UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS - FEA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRA
SEÇÃO CIRCULANT

PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE METILCETONAS POR *ASPERGILLUS SP* E CARACTERIZAÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO

Vinicius D'Arcadia Cruz – Biólogo

Profª Drª Gláucia Maria Pastore – Orientadora

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Vinicius D'arcadia Cruz, aprovada pela Comissão Julgadora em 19 de fevereiro de 2001.

Campinas,19 de fevereiro de 2.001

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
Presidente da Banca

Dissertação à ser apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Campinas
2.001

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

BANCA EXAMINADORA

Profª. Drª. Gláucia Maria Pastore

(Orientadora)

Profª. Drª. Hélia Hamuri Sato

(Membro)

Prof. Dr. José Luiz Pereira

(Membro)

Profª. Drª. Maria Isabel Rodrigues

(Membro)

Vida, linda luz
Caminho, traçado, estrada
Lindo olhar que me seduz
És a minha amada

Na fronte tão singela
O rio encontra o mar
És de todas a mais bela
Luz do meu sonhar

Tu és o meu viver
És fácil te amar
Sem ti só há sofrer
Contigo vou caminhar

Contigo vou viver
Contigo vou amar
Contigo...

À Juliana,

Se tivermos um Amigo,
Nunca nos veremos num deserto,
se tivermos um Amigo.

Nunca nos desesperaremos
em busca de Amor ou de Compreensão
se tivermos um Amigo.

Nossas almas, sentindo essa união,
se preencherão de Amor e de Alegria,
serão fortes diante da rejeição e do desprezo
se tivermos um Amigo.

Perante erros e acertos nós nos alegraremos
e jamais cairemos em desalento ou abandono
se tivermos um Amigo.

Poderemos caminhar em paz e seguros
por sabermos que alguém
se importará conosco
se tivermos um Amigo.

Poderemos ser felizes
diante de qualquer adversidade,
só por termos a certeza
de que há alguém
disposto a nos dar a mão
se tivermos um Amigo.

Eu tenho um Amigo!!!

Ao meu pai,

CRENÇA

Pedro D'Arcadia Neto

Creio, creio verticalmente
nesse amor que apenas
em palavras te posso ofertar.
Engraçado – outrora, eu, vacilante,
descrera até da crença
de em mim acreditar.
Mas agora o meu crer é tão nobre,
que irei pela vida sempre e sempre,
acreditando,
na crença tão linda de te amar!

À minha mãe, dedico.

Senhor,
é impossível não crer em ti,
é impossível não te encontrar.
É impossível não fazer de ti,
nosso ideal.

AGRADECIMENTOS

À Profª. Drª. Gláucia Maria Pastore pela orientação, incentivo e amizade.

Aos professores Dr. José Luiz Pereira e Drª. Maria Isabel Rodrigues pelas correções e sugestões oferecidas.

À Profª. Drª. Hélia Harumi Sato pela inestimável colaboração e pela preciosa atenção.

À Profª. Drª. Adilma pelos equipamentos cedidos.

Aos amigos Berenice, Danielle e Roseli pela ajuda sempre presente e amizade.

Aos amigos Roseli Muniz, Massaharu, Angelita, Contado, Mercedes, Lilian pela amizade.

Ao amigo Joaquim pela ajuda sempre presente, pela boa vontade, pela atenção, pelo incentivo constante e pela sincera amizade.

À Dora e Bia, por partilhar comigo minha caminhada e pela amizade.

Ao Marcão, Marquinho, Ricardo, Jardete e todos da secretaria do Departamento de Ciências de Alimentos pela ajuda e amizade.

Ao Cosme e todos da secretaria de pós graduação, pela ajuda constante.

À CAPS e FAEP pelo suporte financeiro.

Aos funcionários da biblioteca da FEA pela cooperação.

Enfim, a todos os funcionários, professores e amigos que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS ..... **X**

ÍNDICE DE TABELAS ..... **XII**

RESUMO ..... **XIV**

SUMMARY ..... **XV**

1-INTRODUÇÃO **1**

2- OBJETIVOS **5**

3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **6**

4- MATERIAIS E MÉTODOS **36**

4.1- MATERIAIS **36**

4.1.1- Reagentes e materiais específicos 36

4.1.2- Vidraria 36

4.1.3. Equipamentos: 37

4.2- PROCEDIMENTOS **37**

4.2.1- Preparação do extrato enzimático bruto de lipase 37

4.2.1.1- Determinação da atividade enzimática da lipase..... 38

4.2.1.2- Efeito do teor de umidade do meio farelo de trigo, tempo e temperatura de incubação na produção de lipase pela linhagem de Aspergillus sp. *39*

4.2.2- Adequação da relação enzima:substrato..... 39

4.2.3- Avaliação de técnicas para extração das metilcetonas

produzidas em diferentes sistemas de reação 40

4.2.3.1- Sistema de extração líquido-líquido 41

4.2.3.2- Sistema de extração sólido-líquido 41

4.2.4- Análise por cromatografia gasosa das metilcetonas produzidas utilizando o sistema de padronização interna. 42

4.2.4.1- Preparo de soluções estoque dos padrões cromatográficos 42

4.2.4.2- Preparo de soluções dos padrões em diferentes concentrações 42

4.2.5- Produção de metilcetonas 43

4.2.5.1- Otimização da produção de metilcetonas utilizando gordura de coco, creme de leite de vaca e creme de leite de cabra. 43

4.2.6- Efeito do pH na produção de metilcetonas 44

4.2.6.1- Efeito do pH na produção de metilcetonas utilizando gordura de coco, creme de leite de vaca e creme de leite de cabra 44

5-RESULTADOS E DISCUSSÃO 45

5.1- DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LIPASE EM GORDURA DE COCO, CREME DE LEITE DE VACA E DE CABRA 45

5.2- EFEITO DAS CONDIÇÕES DE INCUBAÇÃO DA LINHAGEM *ASPERGILLUS SP.* Nº1068

NA PRODUÇÃO DA LIPASE BRUTA 46

5.2.1- Efeito do tempo e temperatura de incubação na produção da lipase bruta 46

5.2.2- Efeito do teor de umidade do farelo do meio semi-sólido 49

5.3- ADEQUAÇÃO DA RELAÇÃO ENZIMA:SUBSTRATO 53

5.4- EXTRAÇÃO DAS METILCETONAS POR DIFERENTES SISTEMAS..... 54

5.5- EFEITO DO TEMPO DE REAÇÃO NA PRODUÇÃO DE METILCETONAS UTILIZANDO CREME DE LEITE DE VACA E CREME DE LEITE DE CABRA COMO SUSTRATO. 55

5.6- OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METILCETONAS UTILIZANDO GORDURA DE COCO57

5.6.1- Efeito do pH na produção de metilcetonas a partir de gordura de coco foi testado como descrito no ítem 4.2.6..... 57

5.6.2- Efeito do tempo e temperatura na produção de 2-pentanona a partir de gordura de coco foi testado como descrito no ítem 4.2.5 58

*5.6.3- Efeito do tempo e temperatura na produção de 2-nonanona a partir de gordura de coco foi testado como descrito no ítem 4.2.5*59

5.6.4- Efeito do tempo e temperatura na produção de 2-undecanona a partir de gordura de coco foi testado como descrito no ítem 4.2.5..... 60

5.6.5- Efeito do tempo e temperatura na produção de 2-heptanona a partir de gordura de coco foi testado como descrito no ítem 4.2.5 61

5.6.6- Comparação do total de metilcetonas produzidas em relação a metilcetona 2-heptanona 63

6- CONCLUSÕES **69**

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **70**

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: FOTOMICROGRAFIA DA LINHAGEM Nº 1068 DE *ASPERGILLUS SP.* 3

FIGURA 2: FOTOMICROGRAFIA COM HIFA SEPTADA EM DETALHE. 3

FIGURA 3: FOTOMICROGRAFIA COM CONÍDIA EM DETALHE. 4

FIGURA 4: EFEITO DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO NA PRODUÇÃO DE LIPASE PELO *ASPERGILLUS SP* 1068 A 35ºC EM MEIO COMPOSTO POR FARELO DE TRIGO:ÁGUA NA PROPORÇÃO 40:60. 48

FIGURA 5: EFEITO DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE LIPASE PELO *ASPERGILLUS SP* 1068 EM MEIO COMPOSTO POR FARELO DE TRIGO:ÁGUA NA PROPORÇÃO 40:60, APÓS 120 HORAS DE FERMENTAÇÃO. 49

FIGURA 6: EFEITO DO TEOR DE UMIDADE NO MEIO FARELO DE TRIGO NA PRODUÇÃO DE LIPASE *ASPERGILLUS SP* 1068.....50

FIGURA 7: EFEITO DA TEMPERATURA E TEMPO DE INCUBAÇÃO NA PRODUÇÃO DE LIPASE PELA LINHAGEM DE *ASPERGILLUS SP.* 1068 EM MEIO FARELO DE TRIGO COM 60% DE UMIDADE. 52

FIGURA 8: EFEITO DO TEOR DE UMIDADE DO MEIO FARELO DE TRIGO E TEMPO DE INCUBAÇÃO NA PRODUÇÃO DE LIPASE PELA LINHAGEM DE *ASPERGILLUS SP.* 1068 A 35ºC. 52

FIGURA 9: EFEITO DA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO E UMIDADE DO MEIO FARELO DE TRIGO NA PRODUÇÃO DE LIPASE PELA LINHAGEM DE *ASPERGILLUS SP.* 1068 APÓS 120 HORAS DE FERMENTAÇÃO.....53

FIGURA 10: CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA E VELOCIDADE DE HIDRÓLISE.....54

FIGURA 11: TESTE DE RECUPERAÇÃO DAS METILCETONAS EM SISTEMAS DISTINTOS.....55

FIGURA 12: EFEITO DO PH NA PRODUÇÃO DAS METILCETONAS UTILIZANDO GORDURA DE COCO COMO SUBSTRATO. 58

CROMATOGRAMA 1- PADRÃO CROMATOGRÁFICO – (7.752 – 2 PENTANONA, 13.912 – 2 HEPTANONA, 18.469 – CAPROATO DE ETILA, 22.259 – 2 NONANONA, 30.362 – 2 UNDECANONA......62

CROMATOGRAMA 2- AMOSTRA COM GORDURA DE COCO, SUBMETIDA A UMA TEMPERATURA DE 30°C POR 24 HORAS......62

FIGURA 14: CONCENTRAÇÃO DE METILCETONAS TOTAIS EM COMPARAÇÃO AO TEOR DE HEPTANONA 64

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA1: DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE LIPASE EM GORDURA DE COCO, CREME DE LEITE DE VACA E DE CABRA.....45

TABELA 2: EFEITO DO TEMPO DE REAÇÃO NA PRODUÇÃO DAS METILCETONAS A PARTIR DE CREME DE LEITE DE VACA A 30ºC.....56

TEMPO DE REAÇÃO (HORAS) 56

TABELA 3: EFEITO DO TEMPO DE REAÇÃO NA PRODUÇÃO DAS METILCETONAS A PARTIR DE CREME DE LEITE DE CABRA A 30ºC.....56

TEMPO DE REAÇÃO (HORAS) 56

TABELA 4: EFEITO DO TEMPO E TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DA 2-PENTANONA EM PH 5,5, UTILIZANDO GORDURA DE COCO COMO SUBSTRATO. 59

TEMPO DE REAÇÃO (HORAS) 59

TABELA 5: EFEITO DO TEMPO E TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DA 2-NONANONA (VALORES EXPRESSOS EM MG/G DE SUBSTRATO–PH 5,5) A PARTIR DE GORDURA DE COCO.....60

TABELA 6: EFEITO DO TEMPO E TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DA 2-UNDECANONA (VALORES EXPRESSOS EM MG/G DE SUBSTRATO–PH 5,5) A PARTIR DE GORDURA DE COCO.....61

TABELA 7: EFEITO DO TEMPO E TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DA 2-HEPTANONA (VALORES EXPRESSOS EM MG/G DE SUBSTRATO–PH 5,5)...62

RESUMO

As lipases são dotadas de ação hidrolítica sobre óleos e gorduras, produzindo ácidos graxos, glicerol, monoglicerídeos e/ou diglicerídeos. Além disso, lipases produzidas por *Penicillium roqueforti, Penicillium camemberti* e *Geotrichum candidum* contribuem para a produção de aroma e sabor característicos em queijos do tipo "Blue Cheese", os quais são desenvolvidos, principalmente, pela presença de metilcetonas. Nos últimos tempos, alguns autores vêm discutindo a possibilidade do emprego de algumas espécies de *Aspergillus* na produção de concentrados destes compostos, para utilização em produtos alimentícios com aroma de "Blue Cheese". Este trabalho teve como objetivo otimizar a produção de metilcetonas utilizando lipase extracelular de *Aspergillus sp.* pré selecionada. Para produção da lipase utilizou-se um meio de cultivo com farelo de trigo e as melhores condições para esta produção foram 60% de umidade após 120 horas de incubação a 35ºC. Como substratos foram testados creme de leite de vaca, creme de leite de cabra e gordura de coco sendo que, apenas o último foi considerado adequado devido ao seu conteúdo de ácido láurico (C-12:0) pelo qual a lipase utilizada mostrou afinidade. Neste substrato, a maior produção de metilcetonas totais foi 4,43 mg/g, obtida em pH 5,0 após 48 horas de incubação a 30ºC. Nestas condições a metilcetona produzida em maior quantidade foi a 2-heptanona equivalendo a 3,98 mg/g de óleo de coco. Este pode ser considerado um bom resultado com potencialidade para aplicação industrial.

SUMMARY

Lipases are able to hydrolyse oil and fats, producing fat acids, glicerol, monoglicerides and/or diglicerides. Besides, lipases from *Penicillium roqueforti*, *Penicillium camemberti* and *Geotrichum candidum* contribute to the aroma and characteristic flavor production of the "blue cheese" that are developed, mainly, by the methyl ketones presence. Lately some authors have been discussing the possibility of employement of some *Aspergillus* strains in the production of concentrated of these compounds for obtaining of nutritious products containing "blue cheese" aroma. The aim of this work was to optimize the methyl ketones production by a *Aspergillus sp* strain, previously selected as extracellular lipase producer. For lipase production, wheat bran was utilized as culture medium and the best conditions were found with 60% of humidity, after 120 h of incubation, at 35ºC. For methyl ketone synthesis cow and goat cream milk and coconut fat were tested as substract and only the latter was considered appropriated due to its lauric acid (C-12:0) with which the used lipase showed affinity. In this substrate, the largest total methyl ketones production was 4,43 mg/g, obtained in pH 5,0, after 48 h of incubation, at 30ºC. In that condition, 2-heptanone was the principal methyl ketone produced rising to 3.98 mg/g of coconut oil. This can be considered a good result with potentiality for industrial application.

1-INTRODUÇÃO

As lipases são conhecidas por sua ação hidrolítica sobre óleos e gorduras, dando origem a ácidos graxos, glicerol, monoglicerídeos e diglicerídeos. Podem, ainda, executar a reação inversa de esterificação em condições adequadas de reação. Lipases são encontradas no pâncreas, plasma sangüíneo, saliva, suco pancreático, leite, em plantas oleoginosas como soja, amendoim e mamona e também em microrganismos como fungos, leveduras e bactérias. As diferentes fontes produzem lipases com distintas propriedades fisico-químicas.

