S. J.; ENGBERS, G. H. M.; Ter SCHURE, E. G.; TRAMPER, J.; WIJFFELS, R. H. Immobilized salt-tolerant yeasts: applications of a new polyethylene-oxide support in a continuous stirred-tank reactor for a flavour production. **Journal of Biotechnology**, v. 88, 129-139, 2001a
158. Van Der SLUIS, C.; TRAMPER, J.; WIJFFELS, R. H. Enhancing and accelerating flavour formation by salt-tolerant yeasts in Japanese soy-sauce processes. **Trends in Food Science and Technology**, v. 12, 322-327, 2001b
159. Van RUTH, S. M.; O'CONNOR, C. H. Evaluation of three gas chromatography-olfactometry methods: comparison of odour intensity-concentration relationships of eight volatiles compounds with sensory headspace data. **Food Chemistry**, v. 74, 341-347, 2001
160. VILARIÑO, C.; DEL GIORGIO, J. F.; HOURS, R. A.; CASCONI, O. Spectrophotometric method for fungal pectinesterase activity determination. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v. 26, n. 2, 107-110, 1993

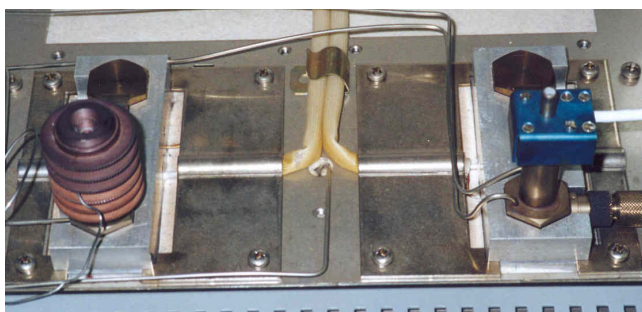
161. VILJOEN, B. C. The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. **International Journal of Food Microbiology**, v. 69, 37-44, 2001
162. WHITAKER, J. R. Pectic enzymes. **Principles of Enzimology for the Food Sciences**, 2nd edition, New York, 425-436, 1994
163. WILLIAMS, M. A. K.; BUFFET, G. M. C.; FOSTER, T. J.; NORTON, I. T. Simulation of endo-PG digest patterns and implications for the determination of pectin fine structure. **Carbohydrate Research**, v. 334, 243-250, 2001
164. WOLLGAST, J.; ANKLAN, E. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. **Food Research International**, v. 33, 423-447, 2000
165. YOO, S. K.; DAY, D. F.; CAXWALLADER, K. R. Bioconversion of α - and β -pinene by *Pseudomonas* sp strain PIN. **Process Biochemistry**, v. 36, 925-932, 2001
166. ZEA, L.; MOYANO, L.; MORENO, J.; CORTES, B.; MEDINA, M. Discrimination of the aroma fraction of Sherry wines obtained by oxidative and biological ageing. **Food Chemistry**, v. 75, 79-84, 2001
167. ZHENG, Z.; SHETTY, K. Solid state production of polygalacturonase by *Lentinus edodes* using fruit processing wastes. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 8, 825-830, 2000
168. ZOHRE, D. E.; ERTEN, H. The influence of *Kloeckera apiculata* and *Candida pulcherrima* yeasts on wine fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, 319-324, 2002

ANEXO 1

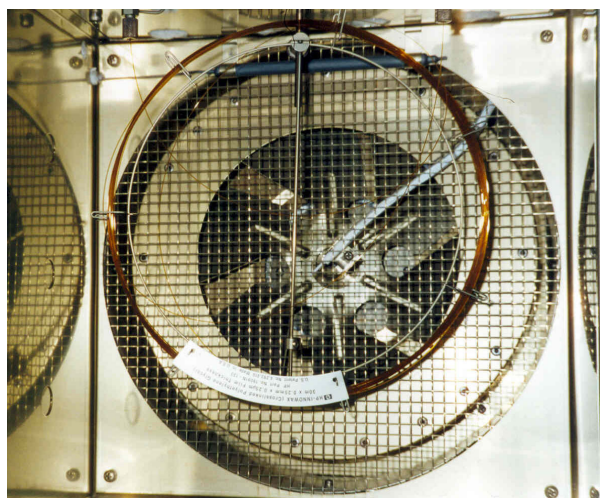
CROMATÓGRAFO



Cromatógrafo CHROMPACK CP 9001.



Vista superior do injetor (esquerda) e do detector (direita).



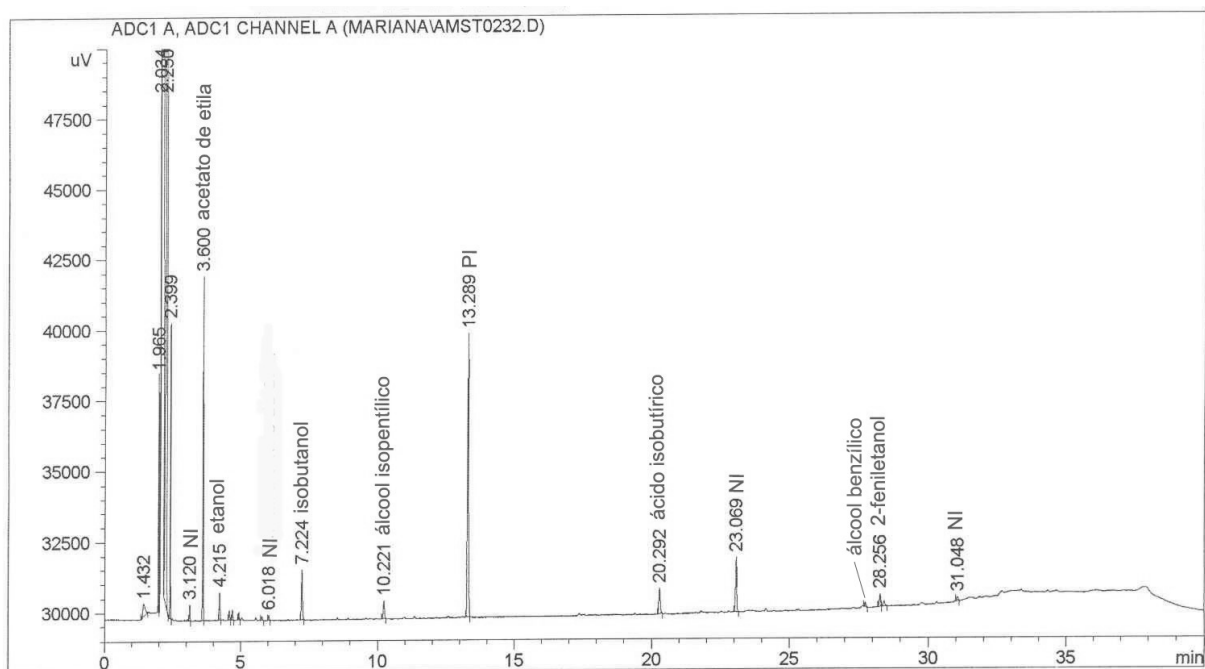
Coluna capilar HP INNOWAX.