Tais enzimas são importantes na indústria de alimentos pois, podem produzir rancidez em produtos lácteos, carnes, peixes e outros. Por outro lado, podem contribuir para a produção de aroma e sabor característicos em determinados tipos de produtos, bem como vários tipos de queijos. Um dos principais processos para produção de queijo, com aroma bastante intenso e característico, é aquele no qual se adicionam fungos durante a maturação, dando origem aos queijos denominados *Blue Cheese*. Entre esses fungos, se destacam o *Penicillium roqueforti, Penicillium camemberti* e *Geotrichum candidum*.

Nos últimos tempos, alguns autores vêm discutindo a possibilidade do emprego de algumas espécies de *Aspergillus* na

produção de aroma de queijo do tipo *Blue Cheese,* a partir de diversas fontes lipídicas.

Para o desenvolvimento de um bom aroma deste tipo de queijo, através de microrganismos, é necessário que estes possuam um conjunto de enzimas específicas que atuem no catabolismo da lactose, dos lipídeos e das proteínas, produzindo os numerosos compostos presentes em seu aroma. Estes são representados, principalmente, por moléculas de ácidos graxos de cadeia curta e metilcetonas, além das cetonas, álcoois, ésteres, compostos de enxofre, aldeídos, lactonas, pirazinas e aminas.

O mecanismo de formação das metilcetonas segue os primeiros passos da β-oxidação de ácidos graxos até a formação das Ceto-Acil-CoA. Estas são convertidas à metilcetonas por duas enzimas: uma tiolase e uma descarboxilase, liberando CO_2 e as metilcetonas com números ímpares de átomos de carbono, sempre com um a menos do que o do ácido graxo de origem.

Costa, (1996) trabalhando com uma coleção de 689 linhagens de fungos de diversas regiões do Brasil, no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, isolou as linhagens 1068 e 1099 de *Aspergillus sp* produtoras de

lipases extracelulares, que ao atuarem sobre gordura de leite de cabra e vaca e gordura de coco, mostraram ter potencial para produção de aroma característico do queijo do *tipo Blue Cheese*. Surgiu então, a idéia da produção de aroma por via biotecnológica. Posteriormente, inaugurou-se o Laboratório de Bioaromas, no qual desenvolvem-se inúmeros trabalhos nesta área.

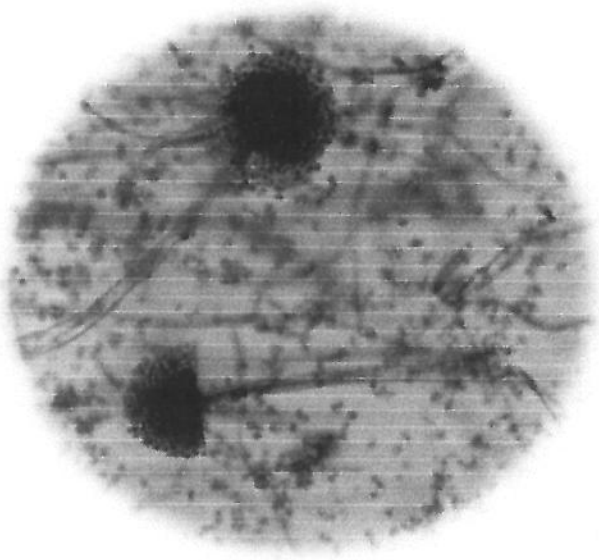


Figura 1: Fotomicrografia da linhagem nº 1068 de *Aspergillus sp*.

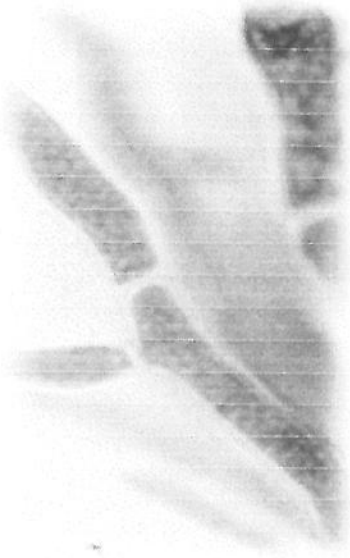


Figura 2: Fotomicrografia com hifa septada em detalhe.

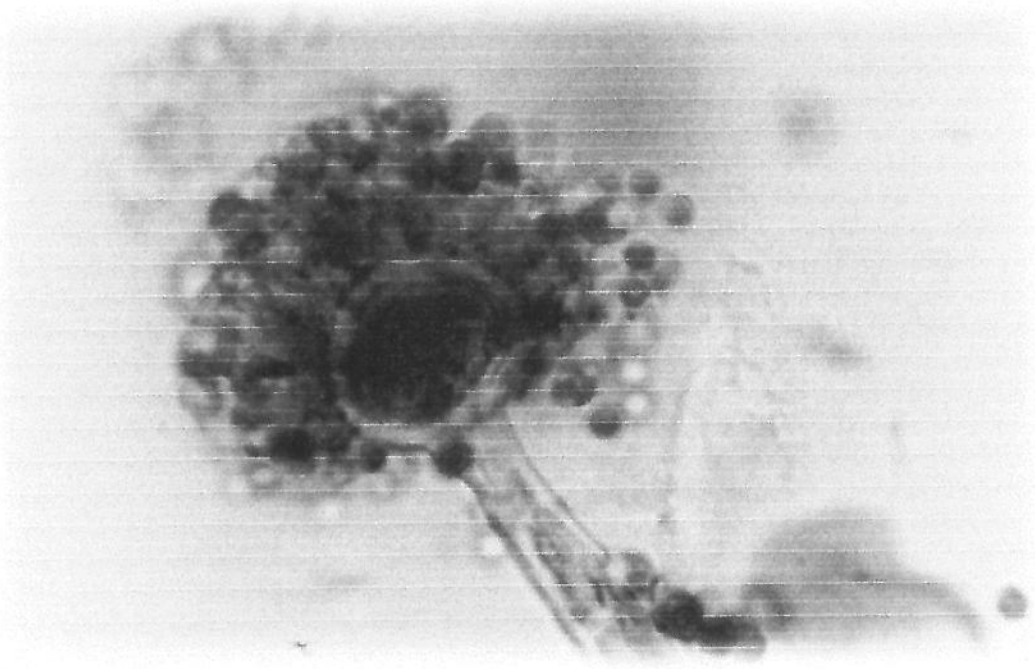


Figura 3: Fotomicrografia com conídia em detalhe.

2- OBJETIVOS

1) Otimizar a produção de lipase pela linhagem *Aspergillus sp* 1068, por fermentação semi-sólida, em função da temperatura e umidade do meio de cultura e tempo de incubação;

2) Estudar as melhores condições de produção de metilcetonas, tais como: temperatura, pH, tempo e substrato mais adequado, entre o creme de leite de vaca, creme de leite de cabra e gordura de coco pela citada linhagem.

3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1- Desenvolvimento de metodologias

O emprego do *Penicillium roqueforti*, e *P. camemberti* no desenvolvimento de aromas intensos e característicos de alguns tipos de queijos é muito antigo. Conta a lenda que há mais de 2000 anos, um jovem pastor francês guiara suas ovelhas para pastar próximo à uma pequena vila chamada Roquefort. Tendo sido surpreendido por uma forte tempestade abrigou-se em uma caverna, onde esqueceu seu lanche. Retornando à mesma, várias semanas depois, notou que o pão havia endurecido tornado-se impróprio para o consumo. Entretanto, o queijo, apesar de mostrar "pequenas veias" escuras em seu interior, apresentava-se com cheiro e gosto muito melhores que anteriormente. A população de Roquefort considerou o fato como um milagre, passando a levar seus queijos à mesma caverna, para transformá-los em "blue cheese". Quanto ao queijo do tipo Camembert teria sido obtido pela primeira vez em 1791 por Marie Fontaine nativa de uma pequena vila francesa denominada Camembert que lhe emprestou o nome.

Entretanto, apesar de seu conhecimento e uso seculares, somente a partir dos meados do Século XX surgiu a preocupação dos pesquisadores em entender o mecanismo pelo qual os microrganismos,

utilizados na maturação destes queijos, podem produzir tais alterações aromáticas. Hoje, sabe-se que tais aromas são desenvolvidos pela ação de um sistema enzimático que libera ou sintetiza vários compostos, como ácidos graxos de cadeia curta e, principalmente, as metilcetonas. O completo entendimento de tal processo se deveu ao desenvolvimento progressivo de uma metodologia adequada de extração e análise das metilcetonas e ácidos graxos

SCHUWARTZ & PARKS (1963) estudaram duas maneiras de extrair e analisar metilcetonas em algumas amostras de "Blue Cheese" comerciais, uma delas usando destilação para o isolamento das metilcetonas e uma outra não envolvendo destilação e aquecimento dos compostos voláteis. Nesse segundo método as amostras de queijo foram extraídas com hexano livre de compostos carbonílicos e alíquotas dessa solução foram analisadas quantitativamente com derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. Duas novas metilcetonas foram descorbertas: 2-undecanona e 2- tridecanona que não apareceram no método clássico utilizando destilação, talvez por apresentarem ponto de ebulição muito elevado. 2-Heptanona foi o maior constituinte em todas as amostras, no entanto, foi relatada uma variação quantitativa nas diferentes metilcetonas em todas as amostras.

ANDERSON & DAY (1965) analisaram quantitativamente os principais ácidos graxos importantes para o aroma de queijo. Foram analisadas quatro amostras de queijo utilizando-se colunas cromatográficas recheadas com ácido silícico. As frações eluídas foram tituladas com KOH utilizando fenolftaleína como indicador. As frações foram esterificadas com metanol/H_2SO_4 e os ésteres metílicos dos ácidos graxos foram analisados por cromatografia gasosa. Os principais ácidos graxos encontrados foram: ácido cáprico, ácido capróico, ácido caprílico, ácido palmítico, ácido oleico entre outros em menor quantidade.

LIEBICH *et. al.* (1970) estudaram diferentes variedades de queijos, inclusive queijos do tipo "Blue Cheese". A metodologia utilizada foi a de centrifugar o queijo por 10 a 15 minutos a 4.000 rpm à temperatura ambiente. Analisou-se o óleo obtido por cromatografia gasosa uma vez que possuía um aroma característico do queijo. Foram encontrados em amostras de "Blue Cheese", metilcetonas com 3, 5, 7, 9 e 11 átomos de carbono. Alguns ésteres tais como butirato de etila, butirato de metila, hexanoato de etila, hexanoato de metila e octanoato de etila também foram encontrados. Os constituintes dos queijos

Cheddar e Limburger foram também estudados e se mostraram bastante diferentes.

DARTEY & KINSELLA (1971) estudaram as mudanças na quantidade de compostos carbonílicos, principalmente nas metilcetonas, durante o processo de maturação dos "Blue Cheese". A análise foi feita derivatizando-se o extrato hexânico das amostras dos queijos com 2,4-dinitrofenilhidrazina e separando-se esses derivados utilizando-se uma coluna recheada com celite ativada/Sea Sorb 43. As frações das metilcetonas foram regeneradas com ácido sulfúrico concentrado e a concentração relativa das metilcetonas individuais determinadas por cromatografia gasosa. No início do processo de maturação o conteúdo carbonílico foi pequeno, sendo de 1,86 μmol/10g de queijo seco em metilcetonas. Após 70 dias de maturação esse teor aumenta para 120,4 μmol/10g de queijo seco. As principais metilcetonas encontradas foram: 2-heptanona e 2-nonanona representando ambas de 50 a 94% do total das metilcetonas presentes.

Até então a cromatografia gasosa tradicional vinha sendo utilizada tanto na quantificação dos ácidos graxos precursores como das metilcetonas. KINDERLERER (1987) introduziu a cromatografia gasosa associada à espectroscopia de massa para acompanhar a

metabolização de gordura de coco até a formação de metilcetonas e pequenas concentrações de álcoois secundários. O autor concluiu que tal associação aumentou a confiabilidade das análises. YAGI et al (1889) utilizou-se de um sistema de cromatografia gasosa acoplada a detector seletivo de massas para identificação dos compostos formados na metabolização de ésteres de ácidos graxos até metilcetonas com um átomo de carbono a menos que o ácido original, empregando o sistema enzimático utilizado pelo Trichoderma sp. O mesmo sistema de cromatografia gasosa acoplada a detetor seletivo de massas foi utilizado por FRUTOS et. al. (1991) para a caracterização dos compostos voláteis responsáveis pelo aroma de alguns tipos de queijo. Foi encontrada uma série de metilcetonas homólogas em algumas espécies de queijo artesanal produzidos pela adição de fungo à massa do queijo fresco. Foram identificados aproximadamente 46 compostos dentre os quais se destaca a presença de grandes quantidades de álcoois secundários e de ácidos graxos livres.

A cromatografia gasosa associada a espectroscopia de massa foi generalizada e vem sendo utilizado como o mais eficiente método de análise de voláteis aromáticos no momento. Utilizando esta técnica, DIRINCK & De WINNE (1999) da Universidade Católica de Tecnologia

da Bélgica estabeleram o perfil das frações voláteis das variedades de queijos Emmental e Gouda fabricados na Bélgica, Suiça, França e Áustria. De maneira geral estas frações eram compostas por ácidos graxos, metilcetonas, lactonas aldeídos e alkenos. Assim os queijos tipo Gouda de diferentes produtores apresentaram padrões de aroma similar enquanto os do tipo Emmental mostraram diferenças pronunciadas de um produtor para outro. Queijos do tipo Emmental provenientes da França e Suiça foram claramente diferenciados dos de outras origens.

Tentando conseguir uma maior estabilidade na formação das metilcetonas, LARROCHE *et. al.* (1989a) promoveram a biossíntese de 2-heptanona a partir de ácido octanóico por esporos de *P. roqueforti* imobilizados em alginato de cálcio incluso em um copolímero de eudragit RL. O meio de biotransformação foi constituído de 5μmol de octanoato de sódio, 167μg/mL de cloranfenicol, 0,5mg/mL de L-alanina e 1g/150 mL de meio de biocatalisador (esporo imobilizado), na concentração de 2 X 10^7 esporos por mL de meio. A baixa estabilidade dos géis de alginato na presença de tampão fosfato foi diminuída pela presença da mistura, alginato de cálcio e o copolímero eudragit RL. Entretanto não foi suficiente para aumentar a resistência da imobilização frente a esse tipo de tampão. Foi desenvolvido então um

sistema sem tamponamento utilizando octanoato de sódio para produção de metilcetonas. LARROCHE & GROS (1989b) utilizaram o mesmo sistema de imobilização dos esporos para transformação de ácido octanóico à 2-heptanona por esporos de *P. roqueforti* testando este sistema, tanto através de bateladas, como por processo contínuo. O meio de transformação consistiu de ácido octanóico ou octanoato de sódio, 0,2ml/L de etanol (ativador) e 167 mg/L de cloranfenicol. O pH foi ajustado para 5,5-6,5 com HCl ou NaOH e 2,33 g do gel contendo 2 X 10^7 cels./mL de meio. O processo foi monitorado através da medida de volume de HCl gasto para manter o pH idêntico ao inicial devido à reação de equilíbrio ácido/base do ácido octanóico/octanoato de sódio.

LLANO *et. al.* (1990) estudaram a composição dos componentes voláteis de "Blue Cheese" artesanal denominado Gamonedo. Foi utilizada a técnica de extração/destilação simultâneas (SDE) do queijo obtendo-se um óleo que foi diretamente analisado através da técnica de cromatografia gasosa acoplada a detector seletivo de massas. Foram identificados aproximadamente 40 compostos dos mais de 100 isolados. Os principais constituintes encontrados foram 2-nonanona, 2-heptanona, decanoato de metila, 2-tridecanona, entre outros. Foi estudada também a variação de alguns

compostos, principalmente as metilcetonas, durante o processo de maturação desses queijos. Observou-se que em 60 dias houve o pico máximo de metilcetonas sendo 2-nonanona o maior constituinte (100 μg/g de queijo). Os álcoois secundários derivados das metilcetonas aparecem em concentração máxima em aproximadamente 65 dias na concentração de 15 μg/g de queijo, no caso do 2-nonanol.

PANNEL & OLSON (1991) desenvolveram o sistema por "headspace" acoplado a cromatografia gasosa para analisar a produção de metilcetonas baseado em utilização de gordura de leite , lipase pancreática e esporos de *P. roqueforti* microencapsulados. Ao incubarem 10g dessas microcápsulas a 10°C com porções daquela gordura obtiveram como principais metilcetonas a 2-pentanona, 2-heptanona e 2-nonanona na concentração de 15 mg/g de cápsulas.

TAYLOR (1995) monitorou a formação de aroma de "Blue Cheese" por Cromatografia Gasosa "on-line" utilizando 8 diferentes linhagens de *P. roqueforti*. O meio consistiu de creme de leite, água e foi mantido com agitação de 400 rpm a 25°C por 8 a 29 dias. O monitoramento foi feito determinando-se os níveis de produção de 2-pentanona do fermentado "on-line". O máximo de 2-pentanona obtido foi de 100 ppm. O produto final foi então esterilizado sob pressão a

altas temperaturas por curto tempo, no entanto mesmo nessas condições geralmente foi perdido metade da quantidade de 2-pentanona produzida no fermentador devido à sua grande volatilidade.

PIRAPREZ *et al* (1998) utilizando o sistema "head space" - cromatografia gasosa, estudaram as interações entre lipídios e diversos compostos aromáticos como aldeídos, esters, dimetilsulfetos e metilcetonas em queijos frescos, trioleína e água. Concluíram que os tempos de retenção de todas as moléculas aromáticas aumentam com a concentração de trioleína. Segundo os autores o fenômeno á altamente influenciado pela estrutura do composto aromático e dentro de uma mesma família química existe um relacionamento linear entre o índice lipofilicítico k(w) e retenção, indicando que esta propriedade físico-química deve ser levada em conta na escolha do padrão analítico interno.

SBAMPATO *et al* (2000) avaliaram a influência de dois sistemas de pasteurização ("hight temperature short tima" – HTST- e ejeção de vapor) nas características sensoriais e físico-químicas de queijos tipo Gorgonzola. Amostras foram analisadas aos 5, 25, 45, 65 e 85 dias de maturação. Ao longo deste período o pH, o índice de acidez e a razão sais/umidade aumentaram gradativamente. Queijos

manufaturados com leite pasteurizado pelo sistema HTST apresentaram médias de pH mais altas que os manufaturados com leite pasteurizado pelo sistema de ejeção de vapor. Leites pasteurizados pelo sistema de ejeção de vapor produziram queijos com maior índice de acidez (lipólise) e metilcetonas que também indicam maior atividade lipolítica nestes queijos. Avaliação sensorial desenvolvida aos 65 dias de maturação mostra que não houve diferenças significativas entre os dois tratamentos em relação ao aspecto exterior, cor, consistência, textura e flavor. Entretanto, foi verificado diferença significativa entre os dois tratamentos em relação ao aroma e desenvolvimento de fungos. Queijos manufaturados com leite tratado pelo sistema de ejeção de vapor mostraram maior atividade lipolítica e massa mais macia e compacta.

3.2- Microrganismos, meios de cultura e substratos.

ANDERSON & DAY (1966) estudaram a capacidade de certos microrganismos na formação dos compostos voláteis responsáveis pelo aroma de "Blue Cheese". Metilcetonas e álcoois secundários de amostras de queijos comerciais foram quantificados, para avaliação da

qualidade do aroma em comparação à produção desses compostos em meio de cultura por alguns microrganismos. Foram utilizadas algumas culturas de *P. roqueforti*, *Torulopsis sphaerica, Mycoderma sp, Geotrichum candidum* e *Bacterium linens* no intuito de se estudar a bioconversão de metilcetonas em álcoois secundários. Todas as amostras de queijo apresentaram 2-heptanona como maior constituinte e houve uma variação muito grande na concentração das metilcetonas em todas as amostras. Os álcoois secundários sempre foram encontrados em quantidades menores que as metilcetonas na faixa de 0,3 a 10 mg/kg de queijo. Os microrganismos *P. roqueforti*, *Torulopsis sphaerica, Mycoderma sp* são capazes de converter 2-pentanona em 2-pentanol.

LAWRENCE (1966) demonstrou que a habilidade de esporos de *P. roqueforti* em oxidar ácidos graxos diminui com a idade da célula. Entretanto, é possível a recuperação dessa habilidade através da adição de açúcares e de aminoácidos . Apenas ácidos com cadeia carbônica entre 6 e 12 átomos de carbono foram oxidados para suas respectivas metilcetonas. Foram utilizadas suspensões de esporos de *P. roqueforti* com várias idades, soluções contendo ácidos graxos marcados radiativamente e a produção das metilcetonas monitoradas

por derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. A temperatura ótima de produção de 2-heptanona foi de 27ºC e o pH depende muito do ácido graxo livre utilizado e sua concentração. Alanina e D-Glicose, quando adicionadas ao meio de fermentação, favoreceram a formação de 2-heptanona a partir do ácido octanóico.

No ano seguinte, o mesmo autor (LAWRENCE, 1967) estudou a adição de alguns aminoácidos como L-alanina, L-prolina e L-serina e concluiu que estes estimulam a formação de metilcetonas por esporos de *P. roqueforti* a partir de triglicerídeos. Demonstrou que o grau de oxidação sofre um aumento pela adição de certos açúcares como, galactose, glicose, xilose, entre outros. Esse aumento, no entanto, não tem efeito algum na ausência da fonte de nitrogênio. Sugere-se que a adição desses compostos (açúcares e aminoácidos) promovem uma rápida germinação dos esporos o que favoreceria a formação das metilcetonas.

DOLEZALEK (1969) utilizando linhagens de *P. roqueforti* descreveu a formação de metilcetonas em meio de Czapek-Dox, contendo 10% de gordura de leite. A maior parte das linhagens produziu maiores quantidades de metilcetonas a 15°C. Estes resultados se tornaram ótimos depois de 40 e 57 dias e foram

identificadas como 2-pentanona, 2-heptanona e propanona. Também foram encontradas, em menor quantidade, 2-butanona e 2-nonanona. 2-undecanona só foi produzida a 8°C depois de 40 dias. Somente pequenas quantidades de formaldeído a acetaldeído foram encontradas.

NELSON (1970) desenvolveu uma metodologia, utilizando a fermentação submersa para a produção de aroma de "Blue Cheese" utilizando inóculo rico em esporos de *P. roqueforti*. Foi utilizado um meio composto por leite homogeneizado e autoclavado e de 1 a 3% de sal. Após 3 a 4 dias da inoculação, 4 a 6 % de sal adicional foi introduzido e o meio incubado por mais 1 ou 2 dias. A temperatura utilizada foi de 21 a 25°C e o pH ficou entre 4,5 e 5,5. O meio foi aerado numa vazão nunca superior a 1 litro de ar por minuto por litro de meio. Uma aeração muito maior favorece a perda dos compostos voláteis formados. Após esse período os níveis de metilcetonas formadas foram de 7 a 15 vezes superiores aos encontrados nos queijos comerciais. No final do processo, o meio foi esterilizado por sistema de ultra alta temperatura (130°C por 4 segundos). O produto final possuia teor de gordura de 4%, proteína 5%, sal 5% e unidade 78%.

KRIVENTSOVA (1971) comparou o total de compostos carbonílicos presentes em queijo roqueforti e leite inoculado com *Torulopsis severinii* 304 ou *T. secundário* 642. Os principais componentes encontrados nas três preparações incluíram acetaldeído, acetona, butanona, pentanona e heptanona, presentes no queijo normal em quantidades de 1,90; 2,10; 1,50; 1,70 e 1,19 mg/kg respectivamente. Os queijos preparados de leites inoculados com linhagens de *Torulopsis* continham as 5 substâncias citadas em quantidades 2-3 vezes mais altas e eram superiores ao queijo normal com relação ao aroma produzido.

DWIVEDI & KINSELLA (1974a) também utilizaram a fermentação submersa para a produção de aroma de "Blue Cheese" através do *P. roqueforti,* empregando um processo contínuo. O esporo do fungo foi inoculado em meio contendo 5% de extrato de malte , 2% de glicose e 0,5% de extrato de levedura. Após 5 dias a 25°C, uma pequena quantidade de esporos foi retirada da superfície do micélio formado e inoculado em um meio contendo 1,5mg de água de maceração de milho e 1,5 mg de sacarose/10 mL de meio. Após 3 dias de incubação a 25°C, o micélio formado foi colocado em meio contendo gordura de leite previamente lipolisada por lipase pancreática. A

suspensão do micélio e a gordura foram constantemente bombeadas para o meio de fermentação. Uma aeração de 1 litro de ar por minuto por litro de meio foi utilizada. O efluente foi coletado e mantido sob 4°C, podendo ser usado como aroma natural de "Blue Cheese".

Os mesmos autores (DWIVEDI & KINSELLA, 1974b) utilizando condições experimentais muito semelhantes para a obtenção de esporos e micélio da mesma linhagem de *P. Roqueforti* estudaram a relação da quantidade de ácidos graxos livres / quantidade de metilcetonas. O micélio foi produzido por inoculação dos esporos em meio malte e incubado a 25°C por 4 dias. O micélio produzido cresceu em água de maceração de milho e sacarose 1g/10 mL de meio a 25°C e pH 4 - 5,5 com aeração de 1 litro de ar por minuto por 1 litro de meio. Depois de 4 dias o micélio foi coletado e usado para produção dos compostos carbonílicos. Micélio jovem (24 horas) foi inoculado em gordura de leite, previamente lipolisada, à 25°C com agitação. Grandes quantidades de ácidos graxos livres (39 a 52 μmoles/g de gordura) aumentaram a fase lag , no entanto, produziram, num tempo maior, uma quantidade maior de metilcetonas do que concentrações menores de ácidos graxos livres. As principais metilcetonas

encontradas foram 2-pentanona, 2-heptanona, 2-nonanona e 2-undecanona.

Além da gordura de leite, também a gordura de coco foi utilizada por JOLLY & KOSIKOWSKI (1975a) como substrato para a produção de aroma de "Blue Cheese", através de esporos de *P. roqueforti.* O produto fermentado alcançou aroma típico com 48-72 horas de fermentação a 20°C. As concentrações de compostos carbonílicos, compostos monocarbonílicos e metilcetonas foram de 351, 322 e 299 μmoles/10g soro de leite ácido e 139, 133 e 93 μmoles/10g de soro de leite doce respectivamente. 2-heptanona e 2-nonanona foram as metilcetonas principais numa concentração 4-5 vezes mais alta no substrato de soro de leite ou gordura de coco quando comparado com soro de leite doce. O produto final teve aproximadamente 20% gordura e 9,0% proteína. A adição de lipases microbianas proporcionou a produção de ácidos graxos livres para a continua produção de compostos carbonílicos. No mesmo ano, os citados autores (JOLLI & KOSIKOWSKI, 1975b) tentaram aumentar a produtividade de metilcetonas, utilizando como substrato creme de leite pasteurizado e lipase proveniente de *Aspergillus oryzae*, anteriormente à adição de esporos *de P. Roqueforti.* Após adicionar ao meio gordura

de coco e soro de leite, a mistura foi mantida a 20°C por 48 horas, a 200 rpm. Depois desse tempo o aroma produzido foi concentrado por atomização. O produto final continha a textura e sabor muito parecidos com o do queijo. Entretanto, os autores não quantificaram os componentes aromáticos. KIM & LINDSAY (1991) relataram diferença na constituição dos ácidos graxos presentes em queijos produzidos por leite de vaca ("blue", "cheddar"), ovelha (roqueforti) e cabra. Queijos produzidos com leite de cabra possuem uma grande quantidade de ácido hexanóico, octanóico e decanóico, o mesmo ocorrendo com queijos produzidos com leite de ovelhas. Alguns outros ácidos de cadeia média ramificados também foram encontrados. Isto explicaria os diferentes aromas de queijos manufaturados com leites de diferentes origens.

FAN et. al. (1976) estudaram a formação de metilcetonas durante o processo de germinação de esporos de P. roqueforti. O meio de crescimento foi composto por 2% de água de maceração de milho, 1,5% de sacarose e 0,4 mg/mL de Streptomicina para inibir o crescimento bacteriano; incubado com (10^7/mL) de esporos e mantido a 30°C com agitação de 110 rpm. Os frascos foram retirados e centrifugados em diferentes estágios de crescimento celular. A

suspensão de células foi incubada em meio de reação contendo ácido octanóico em tampão fosfato pH 6,5 a 30ºC. A maior eficiência na produção de metilcetonas foi maior durante o processo de germinação dos esporos.

KINDERLERER & KELLARD (1984) utilizaram 4 espécies de fungos: *Eutorium amstelodami, E. chevalieri, E. herbariorum* e *P. citrinum* para estudar o tipo de decomposição que ocorre com gordura de coco. Após 30 dias de incubação, foi observado o surgimento de uma série homóloga de metilcetonas alifáticas e os respectivos álcoois secundários. Alguns anos depois, KINDERLERER (1987) descreveu a conversão de óleo de coco à metilcetonas por duas espécies de fungos *Aspergillus ruber* e *A. repens*. A fermentação foi feita em erlenmeyers de 250 mL contendo óleo de coco, meio Czapek modificado e glicerol. Foram adicionadas suspensões dos esporos e mantidas por 5 dias, a 60 rpm e a 25°C. As principais metilcetonas encontradas foram: 2-pentanona, 2-heptanona, 2-nonanona 2-undecanona e 2-tridecanona. A maior concentração encontrada foi de 2-undecanona pois o ácido láurico foi o principal constituinte da gordura de coco, no entanto, a maior taxa de conversão foi a de 2-nonanona a partir de ácido cáprico.

YAGI, *et. al.* (1989) isolaram uma linhagem de *Trichoderma sp* de amostras de solo capaz de metabolizar ésteres de ácidos graxos até metilcetonas com um átomo de carbono a menos que o ácido original. O meio de cultivo foi composto de meio basal adicionado de tricaprina como única fonte de carbono. Depois de 5 dias de incubação a 28°C o meio foi centrifugado e um óleo foi separado e dissolvido em clorofórmio. A única metilcetona formada foi a 2-nonanona. Não houve formação quando tributirina foi utilizada como única fonte de carbono. No ano seguinte os mesmos autores (YAGI *et. al.*,1990) realizaram o isolamento e seleção de microrganismos produtores de metilcetonas em meio contendo tricaprina ou óleo de babaçu. Vinte e duas espécies foram selecionadas como produtoras dessas substâncias. Esses microrganismos foram divididos em duas classes distintas: os produtores a partir de tricaprina e com baixa produção a partir de óleo de babaçu e a segunda com alta produção nos dois substratos. Espécies de *Fusarium* e *Trichoderma* são representantes do primeiro grupo enquanto *Penicillium, Aspergillus* e *Cladosporium* são representantes do segundo grupo. Entre os *Aspergillus* quatro espécies foram identificadas como produtoras de metilcetonas e são elas:

Aspergillus niger, A. wentii, A. terreus e *A. oryzae*, produzindo preferencialmente 2-nonanona a partir de tricaprina.