ANEXO 2

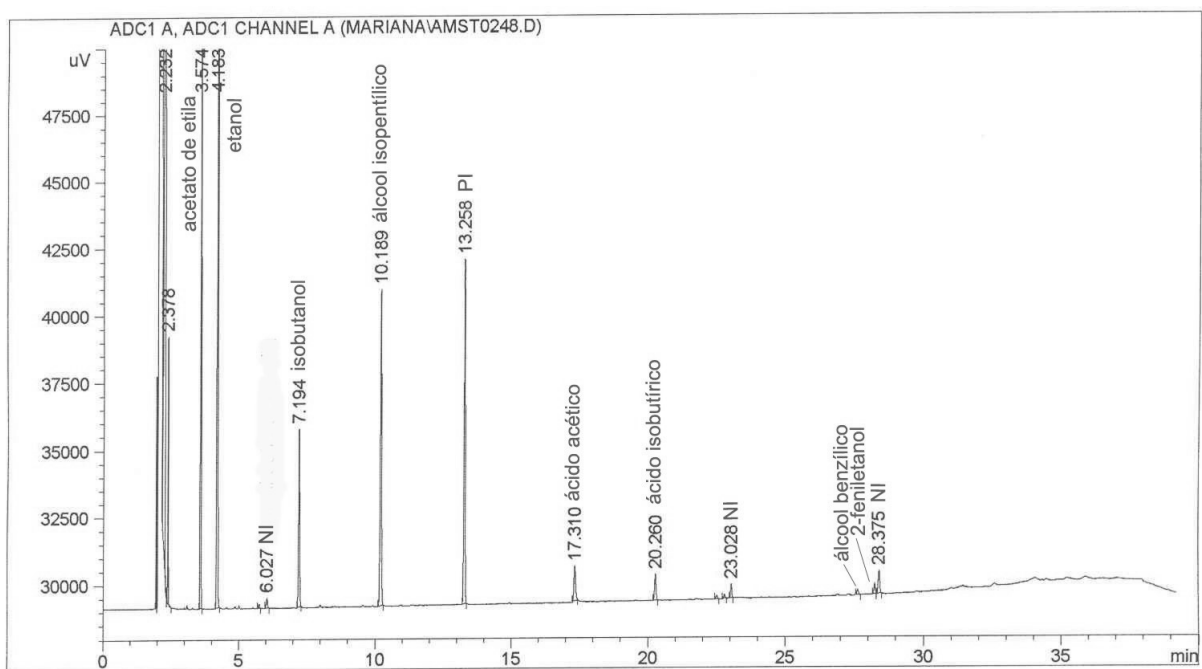
CROMATOGRAMAS

Meio café

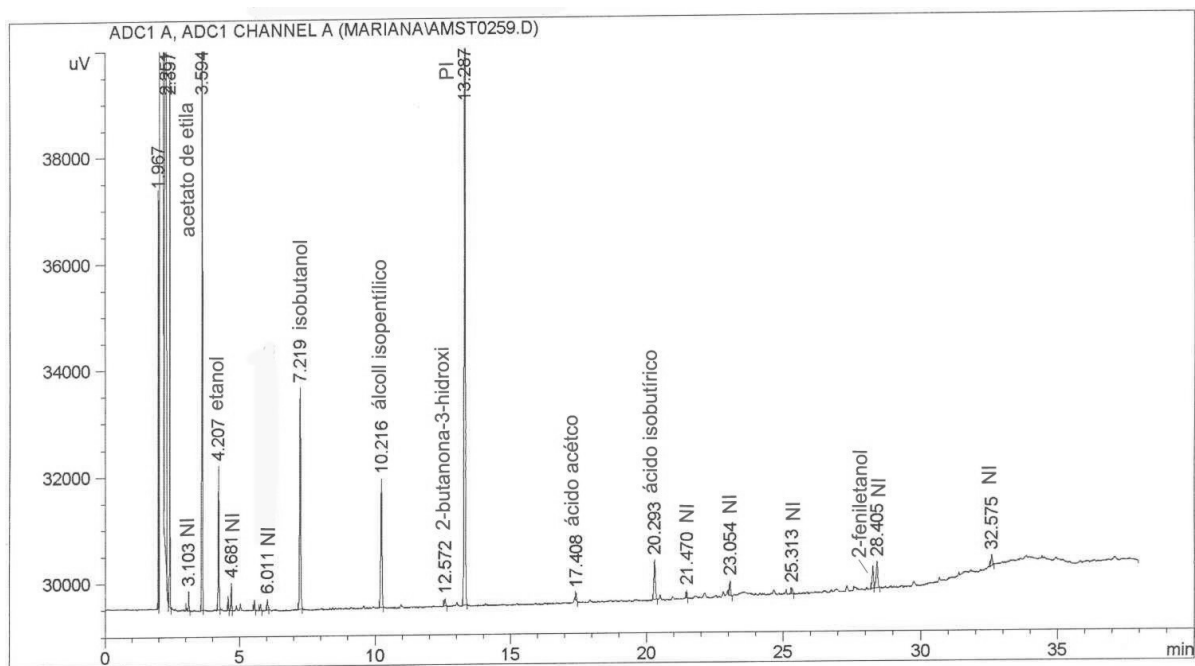
Linhagem 70, 24 h de fermentação.