KRANZ *et. al.* (1992) descreveram a conversão de ácidos graxos de cadeia curta até metilcetonas por *Monascus purpureus* em níveis próximos do conseguido com *P. roqueforti* Segundo os autores, o tamanho da cadeia influenciou a produção sendo o rendimento da transformação para o ácido hexanóico de aproximadamente 100% e já para o ácido láurico de aproximadamente 5%. A concentração influenciou no tempo necessário para a transformação sendo que quanto maior a concentração maior a fase lag. No mesmo ano, VAN DER SCHAFT *et. al.* (1992) descreveram a produção de 2-heptanona a partir de ácido octanóico por *Fusarium poae* utilizando um meio contendo glicose, asparagina, tiamina e elementos traços. O meio foi mantido a 30°C e 200 rpm por 3 dias. Os relatos indicam que o rendimento da fermentação poder ser aumentado se o produto formado for retirado do meio por arraste com gás e adsorvido em resina Amberlite XAD-4, sugerindo um processo de inibição pelo produto final. Foram obtidos 61 mg/100 mL de meio de 2-nonanona e outras metilcetonas em quantidades menores.

CREULY *et. al.* (1992) produziram metilcetonas a partir de ácidos graxos de cadeia média (de 6 à 10 átomos de carbono) através de bioconversão por esporos de *P. roqueforti* em um sistema bifásico água/solvente orgânico. A fase orgânica consistia de isoparafina industrial que possui como maior constituinte tetradecano. A reação foi iniciada com esporos dormentes que mostraram possuir uma alta atividade biocatalítica. A concentração de esporos no meio foi de 2 X 10^8 esporos por mL de meio. A concentração de ácidos graxos utilizadas variou de 20 a 150 mM. Esse método produziu como melhores resultados a produção de 21 g/L de 2-pentanona, 73 g/L de 2-heptanona e 57 g/L de 2-nonanona.

CHARLIER & CROUZET (1993) inocularam esporos de *P. roqueforti* isolados de queijo roqueforti comercial em meio sintético contendo sacarose, fontes de nitrogênio (uréia, prolina ou asparagina) e óleo de soja. Quando uréia foi usada como única fonte de nitrogênio, combinações de metilcetonas C11-C17 foram encontradas. Foram encontrados outros compostos tais como oct-1-en-3-ol, aldeídos não saturados, p-cimeno, limoneno, beta-elemeno, alfa-cedreno, além de outros 20 compostos não identificados.

JOLLIVET & BELIN (1993) estudaram a composição dos compostos voláteis produzidos por 10 linhagens de *P. camemberti* utilizando um meio de cultura baseado em leite, creme de leite, caseína hidrolisada e glicose. O microrganismo foi inoculado e o meio deixado a 110 rpm a 25°C por 4 a 14 dias. Os principais compostos produzidos foram ácidos butanóico, hexanóico e octanóico, as metilcetonas 2-nonanona seguida de 2-heptanona, alguns álcoois secundários e vários outros compostos minoritários. Das 10 linhagens estudadas quatro se mostraram altamente produtoras de metilcetonas na faixa de 50 a 60 ppm e outras quatro produziram menos que 20 ppm.

A seqüência de citações ora apresentadas mostra que os fungos das espécies P. roqueforti e P. camembert continuam recebendo a preferencia na produção de "blue cheese" comerciais, mas que outras linhagens apresentam potencialidade para a síntese de metilcetonas e compostos aromáticos para emprego em outros produtos alimentares

3.3- Mecanismos de síntese das metilcetonas

Novas metodologias de extração e análise desenvolvidas a partir da segunda metade do século permitiram descobrir novas

metilcetonas, bem como elaborar esquemas claros sobre os mecanismos de síntese destes compostos. SCHUWARTZ & PARK (1963) ao abolir o processo de aquecimento e destilação de voláteis extraídos de "blue cheese" descreveram duas novas metilcetonas a 2-undecanona e 2 tridecanona.

LAWRENCE (1966) trabalhando com esporos de P. roquerforti verificou que o aumento na concentração de ácidos graxos do meio de crescimento aumenta a fase lag na produção de metilcetonas e que a diminuição da concentração de esporos também aumenta esta fase. Observou também que o aumento na concentração de ácidos graxos aumenta a produção total de metilcetonas. Observações semelhantes foram descritas por KRANZ *et al* (1992), segundo os quais a concentração de ácidos graxos influencia no tempo da transformação prolongando a fase lag, aumentando, entretanto, o rendimento em metilcetonas.

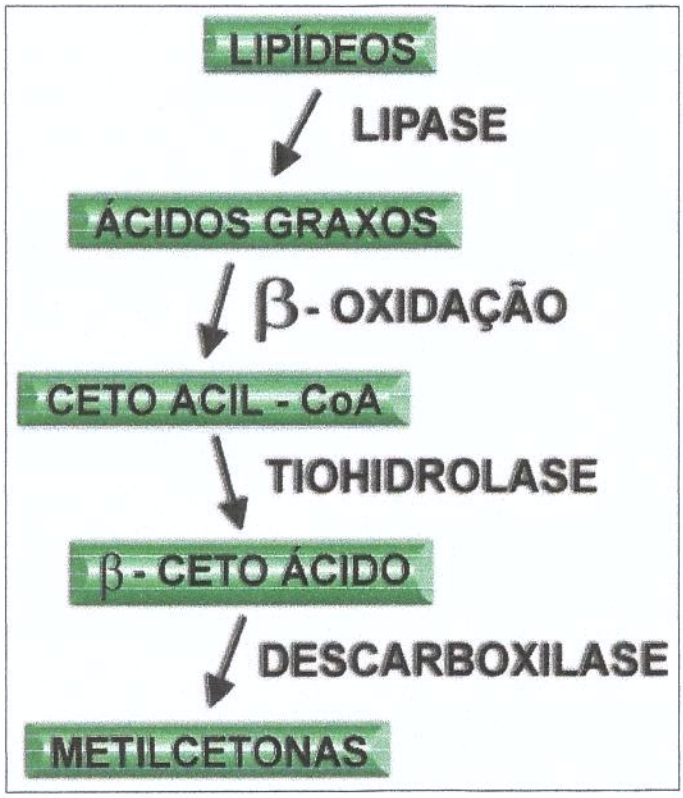
LAWRENCE & HAWKE (1968) demonstraram que baixas concentrações de ácidos graxos livres com até 14 átomos de carbono podem ser oxidados até metilcetonas sem fase lag por micélio de *P. roqueforti*. Os ácidos de 6 a 8 átomos de carbono produzem um alto rendimento na produção de metilcetonas de 5 e 7 átomos de carbono.

Os ácidos de 9 a 12 átomos de carbono foram os que tiveram maior efeito inibidor na produção das metilcetonas. Micélios previamente tratados com concentrações tóxicas dos ácidos graxos foram menos susceptíveis à inibição por esses ácidos. Foi sugerido que a formação das metilcetonas envolveria a deacilação de β-oxi-aciltioésteres que vem de uma rota alternativa de reciclagem de CoA.

DARTEY & KINSELLA (1973a) promoveram a oxidação de ácido láurico marcado radiativamente para compostos carbonílicos, incluindo a série homóloga de metilcetonas por esporos de *P. roqueforti*. Foi utilizado uma concentração de 6,3 X 10^3 esporos/mL na presença de 2mM de D-Glicose a um pH de 6,5 e 30ºC. Sob essas condições houve de 16 a 20% de rendimento em compostos carbonílicos totais. A utilização de glicose favorece a formação de metilcetonas e inibe a oxidação total do ácido graxo até CO_2. Uma série homóloga de metilcetonas de C_3 á C_{11} foi encontrada, indicando haver possibilidade de interconversão das metilcetonas formadas. Animados com tais resultados, os mesmos autores (DARTEY & KINSELLA, 1973b) realizaram a oxidação de palmitato de sódio, marcado radiativamente, por esporos de *P. roqueforti*. A utilização de L-prolina e D-glicose favoreceu a formação de metilcetonas e suprimiu a

oxidação total de palmitato de sódio até CO_2. A concentração de esporos utilizada foi de 6,3 X 10^8 produzindo 32,4 % de compostos carbonílicos utilizando o ácido graxo na concentração de 5mM em presença de 20 mM de D-glicose a 30°C e pH 6,5. Uma série homóloga de metilcetonas foi encontrada sendo C_{15} a mais abundante.

KINSELLA & HWANG (1976) descreveram as modificações ocorridas durante o processo de maturação do queijo do tipo "Blue Cheese". Utilizando o *Penicillium roqueforti*, foi possível concluir que este microrganismo possui um complexo enzimático que atua da seguinte forma: proteases modificam a estrutura da caseína, alterando o sabor e a textura destes queijos; lipases atuam sobre a gordura, produzindo ácidos graxos e precursores das metilcetonas; o complexo enzimático envolve a parcial oxidação dos ácidos graxos livres e a ação da β-cetoacil descarboxilase, com consequente produção das metilcetonas. Foi proposto então, um esquema onde pode-se observar a biossíntese de metilcetonas.



***Quadro 1**: Mecanismo enzimático envolvido na produção de metilcetonas de acordo com KINSELLA & HWANG (1976)*

Tentando elucidar o processo de síntese de metilcetonas a partir de ácidos graxos em diversas fases da germinação de esporos de *P. roqueforti*, FAN *et. al.* (1976) classificaram-nos em vários estágios de desenvolvimento. Foi observado que, tanto esporos, quanto micélio foram capazes de produzir metilcetonas a partir de ácidos graxos. No entanto, a eficiência de produzir metilcetonas foi maior durante o processo de germinação dos esporos.

Utilizando gordura de coco como matéria prima e várias linhagens fúngicas KINDELERER & KELLARD (1984) obtiveram como principais compostos: 2-heptanona, 2-nonanona e os álcoois 2-heptanol e 2-nonanol, o que representa a ocorrência de uma β-oxidação parcial dos ácidos graxos da gordura. Esse trabalho mostrou que a principal biodeterioração da gordura de coco foi a lipólise que ocorreu com os triglicerídeos e a posterior oxidação desses ácidos graxos até metilcetonas. Esse tipo de degradação faz surgir a rancidez cetônica, que por vezes tem sido ignorada no controle de qualidade de certas gorduras. Esse tipo de decomposição ocorre, principalmente, quando há contaminação dessas gorduras com fungos.

OKUMURA & KINSELLA (1984) incubaram micélio de *P. camemberti* em um sistema modelo contendo lipídeos de leite numa concentração de 45 mM, a uma temperatura de 27°C e pH 6,8. Houve a formação de ácidos graxos livres e principalmente de compostos carbonílicos, dos quais 60% eram constituídos de metilcetonas. Dessas metilcetonas formadas, 2-nonanona e 2-undecanona foram as que tiveram maior porcentagem relativa. A adição de lipase ao sistema de produção das metilcetonas favorece o aparecimento das mesmas aumentando sua concentração final, pois esse tipo de enzima

disponibiliza os ácidos graxos para sofrerem posterior oxidação até metilcetonas. Observou-se também que, no sistema contendo lipase, houve um menor crescimento do micélio. A adição de ácidos graxos livres (láurico e oleico) tende a diminuir o nível de metilcetonas formadas. Entretanto os autores não explicam o fenômeno. Outra observação interessante sobre a conversão de óleos e gorduras em metilcetonas foi descrita por YAGI et al (1989). Segundo tais autores uma linhagem de *Trichoderma sp* foi incapaz de converter os triglicérides simples trilaurina, trimiristina e tripalmitina em metilcetonas.

HATTON & KINDERLERER (1991) verificaram que o processo de transformação de ácidos graxos livres de cadeia média para metilcetonas por linhagem de *P. crustosum* se trata de um sistema de desintoxicação, já que esses ácidos graxos mostraram ter efeito inibidor no crescimento desse fungo. O índice de inibição varia com a mudança de pH, concentração e tamanho da cadeia carbônica desses ácidos. O pH ótimo de formação de metilcetonas foi de 6,4 sendo a concentração mínima inibitória de 32,5 mMol, 20,0 mMol e 10 mMol para os ácidos hexanóico, octanóico e decanóico respectivamente. A ordem de toxicidade dos ácidos graxos encontrada foi $C^{11} > C^{10} > C^{12} > C^{8} > C^{6}$.

LARROCHE *et. al.* (1994) descreveram que esporos de *Penicillium roqueforti* podem converter ácidos graxos em metilcetonas para produzir aroma de "Blue Cheese" que pode ser usado em molhos de salada, sopas, bolachas, e bolos. Síntese de 2-heptanona a partir de ácido octanóico por esporos de *Penicillium roqueforti* (ATCC 64383) foi investigado em um sistema de pH controlado. Altas taxas de bioconversão (0.55 mMol 2-heptanona/L/h) foi alcançada nas primeiras 25-70 h; estas taxas diminuíram subseqüentemente devido a germinação e crescimento do biocatalisador. A duração deste período inicial altamente produtivo poderia ser aumentado limitando O_2 ou diminuindo o número de esporos no meio para menos de 10^7 esporos/mL, mas ambas as condições resultaram em taxas de bioconversão diminuídas. Estudos bioenergéticos e metabólicos do período 25-70 h revelaram que etanol agiu como uma fonte de energia para as células, e que as células começaram a germinar quando o etanol havia terminado.

LARROCHE *et. al.* (1996) monitoraram a concentração interna de substratos durante a biossíntese de 2-heptanona por esporos de *P. roqueforti*. Foi observado que os ácidos graxos livres penetram o interior celular dos esporos e se acumulam na parede celular e

membranas, sendo esse acúmulo reversível. A biotransformação se processa no interior da célula e a sua velocidade foi limitada pela velocidade de entrada de ácido graxo livre na célula. O processo de entrada desses ácidos envolve um consumo de energia e um efluxo de prótons acompanha a entrada desses ácidos.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Materiais

4.1.1- Reagentes e materiais específicos

Produtos químicos: diclorometano, ácido acético glacial, acetato de sódio, hexano, clorofórmio, gás hélio.

Meios de cultura: farelo de trigo, potato dextrose ágar (PDA), glicerina.

Filtros: papel Whatman nº1, lã de vidro.

Padrões Cromatográficos: 2-pentanona, 2-heptanona, 2-nonanona, 2-undecanona, Ácido capróico, Ac. Caprílico, Ácido Cáprico (Aldrich).

Coluna Cromatográfica : Cpsil 5CB (Chrompack).

Adsorventes cromatográficos : Adsorvente para extração de compostos lipofílicos celite (Merck).

4.1.2- Vidraria

Pipetas, frascos Erlenmeyer, balões volumétricos, funis, béqueres, tubos de ensaio e de cultura, placas de petri.

4.1.3. Equipamentos:

- Estufa bacteriológica Fanen mod. 002 CB;
- Centrífuga refrigerada Beckman mod. J2-21;
- Balança Analítica Mettler mod. H-10;
- Cromatógrafo Gasoso Chrompack modelo CP 900X;
- Agitador incubador refrigerado New Brunswick Scientific mod. G25;
- Banho maria com agitação New Brunswick Scientific mod. G76;
- Agitador incubador refrigerado programável INNOVA 4335.

4.2- Procedimentos

4.2.1- Preparação do extrato enzimático bruto de lipase

O extrato bruto foi preparado através de fermentação semi-sólida, inoculando-se esporos de *Aspergillus sp,* em um meio composto por farelo de trigo com 50% de umidade, previamente esterilizados em autoclave a 121ºC. Findo o tempo de incubação, o meio recebeu 200 mL

de água destilada, foi agitado suavemente por 30 minutos, filtrado em papel Wathman nº1 e utilizado como fonte de enzima.

4.2.1.1- Determinação da atividade enzimática da lipase

A atividade da lipase foi medida utilizando-se um sistema de reação composto por 4mL de tampão acetato 50 mM, pH 5,6, 1g de substrato e 1 mL de extrato bruto enzimático. A mistura foi incubada em frasco Erlenmeyer, por 60 minutos em banho maria termostatizado a 40°C com agitação de 130 oscilações por minuto.

Como substrato, foram utilizados o creme de leite bovino, creme de leite caprino e gordura de coco.

A reação foi paralisada pela adição de 15mL de solução de acetona-etanol 1:1 (v/v) e os ácidos graxos liberados foram titulados contra solução KOH 0,05N, utilizando-se fenolftaleína como indicador.

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1µmol de ácido graxo, por minuto de reação nas condições de ensaio.

Para o cálculo da atividade enzimática da lipase nos substratos gordura de coco e creme de leite bovino foi utilizada curva padrão de ácido láurico titulado contra KOH 0,05N. No substrato creme de leite

caprino, foi utilizada uma curva padrão de ácido caprílico titulado contra KOH 0,05N.

4.2.1.2- Efeito do teor de umidade do meio farelo de trigo, tempo e temperatura de incubação na produção de lipase pela linhagem de ***Aspergillus sp****.*

O teor de umidade do meio de cultura, bem como o tempo e temperatura de incubação são de extrema importância para a otimização da produção de uma enzima. Desta forma, foram feitos testes, variando-se o teor de umidade do meio de cultura de 30 a 70%, com intervalos de 10%, incubando-se frascos Erlenmeyers, em uma faixa de temperatura de 30 a 60ºC, com intervalos de 5ºC, em estufas por um período de 48 a 144 horas, com o intuito de se determinar a melhor condição para a produção da enzima.

4.2.2- Adequação da relação enzima:substrato

Após a seleção do substrato ideal, gordura de coco (ítem 5.6), para a produção de metilcetonas, alíquotas do extrato enzimático bruto foram submetidas a precipitação através de saturação com 80% de sulfato de amônia, redissolução em igual volume de água destilada,

seguida de diálise em água destilada, por 48 horas em banho de gelo e posterior liofilização.

Para a determinação da atividade enzimática, incubou-se uma mistura composta de 5 a 50 mg da enzima liofilizada, 4ml de tampão acetato pH 5,6 a 0,05M e 1g de gordura de coco. A mistura de reação foi incubada a 40°C, por 60 minutos em banho maria termostatizado com agitação de 130 oscilações por minuto. Após a paralisação pela adição de 15 mL da solução acetona:etanol 1:1 (v/v), os ácidos graxos liberados foram titulados contra solução de KOH 0,05N, utilizando-se fenolftaleína como indicador.

O cálculo da atividade enzimática foi feito utilizando-se uma curva padrão de ácido láurico titulado contra KOH 0,05N.

4.2.3- Avaliação de técnicas para extração das metilcetonas produzidas em diferentes sistemas de reação

Dois sistemas foram testados para melhor extração das metilcetonas produzidas no meio de reação

4.2.3.1- Sistema de extração líquido-líquido

O sistema para extração foi composto por 5,0 mL de tampão acetato 0,1 M, pH 5,6 , 1μl de cada padrão externo, 1g de gordura de coco e 1μl do padrão interno acondicionados em frascos de 20 ml.

Após esta etapa, o sistema foi saturado com NaCl seguido de filtração em $NaSO_4$. O filtrado foi coletado através de funil Buchner em frasco Elenmeyer onde foram adicionados, em duas etapas, 25mL de diclorometano.

Esta solução foi mantida em frascos hermeticamente fechados a -15^{o}C para posterior análise por cromatografia gasosa.

4.2.3.2- Sistema de extração sólido-líquido

O sistema para extração sólido-líquido foi composto por 5,0 mL de tampão acetato 0,1 M, pH 5,6 , 1μl de cada padrão externo, 1g de gordura de coco e 1μl do padrão interno acondicionados em frascos de 20 ml.

O próximo passo foi verter esta amostra sobre uma coluna de 20 cm de comprimento e 5 de diâmetro, recheada com 6g de celite. A

amostra foi eluída em duas etapas com volumes de 12,5 mL de diclorometano. O eluato foi coletado diretamente em balão volumétrico, sendo o volume final ajustado para 25 mL.

As amostras foram mantidas a -15^{o}C para posterior análise por cromatografia gasosa (CG) e os resultados foram comparados à curva padrão de ácido láurico previamente descrita.

4.2.4- Análise por cromatografia gasosa das metilcetonas produzidas utilizando o sistema de padronização interna.

4.2.4.1- Preparo de soluções estoque dos padrões cromatográficos

Foram preparadas soluções estoque (S.e.) a 10.000 ppm dos padrões externos (P.e.): 2-pentanona, 2-heptanona, 2-nonanona: 2-undecanona e do padrão interno (P.i.) caproato de etila.

4.2.4.2- Preparo de soluções dos padrões em diferentes concentrações

Através de seguidas diluições, foram obtidas alíquotas da S.e. com 10, 30, 60 e 120 ppm, onde foram adicionados 100 ppm do P.i. em cada uma delas

As amostras foram injetadas no cromatógrafo dotado de uma

coluna de 30 m X 0,25 mm X 0,25 μm e a curva padrão foi elaborada a partir da divisão da área do P.e. pela área do P.i. (padronização interna). Como condições cromatográficas, o detetor foi mantido em 280°C e o injetor a 250°C. Aqueceu-se o forno a 60°C por 2 minutos elevando, após este período, a 125°C numa razão de 5°C/min., permanecendo nesta temperatura por 5 min., para então ser aquecido até 300°C numa razão de 15°C/min. E mantido nesta temperatura por 5 min.

4.2.5- Produção de metilcetonas

4.2.5.1- Otimização da produção de metilcetonas utilizando gordura de coco, creme de leite de vaca e creme de leite de cabra.

Os meios para obtenção das metilcetonas foram compostos por 5,0 mL de tampão acetato 0,1M, pH 5,6, 0,1g do extrato enzimático liofilizado e 1g de cada substrato.

As reações foram realizadas em triplicata, em frascos lacrados sob agitação de 150 rpm, utilizando as temperaturas de 30, 40, 50, 60 e 70°C. As amostras foram retiradas em intervalos de 24 horas por um

período de 0 a 120 horas. As metilcetonas foram identificadas e quantificadas por CG, como destrito no ítem **4.2.4**.

4.2.6- Efeito do pH na produção de metilcetonas

4.2.6.1- Efeito do pH na produção de metilcetonas utilizando gordura de coco, creme de leite de vaca e creme de leite de cabra

O efeito do pH foi determinado incubando-se alíquotas de 0,1g de enzima liofilizada, 5,0 mL de tampão McIlvaine 0,1M, numa faixa de pH 4,0 a 7,0 e 0,1g de cada substrato, a 30°C por 48 horas. As metilcetonas produzidas foram identificadas e quantificadas por cromatografia gasosa, como descrito no ítem **4.2.4**.

5-RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- Determinação da atividade enzimática da lipase em gordura de coco, creme de leite de vaca e de cabra

Para produzir as metilcetonas, é necessário que haja determinados ácidos graxos livres no meio de reação, uma vez que, na fase de ativação do esporo, o microrganismo os utilizam, como substrato para essa bioconversão (OLIVEIRA, 1998; CHARLIER & CRUZET, 1998). Desta forma, é de extrema importância que o sistema enzimático, responsável pela hidrólise de óleos e gordura em ácidos graxos, apresente atividade adequada.

A **Tabela 1**, indica a atividade lipolítica do extrato bruto produzido pela linhagem *Aspergillus sp.* nº1068, em diferentes substratos.

Tabela1: Determinação da atividade enzimática de lipase em gordura de coco, creme de leite de vaca e de cabra.

Creme de leite De vaca *µmoles ácido láurico/min./ml*	**Creme de leite de cabra** *µmoles ácido caprílico/min./ml*	**Gordura de coco** *µmoles ácido láurico/min./ml*
0,136	0,213	5,360

A grande especificidade da atividade lipolítica da enzima produzida por esta linhagem é para ácidos graxos de cadeia média-longa, como o ácido láurico (C-12:0) o que também foi demonstrado por COSTA (1996).

5.2- Efeito das condições de incubação da linhagem *Aspergillus sp.* nº1068 na produção da lipase bruta

Apesar do desenho experimental ter sido efetuado com alternância de variáveis em um único experimento, conforme descrito no ítem 4.2.1.4., os resultados serão apresentados separadamente para maior facilidade da compreensão dos dados obtidos.

5.2.1- Efeito do tempo e temperatura de incubação na produção da lipase bruta

Conforme é ilustrado na **Figura 4**, a produção da enzima passou por uma fase lag até a 24ª hora de incubação, crescendo linearmente a partir da 48ª hora, até atingir a atividade máxima após 120 horas de incubação. O período de tempo de incubação para a

produção de lipases por determinados fungos filamentosos, através de fermentação semi-sólida, de acordo com a literatura consultada tem variado bastante, enquanto a melhor temperatura de incubação tem sido encontrada a uma faixa restrita de 30 a 35°C. A produção máxima de lipase de *Aspergillus sp.* 1068 em meio composto por farelo trigo:água na proporção 40:60 também foi verificado na faixa de 30 a 35°C. A **Figura 5** ilustra os resultados obtidos; KUNDU *et al.* (1978), estudando o binômio tempo x temperatura para a produção de lipase por uma linhagem de *Aspergillus niger* obtiveram os melhores resultados a 35°C, após 96 horas de incubação; SAAD (1995), utilizando uma linhagem de *Aspergillus sp*, obteve os melhores resultados após 144 horas a 30°C, enquanto, também, através de uma linhagem de *Aspergillus sp*, CHUNG & CHO (1995) obtiveram a maior concentração da enzima no farelo com apenas 72 horas de fermentação, à mesma temperatura. Tempos e temperaturas menores de incubação para a máxima produção de lipase têm sido descritos porém, utilizando-se de bactérias, como as *Pseudomonas pseudoalcaligenes* citada por WU *et. al.* (1997) cuja produção máxima foi obtida com 34 horas de fermentação em uma faixa de temperatura entre 24 e 26°C. Entretanto El SAWAH *et. al.* (1995) conseguiram

máxima produção de lipase a uma temperatura de 35°C utilizando uma linhagem de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*.

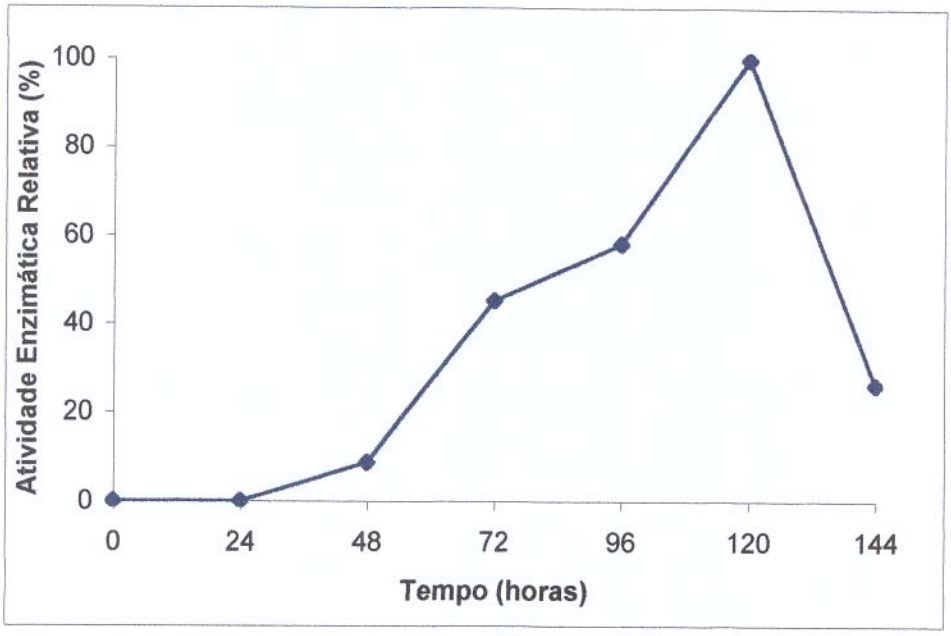


Figura 4: Efeito do tempo de fermentação na produção de lipase pelo *Aspergillus sp* 1068 a 35°C em meio composto por farelo de trigo:água na proporção 40:60.

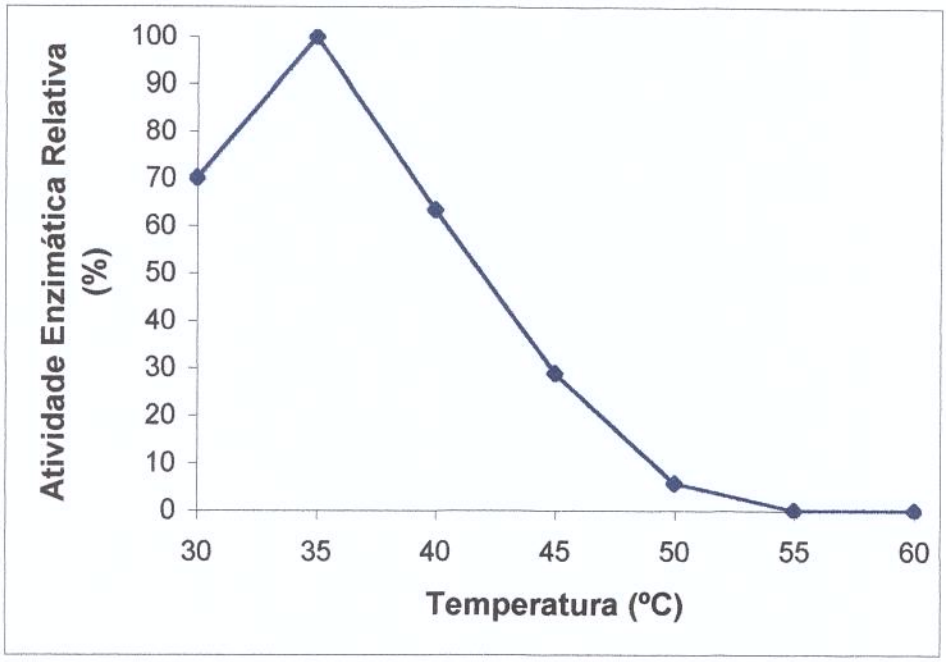


Figura 5: Efeito da temperatura na produção de lipase pelo *Aspergillus sp* 1068 em meio composto por farelo de trigo:água na proporção 40:60, após 120 horas de fermentação.

5.2.2- Efeito do teor de umidade do farelo do meio semi-sólido

A maior atividade da lipase foi encontrada quando a proporção farelo de trigo:água foi de 40:60, conforme mostrado na **Figura 6**. Este resultado confirma os obtidos por COSTA (1996), trabalhando com a mesma linhagem (*Aspergillus sp* nº 1068) e meio de cultura (farelo de trigo:água na proporção 40:60).