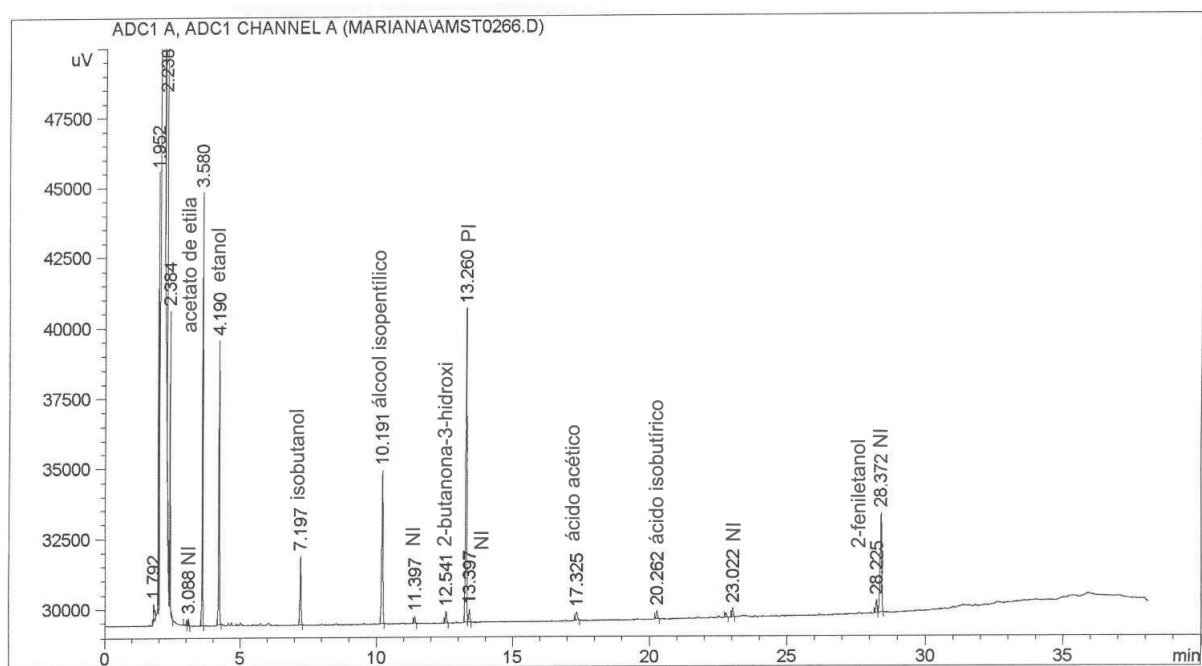
Linhagem 73, 48 h de fermentação.



Linhagem 74, 48 h de fermentação.

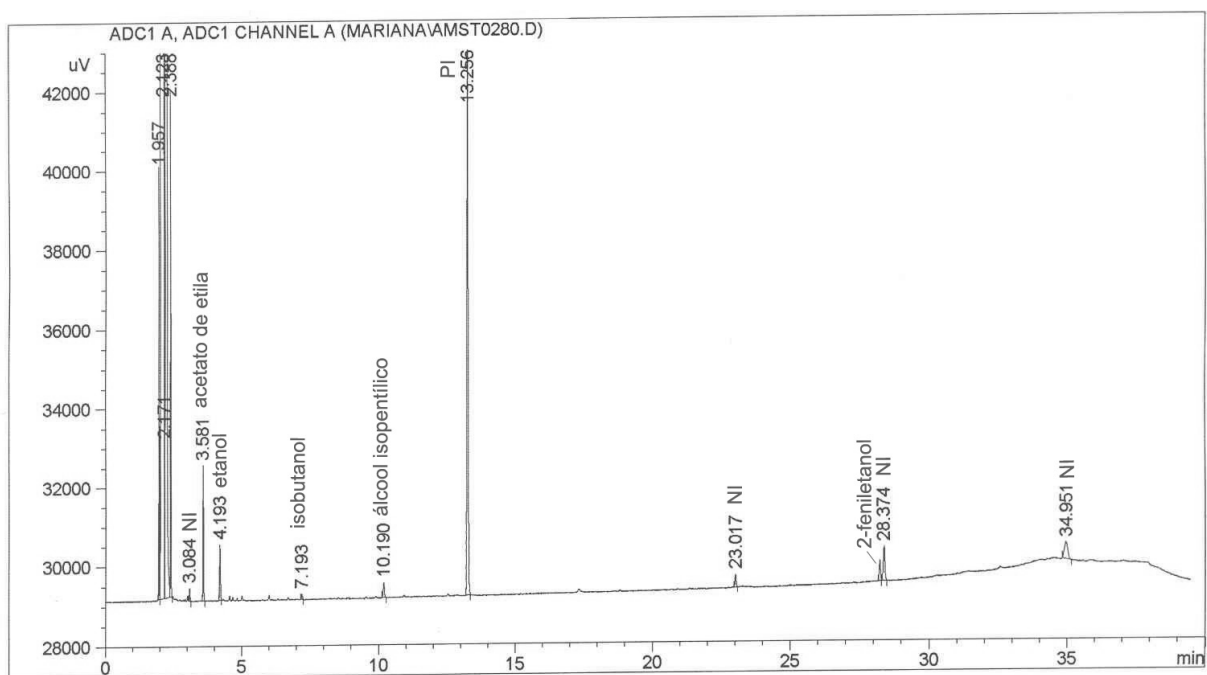


Linhagem 144, 96 h de fermentação.