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

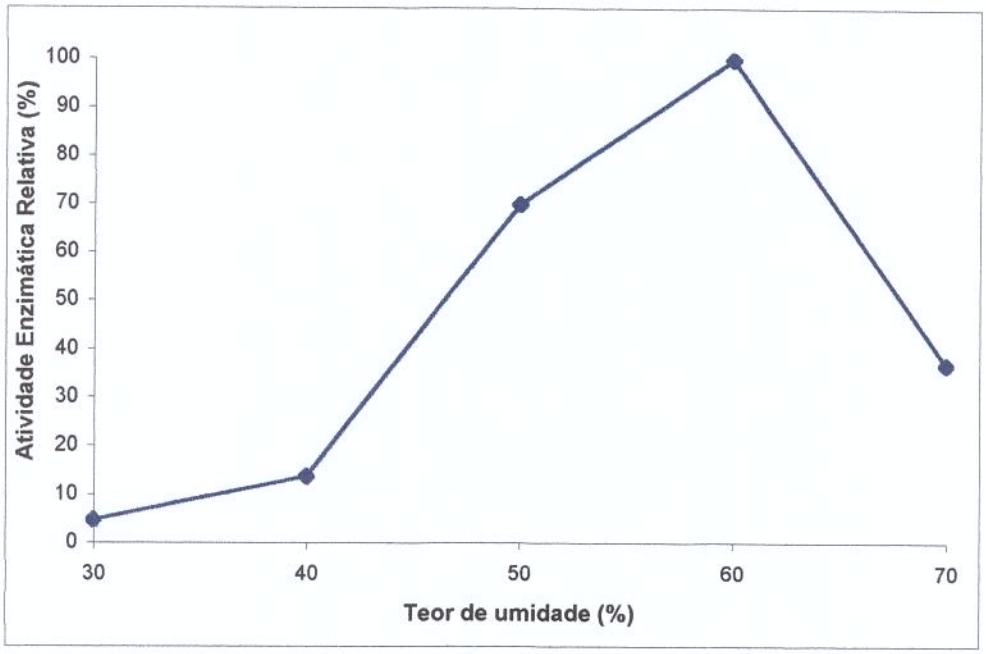


Figura 6: Efeito do teor de umidade no meio farelo de trigo na produção de lipase *Aspergillus sp* 1068.

Os dados anteriormente descritos foram também analisados através da associação de duas em duas variáveis, refletindo mais adequadamente o desenho experimental utilizado. Assim, na **Figura 7** é possível verificar os efeitos combinados do binômio tempo e temperatura de incubação, mostrando maior produção de lipase, na faixa de 30 a 40^{O}C, à medida que o tempo de incubação se aproxima das 120 horas. Entretanto nenhuma atividade foi verificada em temperaturas superiores a 50$^{O.}$ C e a produção máxima foi verificada 35^{O}C.

Quando a atividade enzimática encontrada no meio de crescimento foi estudada em função do teor de umidade e tempo de incubação, como mostrado na **Figura 8**, foi confirmado um período de tempo 120 horas como o ideal para qualquer teor de umidade, obtendo-se a produção máxima de enzima utilizando a proporção farelo de trigo:água a 40:60.

A atividade máxima da enzima no meio de reação formulado com 60% de umidade também foi demonstrada quando esta foi cruzada, graficamente, com a variável temperatura, conforme visto na **Figura 9**.

Desta forma, os resultados ora descritos confirmam, integralmente, os experimentos realizados por COSTA (1996) que obteve a maior produção de lipase por *Aspergillus sp* 1068 em fermentação semi-sólida incubando-o a uma temperatura de 35°C, por 120 horas em meio farelo de trigo, com 60% de umidade.

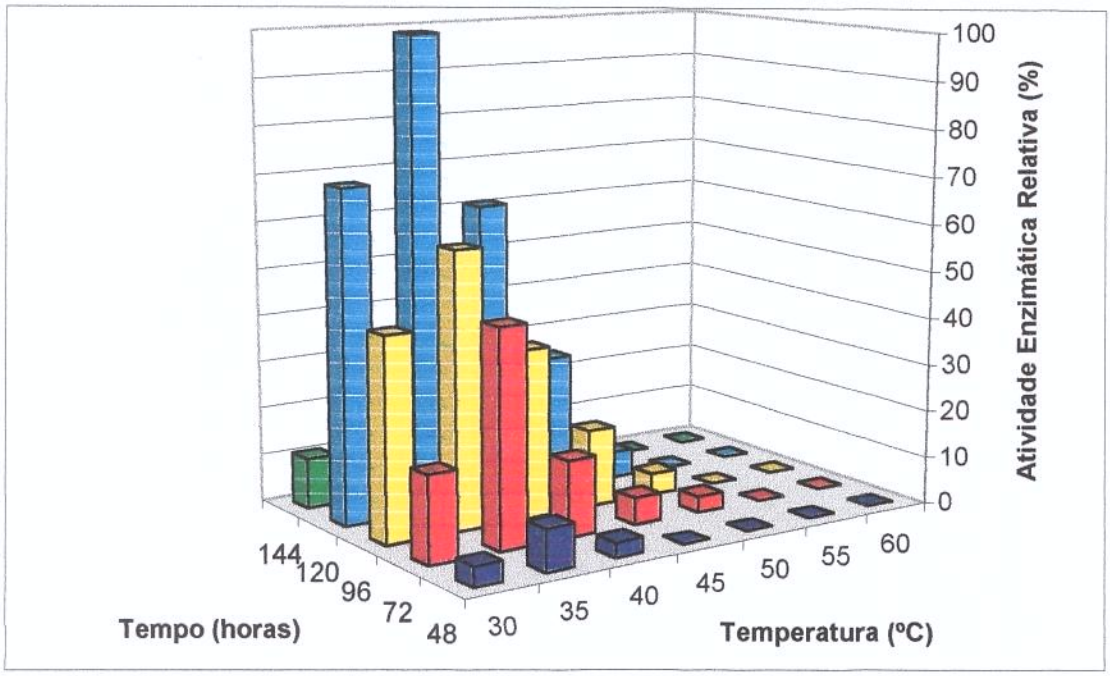


Figura 7: Efeito da temperatura e tempo de incubação na produção de lipase pela linhagem de *Aspergillus sp.* 1068 em meio farelo de trigo com 60% de umidade.

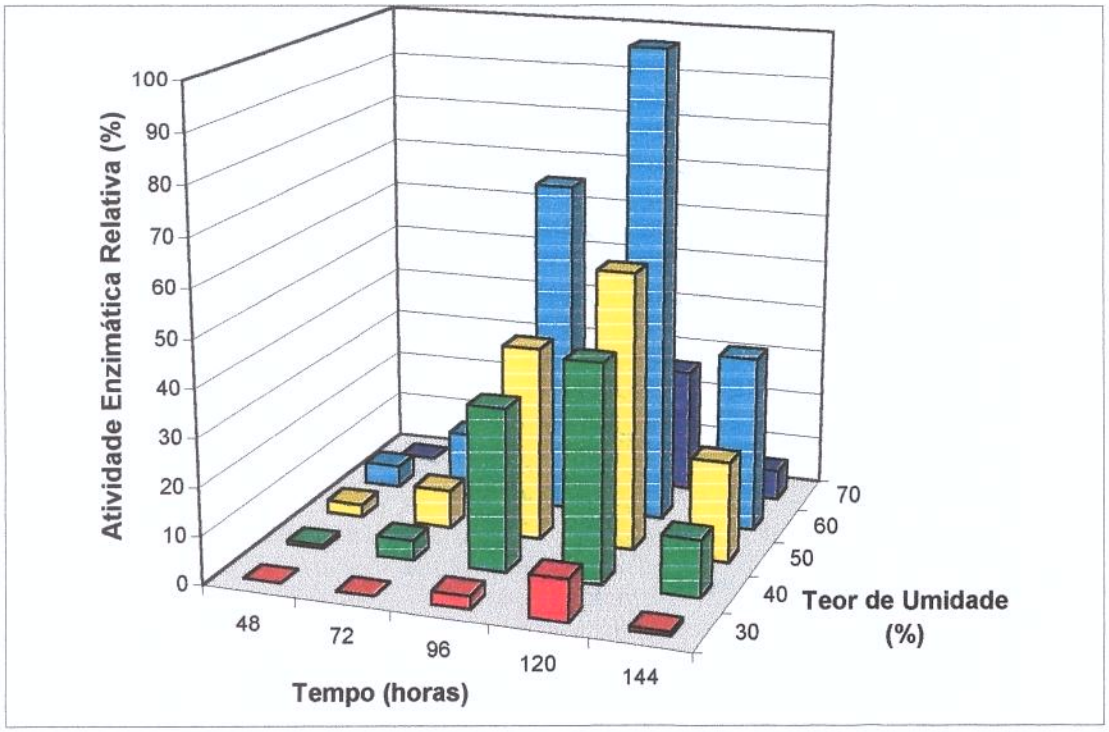


Figura 8: Efeito do teor de umidade do meio farelo de trigo e tempo de incubação na produção de lipase pela linhagem de *Aspergillus sp.* 1068 a 35ºC.

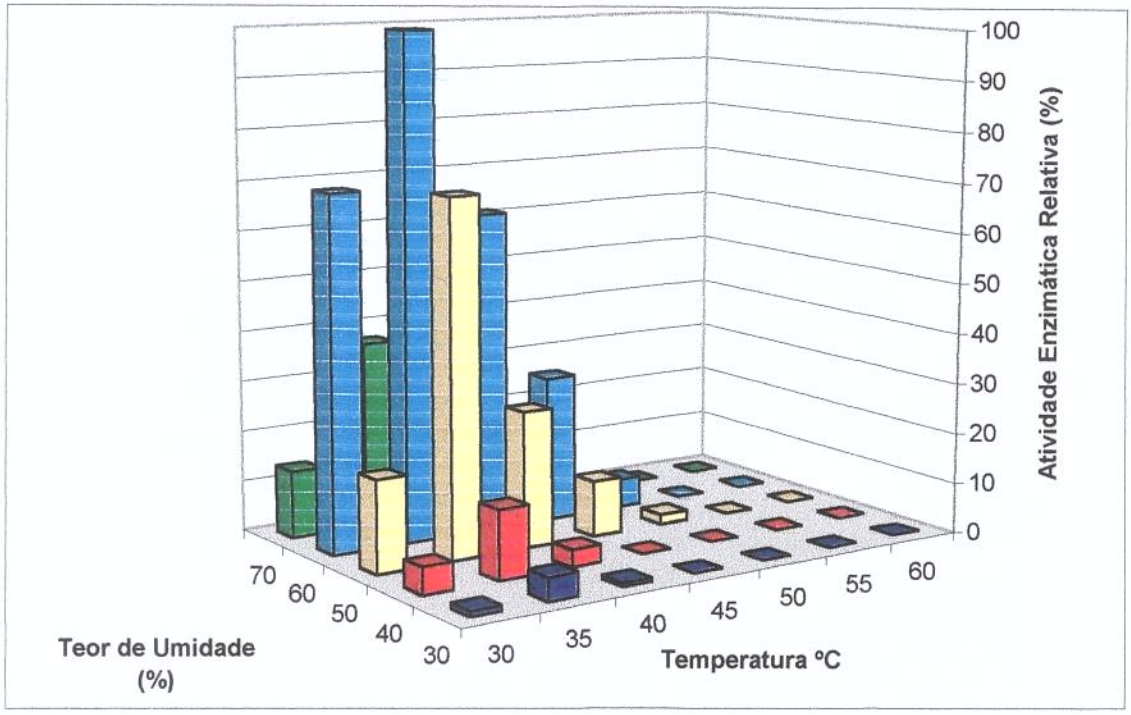


Figura 9: Efeito da temperatura de incubação e umidade do meio farelo de trigo na produção de lipase pela linhagem de *Aspergillus sp.* 1068 após 120 horas de fermentação

5.3- Adequação da relação enzima:substrato

Através deste experimento, foi possível constatar que a concentração adequada de extrato bruto liofilizado de lipase e substrato está ao redor de 20 mg de extrato bruto liofilizado/mL de substrato. Relações enzima: substrato, acima deste valor, não aumentaram significativamente a velocidade de hidrólise, conforme pode ser visto na **Figura 10.**

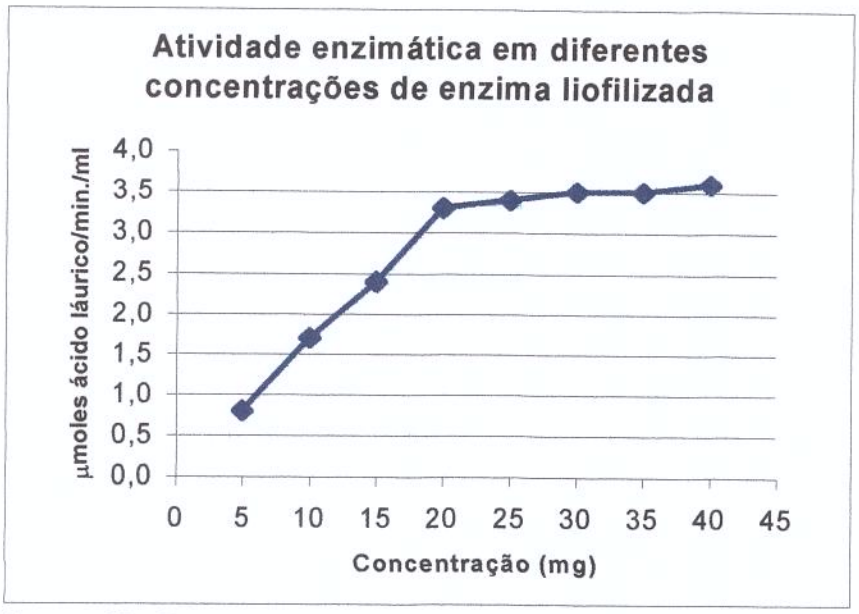


Figura 10: Concentração de enzima e velocidade de hidrólise

5.4- Extração das metilcetonas por diferentes sistemas

O ensaio foi realizado conforme descrito no item 4.2.4. O sistema de extração convencional sólido-líquido, se mostrou mais eficaz que o líquido-líquido testado, como ilustra a **Figura 11**.

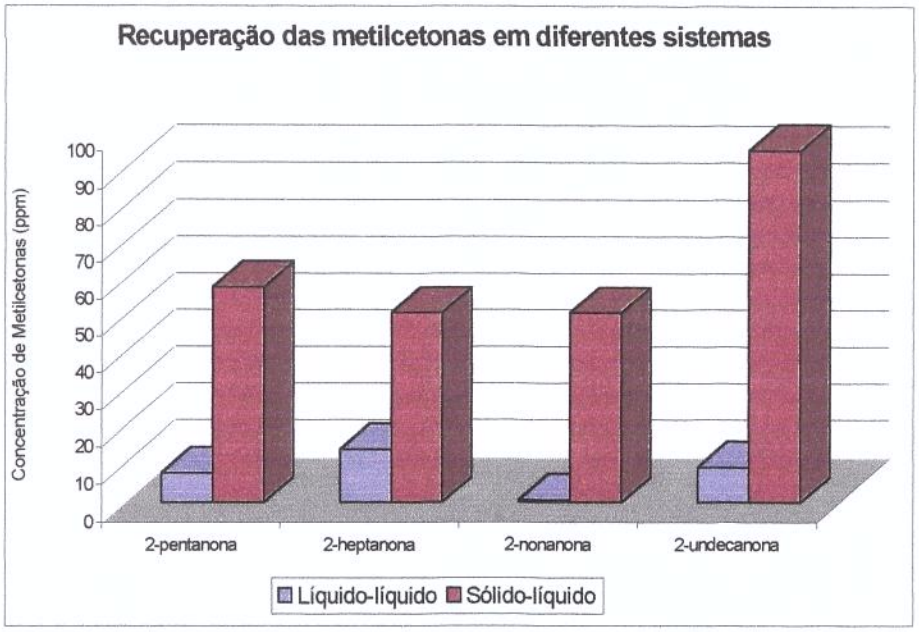


Figura 11: Teste de recuperação das metilcetonas em sistemas distintos.

5.5- Efeito do tempo de reação na produção de metilcetonas utilizando creme de leite de vaca e creme de leite de cabra como sustrato.

A produção de metilcetonas pelo emprego de creme de leite de vaca e creme de leite de cabra somente foi significativa quando incubou-se a mistura a 30ºC, permanecendo em quantidades traços (abaixo dos valores das curvas padrão) em temperaturas superiores, razão pela qual não foram expressos nas **Tabelas 2 e 3**, que mostram resultados muito semelhantes para ambos os substratos: a) a 2-heptanona foi a principal metilcetona produzida; b) no creme de leite de vaca a maior produção ocorreu com 48 horas de reação e no substrato creme de leite de cabra

com 24 horas, verificando-se valores decrescentes após tais tempos; c) a 2-nonanona somente foi encontrada nos meios após 24 e 48 horas de reação sendo que foi observada maior produção após 24 horas de reação do que após 48 horas. As tabelas mostram, também, que o creme de leite de cabra foi mais adequado que o creme de leite de vaca, registrando valores sensivelmente maiores tanto para a 2-heptanona quanto para a 2-nonanona.

Tabela 2: Efeito do tempo de reação na produção das metilcetonas a partir de creme de leite de vaca a 30°C.

		Tempo de reação (horas)				
	mg/g substrato	**24**	**48**	**72**	**96**	**120**
Metilcetonas	**2-pentanona**	0	0	0	0	0
	2-heptanona	0,69	0,72	0,60	0,43	0
	2-nonanona	0,38	0,32	0	0	0
	2-undecanona	0	0	0	0	0

Tabela 3: Efeito do tempo de reação na produção das metilcetonas a partir de creme de leite de cabra a 30°C.

		Tempo de reação (horas)				
	mg/g substrato	**24**	**48**	**72**	**96**	**120**
Metilcetonas	**2-pentanona**	0	0	0	0	0
	2-heptanona	0,80	0,76	0,66	0,46	0
	2-nonanona	0,44	0,38	0	0	0
	2-undecanona	0	0	0	0	0

5.6- Otimização da produção de metilcetonas utilizando gordura de coco

Dentre os substratos testados, aquele contendo gordura de coco mostrou-se o mais eficiente, sendo portanto o escolhido para os demais experimentos.

5.6.1- Efeito do pH na produção de metilcetonas a partir de gordura de coco foi testado como descrito no ítem 4.2.6

Pôde-se observar, na **Figura 12** que a produção das metilcetonas alcançou sua produção máxima em pH 5,5, diminuindo bruscamente a partir de pH 6,0. Tal perfil é bastante semelhante ao efeito do pH na atividade da lipase do microrganismo utilizado, conforme descrito por COSTA (1996) sugerindo, que a síntese de metilcetonas seja inteiramente dependente da disponibilidade de ácidos graxos presentes no meio de reação. O mesmo gráfico mostra também que a 2-heptanona em todas a faixa de pH é a metilcetona encontrada em maior concentração.

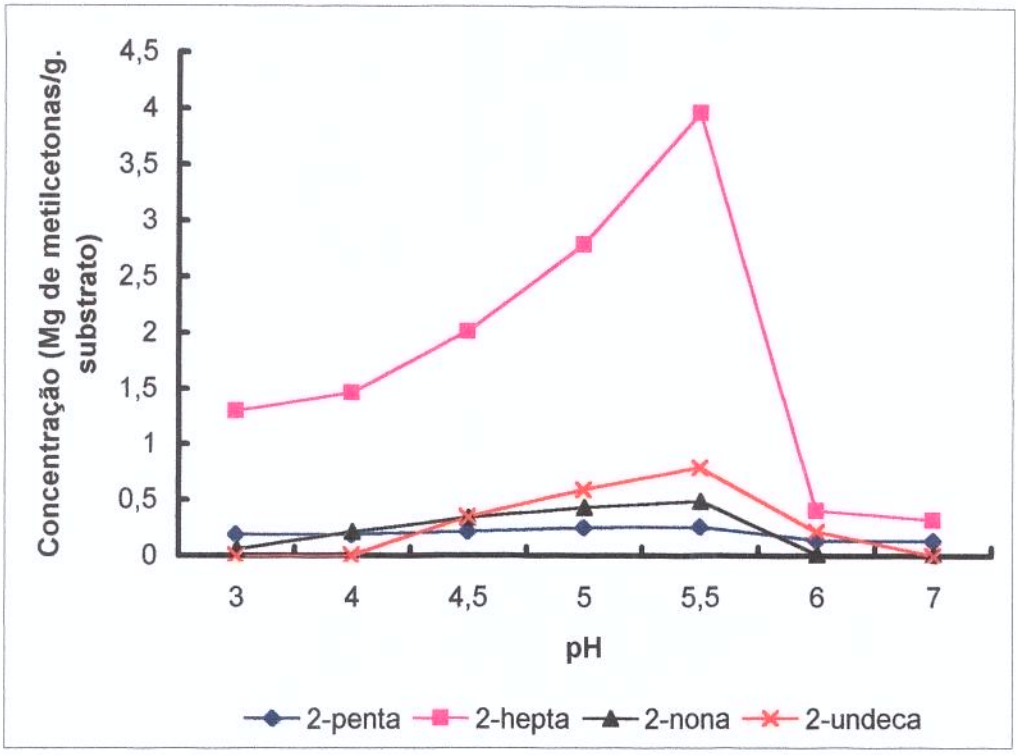


Figura 12: Efeito do pH na produção das metilcetonas utilizando gordura de coco como substrato.

5.6.2- Efeito do tempo e temperatura na produção de 2-pentanona a partir de gordura de coco foi testado como descrito no ítem 4.2.5

Como pode ser observado na **Tabela 4,** a linhagem de *Aspergillus sp* nº1068 mostrou baixa eficiência na produção de 2-pentanona, atingindo um máximo de 0,32 mg/g a 40ºC após 96 horas de incubação. Este foi o menor valor encontrado quando comparado

com as demais metilcetonas, nos respectivos valores máximos, conforme **Tabelas 5, 6** e **7**.

Tabela 4: Efeito do tempo e temperatura na produção da 2-pentanona em pH 5,5, utilizando gordura de coco como substrato.

Temperatura	Tempo de reação (horas)				
mg/g de substrato	24	48	72	96	120
30°C	0	0	0	0	0
40°C	0,22	0,26	0,26	0,32	0,17
50°C	0	0	0,14	0	0
60°C	0	0	0	0	0

5.6.3- Efeito do tempo e temperatura na produção de 2-nonanona a partir de gordura de coco foi testado como descrito no ítem 4.2.5

A produção máxima de 2-nonanona a partir de gordura de coco foi observada após 72 horas de incubação a 30° atingindo 0,49 mg/g de gordura (**Tabela 5**).

Tabela 5: Efeito do tempo e temperatura na produção da 2-nonanona (valores expressos em mg/g de substrato–pH 5,5) a partir de gordura de coco.

	24	48	72	96	120
30°C	0,36	0,45	0,49	0,19	0,18
40°C	0,19	0,21	0,25	0,1	0,09
50°C	0	0	0,02	0	0
60°C	0	0	0	0	0

5.6.4- Efeito do tempo e temperatura na produção de 2-undecanona a partir de gordura de coco foi testado como descrito no ítem 4.2.5

Conforme mostrado na **Tabela 6,** a 2-undecanona foi produzida pela linhagem de *Aspergillus sp* nº 1068 em quantidades relevantes, principalmente, quando comparada com a 2-pentanona e o 2-nonanona. De maneira interessante, sua síntese, praticamente só ocorreu na temperatura de 40^{o}C, alcançando um pico máximo após 48 h de reação. Desta forma, num hipotético processo industrial, tal composto não seria produzido, uma vez que o mesmo deveria ser desenvolvido a 30^{o}C, onde se verificou a produção máxima de 2-heptanona e 2-nonanona, as mais importantes na formação dos aromas do *"Blue Cheese"* (CHALIER & CROUZET, 1998).

Tabela 6: Efeito do tempo e temperatura na produção da 2-undecanona (valores expressos em mg/g de substrato–pH 5,5) a partir de gordura de coco.

	24	48	72	96	120
30°C	0	0	0	0	0
40°C	0,57	0,79	0,65	0,33	0,32
50°C	0	0	0,28	0	0
60°C	0	0	0	0	0

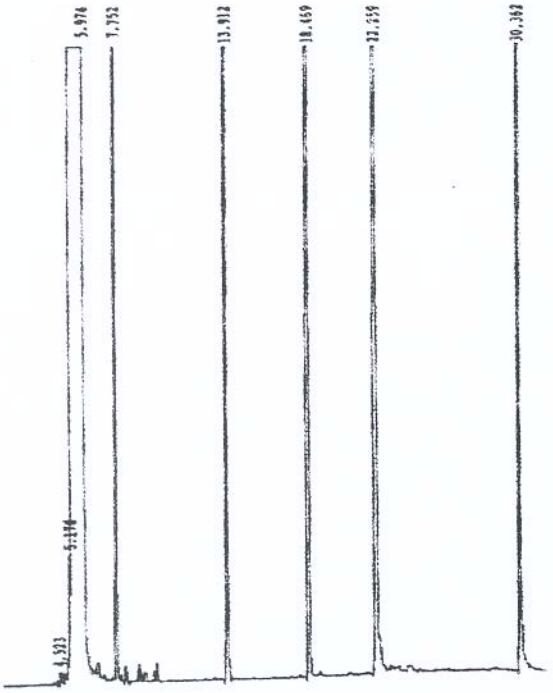
5.6.5- Efeito do tempo e temperatura na produção de 2-heptanona a partir de gordura de coco foi testado como descrito no ítem 4.2.5

A linhagem de *Aspergillus sp* nº 1068 mostrou grande eficiência na produção de 2-heptanona. Como pode-se observar na **Tabela 7**, foi obtido 3,98 mg de 2-heptanona/g de substrato após 48 horas de reação a 30°C.

Tabela 7: Efeito do tempo e temperatura na produção da 2-heptanona (valores expressos em mg/g de substrato–pH 5,5).

	24	48	72	96	120
30°C	3,29	3,98	3,51	2,11	1,96
40°C	2,81	2,89	2,17	2,01	1,39
50°C	0	0	0	0	0
60°C	0	0	0	0	0

Os cromatogramas abaixo, ilustram a produção de metilcetonas a partir de gordura de coco:



Cromatograma 1- Padrão Cromatográfico – (7.752 – 2 pentanona, 13.912 – 2 heptanona, 18.469 – Caproato de etila, 22.259 – 2 nonanona, 30.362 – 2 undecanona.

Cromatograma 2- Amostra com gordura de coco, submetida a uma temperatura de 30°C por 24 horas.

5.6.6- Comparação do total de metilcetonas produzidas em relação a metilcetona 2-heptanona

A **Figura 14** mostra que em condições ótimas de pH (5,5) e temperatura (30°C) a linhagem *Aspergillus sp* 1068 sintetizou até 4.43 mg/g de metilcetonas o que pode ser considerado um valor expressivo uma vez que o aroma de *"Blue cheese"* se manifesta, ainda que as metilcetonas sejam adicionadas em baixíssimas concentrações em produtos alimentares, o que dependendo de avaliações mais precisas indicam como tendo potencialidade para emprego industrial. A **Figura 14** ilustra também que o perfil de produção das metilcetonas totais, em função do tempo, se desenvolve paralelamente ao da 2-heptanona por ser esta a principal entre as metilcetonas sintetizadas pela linhagem estudada.

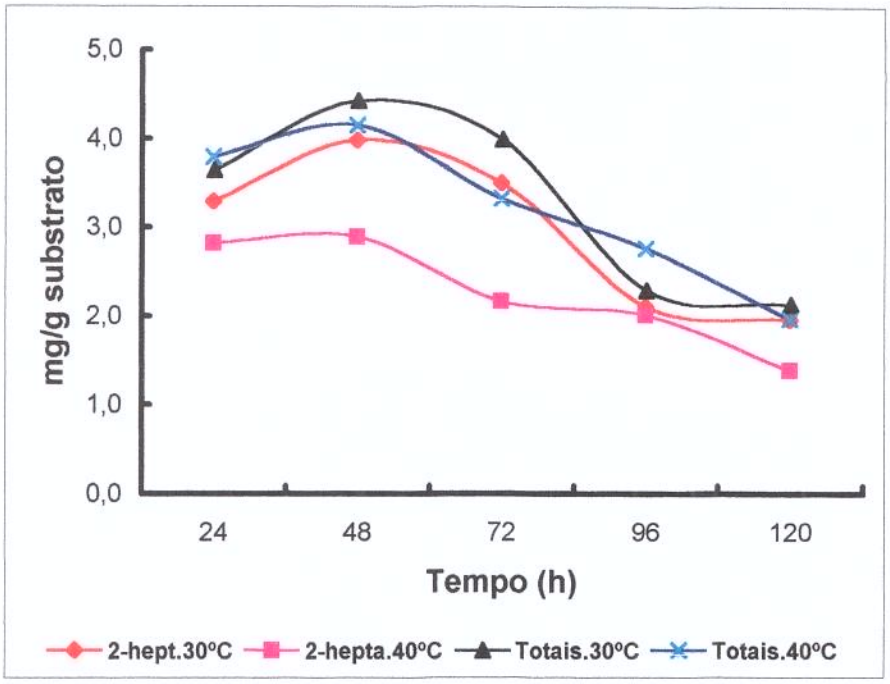


Figura 14: Concentração de metilcetonas totais em comparação ao teor de heptanona

Da análise conjunta das **Tabelas 2, 3** (menor produção de metilcetonas em creme de leite de vaca e de cabra) e da **Tabela 7** e **Figura 14** (elevada síntese de 2-heptanona, em gordura de coco), pode-se sugerir que a produção destes voláteis de aroma pelos esporos em fase de germinação da linhagem ora estudada esteve na dependência da presença do ácido láurico nos meios de reação. Segundo OLIVEIRA (1998) os teores desse ácido graxo nos cremes de leite de vaca e de cabra, onde se verificou baixa produção de metilcetonas, não passam de 2,5%. Por outro lado, COSTA (1996) verificou que a lipase produzida pela linhagem *Aspergillus sp* 1068

liberou grandes concentrações de ácido láurico a partir da gordura de coco, resultado este citado na **Tabela 1** deste trabalho refletindo, portanto, uma maior produção de metilcetonas quando este substrato foi utilizado. Esta observação está em pleno acordo com os resultados, recentemente, relatados por CHALIER & CROUZET (1998) que conseguiram aumentar em, aproximadamente, 30 vêzes a produção de metilcetonas pelos esporos, em fase de germinação, de duas linhagens de *Penicillium roqueforti* após a lipólise da gordura de coco pelo emprego de uma lipase de *Candida cylindraceae*. A 2-heptanona foi a metilcetona relatada como predominante por aqueles autores, da mesma forma que os resultados expressos na **Figura 12** deste trabalho.