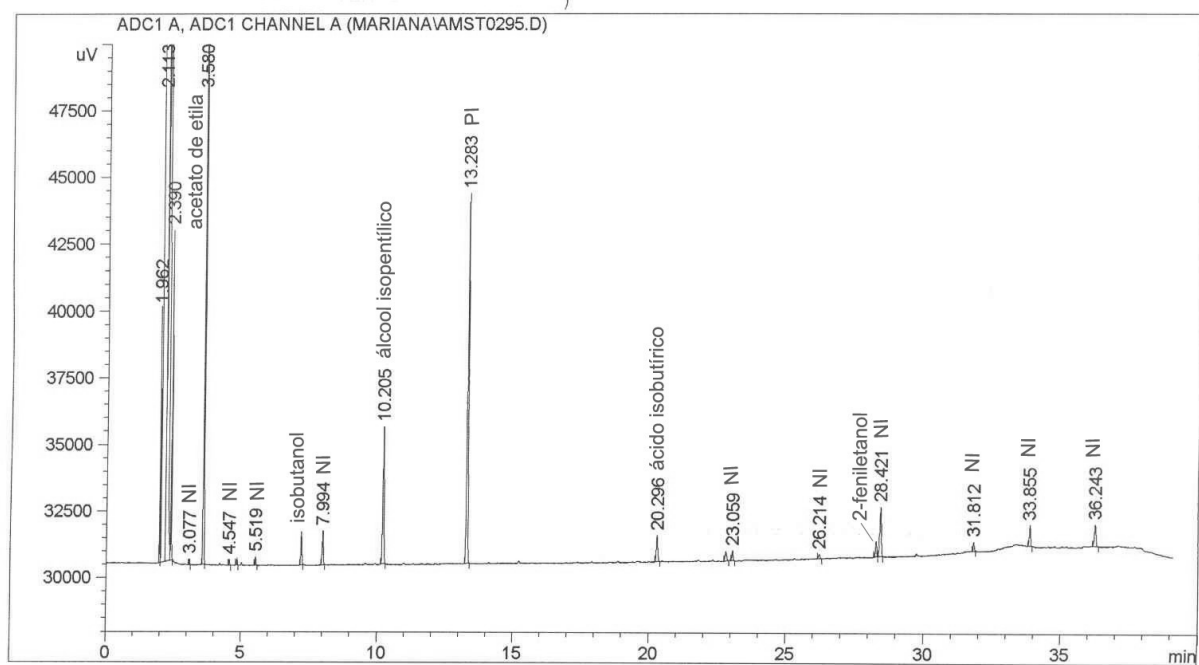


Meio uva

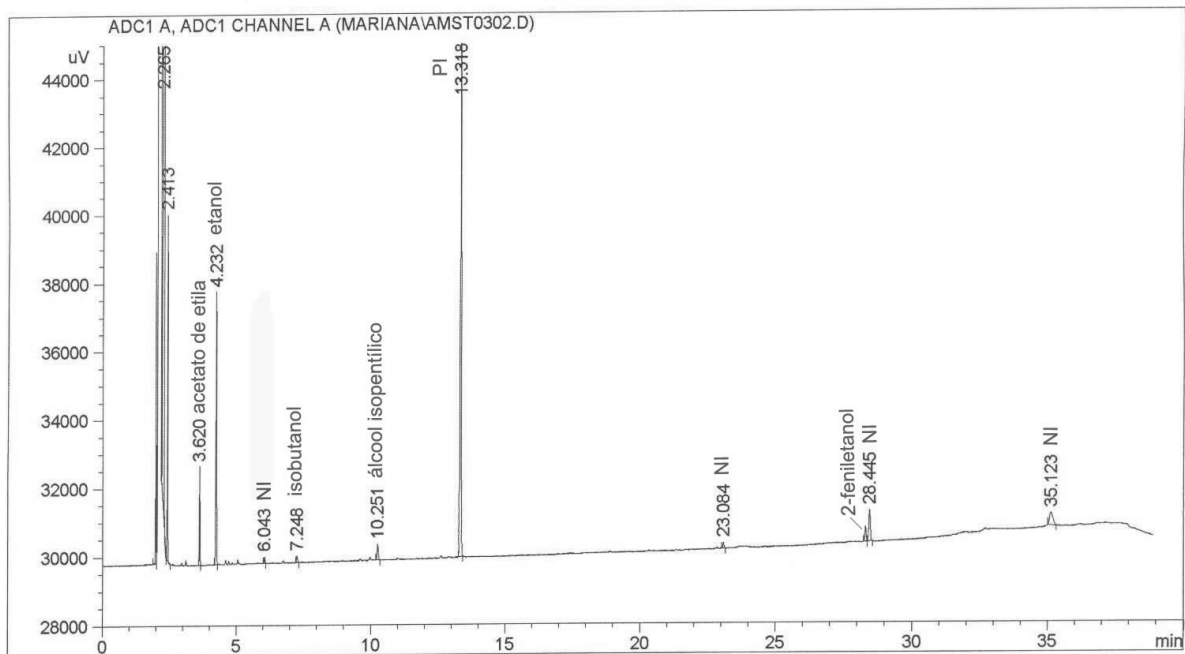
Linhagem 70, 48 h de fermentação.



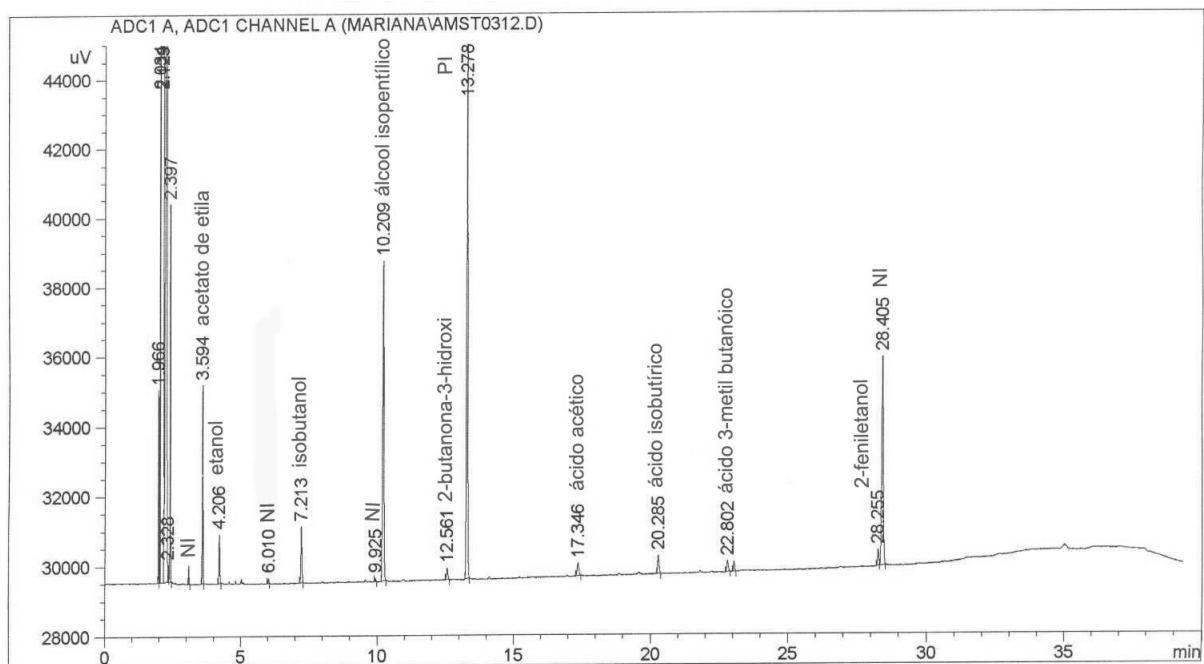
Linhagem 73, 24 h de fermentação.



Linhagem 74, 48 h de fermentação.



Linhagem 144, 48 h de fermentação.



ANEXO 3

ESPECTROS DE MASSAS