Apesar da 2-heptanona ter sido, também, a metilcetona obtida em maior concentração quando cremes de leite de vaca e de cabra (pobres em ácido láurico) foram utilizados como substrato, sua síntese ocorreu em teores 5 vezes menores, aproximadamente. Outra explicação para a menor produção de metilcetonas proporcionadas por estes substratos seria a menor concentração de lipídios totais, uma vez que o teor de gordura do creme de leite de vaca e creme de

leite de cabra é cerca de 30 %, segundo valores expressos no rótulo de tais produtos encontrados no comércio.

Segundo CHALIER & CROUZET (1998) ácidos dodecanóicos apresentam grande propensão para a síntese de 2-undecanona. Assim, a menor produção deste composto aromático obtida quando gordura de coco foi utilizada como substrato, tanto por aqueles autores quanto neste trabalho, talvez, seja explicada pela especificidade dos esporos das respectivas linhagens pela oxidação preferencial do ácido láurico para a 2-heptanona. Não foi encontrado na literatura, o mecanismo pelo qual esporos de um microrganismo é capaz de produzir 2-heptanona (normalmente, proveniente de ácidos octanóicos) a partir de um ácido dodecanóico. Entretanto, uma hipótese simples seria a de que tais ácidos dêem dois giros completos pelo ciclo da β-oxidação dos ácidos graxos, convertendo-se em um ácido octanóico, sendo aí desviado para a síntese da 2-heptanona.

É possível perceber, nos últimos anos, uma tendência de utilização de lipase exógena para se obter aumento na síntese de metilcetonas por linhagens de *Penicillium roqueforti*, quando o objetivo é o de produção de concentrados de tais compostos para emprego na aromatização de outros produtos como molhos para saladas, sopas,

biscoitos, bolos, etc. Assim, anteriormente ao trabalho de CHALIER & CROUZET (1998), TOMASINI *et. al.* (1995) aplicaram **lipase R** do próprio *P. roqueforti* em cremes obtidos de leite concentrado e uma mistura de lactose e proteínas de soja, aumentado a produção em metilcetonas em 1,2 vezes quando comparado ao processo tradicional. Os autores, entretanto, chamaram a atenção para a existência de uma concentração ótima de ácidos graxos livres no substrato, uma vez que, em excesso, podem inibir o processo da β-descarboxilação a ser desenvolvida pelos esporos do microrganismo. Usando um processo de fermentação submersa, KIRANE *et. al.* (1997) inocularam esporos de *P. roqueforti* em um meio composto por isolado de proteínas de soja, creme de leite contendo 35% de gordura e altas concentrações de lactose e **lipase R** em algumas amostras. Os autores concluíram que as amostras que receberam a lipase exógena continham mais ácidos graxos livres e a produção das metilcetonas foram verificadas em apenas 6 horas de fermentação. Além disso, as concentrações de 2-nonanona, 2-undecanona e 2-heptanona foram aumentadas em 6, 14 e 18 vezes, respectivamente.

Apesar de uma avaliação positiva em termos quantitativos de metilcetonas produzidas pela linhagem ora estudada, os trabalhos de

TOMASINI *et al* (1995), KIRANE *et al* (1997), e CHALIER & CROUZET (1998) abrem as perspectivas da possibilidade de se obter resultados ainda melhores pelo emprego de lipases exógenas na obtenção de concentrados de aromas de *Blue Cheese,* pelo uso deste microrganismo. Outro aspecto bastante positivo exibido pelo *Aspergillus sp* nº1068 é a sua seletividade na produção de 2-heptanona. Tal composto, seguido da 2-nonanona, vem sendo citado pela maioria dos autores como a principal metilcetona no desenvolvimento do aroma de *Blue Cheese.* Assim, na última década inúmeros autores como CREULY *et. al.* (1990); LARROCHE *et. al.* 1994 e 1996); LUBBERS *et. al.* (1997) têm concentrado seus trabalhos no sentido de encontrar melhores misturas de substratos e de condições de fermentação para o aumento dos teores de 2-heptanona nos concentrados de metilcetonas para a aromatização de vários tipos de alimentos

6- CONCLUSÕES

1- A linhagem de *Aspergillus sp* 1068 apresentou atividade lipolítica acentuada sobre gordura de coco, liberando ácido láurico.

2- A maior produção de lipase feita pela citada linhagem ocorreu após 120 horas de incubação em meio composto por farelo de trigo com 60 % de umidade e à 35°C.

3- A maior produção de metilcetonas foi obtida em gordura de coco, cuja síntese alcançou 4,43 mg/g, valor aproximadamente 5 vezes maior que o obtido com creme de leite de vaca e de cabra.

4- A principal metilcetona obtida foi à 2 heptanona, em todos os substratos utilizados.

5- As melhores condições para a produção de metilcetonas utilizando gordura de coco foi encontrada em pH 5,5, após 48 horas de reação e a 30°C.

6- Os resultados obtidos sugerem que a linhagem *Aspergillus sp* 1068 apresenta potencialidade para emprego industrial na obtenção de concentrados de metilcetonas para formulação de produtos alimentícios com o aroma de "**Blue Cheese**".

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, D. F.; DAY, E. A. Quantitation, evaluation, and effect of certain microorganisms on flavor components of *blue cheese*. J. Agr. Food Chemistry, v. 14, nº 3, p. 241, 1966.

ANDERSON, D. F.; DAY, E. A. Quantitative analysis of the major free fatty acids in *blue cheese*. Journal of Dairy Science, v. 48, nº 2, p. 248-249, 1965.

CHALIER, P.; CROUZET, J. Production of volatile components by *Penicillium roqueforti* cultivated in the presence of soy bean oil. Flavour-and-Fragance-Journal, v. 8, nº 1, p. 43-49, 1993.

COSTA, M. C. Produção e caracterização de lipase de *Aspergillus sp,* Campinas, 1996, 107p. Dissertação (mestre em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas.

CREULY, C.; *et al.* Bioconversion of free fatty acids methyl ketones by spores of *Penicillium roqueforti* in a water-organic solvent, two-phase system. Enzyme Microb. Technol., v.14, p. 669-678; 1992.

DARTEY, C. K.; *et al.* Rate of forming of methyl ketones during *blue cheese* ripening. J. Agr. Food Chem., v. 19, nº 4, p. 771-774, 1971.

DARTEY, C.K.; KINSELLA, J.E. Metabolism of [U-^{14}C] lauric acid to methyl ketones by spores of *Penicillium roqueforti*. J. Agr. Food Chem., v. 21, nº 6, p. 933, 1973 (a).

DARTEY, C.K.; KINSELLA, J.E. Oxidation of sodium (U-14C) palmitate into carboyl compounds by *Penicillium roqueforti* spores. Journal of Agr. Food Chemistry, v. 21, nº 4, p. 721, 1973 (b).

DIRINCK, P. & De WINNE, A . Flavor characterization ans classification of cheese by gas chromatographic-mass spectrometric profiling. ***Journal of Chromatography***, ***847***: (1-2) 203-208, 1999.

DOLEZALEK, J.; HOZA, I. Effect of *Penicillium roqueforti* on milk fat. II. Effect of strains of *Penicillium roqueforti* on the formation of aldehydes and 2-ketones in the Czapek-Dox liquid medium with fat. Sbornik-Vysoke-Skoly-Chemicko-Technologicke-v-Praze, -E-Potraviny, v. 26, p. 45-50, 1969.

DWIVEDI, B. K.; KINSELLA, J. E. Carbonyl production from lipolyzed milk fat by the continuous mycelial culture of *Penicillium roqueforti*. Journal of Food Science, v. 39, p. 83-87, 1974 (b).

DWIVEDI, B. K.; KINSELLA, J. E. Continuous production of blue-type cheese flavor by submerged fermentation of *Penicillium roqueforti*. J. Food Science, v. 39, p. 620-622, 1974 (a).

FAN, T. Y.; KINSELLA, J. E. Methyl Ketone formation during germination of *Penicillium roquefortii*. J. Agric. Food Chem., v. 24, nº 3, p. 443-448, 1976.

FRUTOS, M.; SANZ, J.; MARTINEZ-CASTRO, I. Characterization of artisanal cheeses by GC and GC/MS analysis of their medium volatility (SDE) fraction. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 39, p. 524-530, 1991.

HATTON, P. V.; KINDERLERER, J. L. Toxicity of medium chain fatty acids to *Penicillium crustosum* Thom and their detoxification to methyl ketones. Journal of Applied Bacteriology, v. 70, p. 401-407, 1991.

JOLLIVET, N.; BELIN, J. M. Comparison of volatile flavour compounds produced by ten strains of *Penicillium camemberti* thom. Journal of Dairy Science, v. 76, p. 1837-1844, 1993.

JOLLY, R.; KOSIKOWSKI, F. V. A new *blue cheese* food material from ultrafiltrated skim milk and microbial enzyme-mold spore

reacted fat. Journal of Dairy-Science, v. 58, nº 9, p. 1272-1275, 1975 (b).

JOLLY, R.; KOSIKOWSKI, F. V. *Blue cheese* flavor by microbial lipases and mold spores utilising whey powder, butter and coconut fats. J. Food Science, v. 40, p. 285, 1975 (a).

KIM, J.; LINDSAY, R. C. Contribuitions of cow, sheep, and goat milks to characterizing branched-chain fatty acids and phenolic flavors in varietal cheeses. Journal of Dairy Science, v. 74, p. 3267-3274, 1991.

KINDERLERER, J. L. Conversion of coconut oil to methyl ketones by two *Aspergillus species.* Phytochemistry, v. 26, nº 5, p. 1417, 1987.

KINDERLERER, J. L.; KELLARD, B. Ketonic rancidity in coconut due to xerophilic fungi. Phytochemistry, v. 23, nº 12, p. 2847-2849, 1984.

KINSELLA, J.E.; HWANG, D. Biosynthesis of flavors by *Penicillium roqueforti.* Biotechnology and Bioengineering, v. 18, p. 927-938, 1976.

KRANZ, C.; PANITZ, C.; KUNS, B. Biotransformation of free fatty acids in mixtures to methyl ketones by *Monascus purpureus.* App.

Microbiol. Biotechnol, v. 36, p. 436, 1992.

KRIVENTSOVA, V.F. Carbonyl compounds in roquefort cheese. Izvestiya-Vysshikh-Uchebnykh-Zavedenii-Pishchevaya-Tekhnologiya, v. 3, p. 27-29, 1971.

KUNDU, A.K.; PAL, N. Influence of culture and nutricional conditions on the production of lipase by submerged culture of *Aspergillus niger*. Journal Fermentation Technology, v. 56, p. 593-598, 1978.

LARROCHE, C.; BESSON, I.; GROS, J. B. Behavior of spores of *Penicillium roqueforti* during fed-batch bioconversion of octanoic acid into 2-heptanone. Biotechnology and Bioengineering, v. 44, p. 699-709, 1994.

LARROCHE, C.; BESSON, I.; GROS, J. B. Internal substrate concentrations during biotransformation of octanoic acid into 2-heptanone by spores of *Penicillium roqueforti*. Journal of Industrial Microbiology, v. 16, p. 29-35, 1996.

LARROCHE, C.; GROS, J. B. Batch and continuous 2-heptanone production by Ca-alginate/eudragit RL entrapped spores of *Penicillium roqueforti*. Biotechnology and Bioengineering, v. 34, p. 30-38, 1989 (b).

LARROCHE, C.; MUHAMMAD, A.; GROS, J. B. Methyl-ketone production by Ca-alginate/eudragit RL entrapped of *Penicillium roqueforti*. Enzyme Microb. Technol., v. 11, p. 106-112, 1989 (a).

LAWRENCE, R. C. The metabolism of triglycerides by spores of *Penicillium roqueforti*. J. Gen. Microbiol., v. 46, p. 65, 1967.

LAWRENCE, R. C. The oxidation of fatty acids by spores of *Penicillium roqueforti*. J. Gen. Microbiol., v. 44, p. 393, 1966.

LAWRENCE, R. C.; HAWKE, J. C. The oxidation of fatty acids by mycelium of *Penicillium roqueforti*. J. Gen. Microbiol., v. 51, p. 289, 1968.

LIEBICH, H. M. DOUGAS, D.R.; BAYER, E.; ZLATKIS, A.; Comparative characterization of different types of cheese by gas-liquid chromatography. Journal of Chromatographic Science, v. 8, p. 351-354, 1970.

LLANO, D. G.; RAMOS, M.; POLO, C.; SANZ, J.; MARTINEZ-CASTRO, I. Evolution of the volatile components of an artisanal *blue cheese* during ripening. Journal of Dairy Science, v. 73, p. 1676-1683, 1990.

NELSON, J. H. Production of *blue cheese* flavor via submerged fermentation by *Penicillium roqueforti.* J. Agr. Food Chem., v. 18, nº 4, p. 567, 1970.

OKUMURA, J.; KINSELLA, J. E. Methyl ketones formation by *Penicillium camemberti* in Model System. Journal of Dairy Science, v. 68, p. 11-15, 1984.

OLIVEIRA, J. G. Produção biotecnológica de metilcetonas por linhagem de *Aspergillus sp,* Campinas, 1998, 91p. Dissertação (mestre em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas.

PANNEL, L. K.; OLSON, N.F. Methyl ketone production in milk-fat-coated microcapsules. Variation of lipase and spore concentrations. Journal of Dairy Science, v. 74, p. 2048-2053, 1991.

PIRAPREZ, G.; HERENT, M.F.; COLLIN, S. Flavor retention by lipids in a fresh cheese matrix. ***Food Chemistry***, ***61***: (1-2) 119 – 125, 1998.

SBAMPATO, C.G.; ABREU, L.R.; FURTADO, MM. Gorgonzola type cheese manufactured with milk pasteurized by the HTST and

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

steams: physic-chemical and sensory parameters. ***Pesquisa Agropecuária Brasileira***, ***35***(1): 191-200, 2000.

SCHWARTZ, D. P.; PARKS, O. W. Quantitative analysis of methyl ketones in Blue Cheese fat. Journal of Dairy Science, v. 46, nº 9, p. 989-990,1963.

TAYLOR, F. *Blue cheese* flavour production by submerged fermentation with on-line monitoring by gas chromatography. Journal of Industrial Microbiology, v. 15, p. 71, 1995.

van der SCHAFT, P.; BURG, N. van der BOSCH, S. COHEN, A. Fed-batch production of 2-heptanone by *Fusarium poae*. Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 36, p. 709, 1992.

YAGI, T.; KAWAGUCHI, M.; HATANO, T.; FUKUI, F.; FUKUI, S. Production of ketoalkanes from fatty acid esters by fungus, *Trichoderma sp*. Journal of Fermentation and Bioengineering, v. 68, nº 3, p. 188-192, 1989.

YAGI, T.; KAWAGUCHI, M.; HATANO, T.; FUKUI, F.; FUKUI, S. Screening of methylketone-accumulating fungi from type culture strains. Journal of Fermentation and Bioengineering, v. 70, nº 2, p. 94-99, 1990.