

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

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por HAMILTON ROBERTO FORTES BAVUTTI e aprovada pela Comissão Julgadora em 24.02.97.

Campinas, 24 de fevereiro de 1997

  
Prof.ª Dra. LÚCIA R. DURRANT

Presidente da Banca

**“SÍNTESE DE VANILINA A PARTIR DE DERIVADOS  
FENÓLICOS DA LIGNINA”**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas pelo Farmacêutico-Bioquímico **Hamilton Roberto Fortes Bavutti** para obtenção do Título de Mestre em Ciência de Alimentos, sob a orientação da **Prof.ª Dr.ª Lucia Regina Durrant**.

Campinas, Fevereiro de 1997.

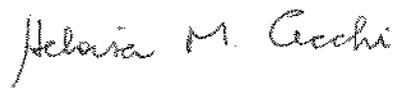
UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

730452

# Banca Examinadora



**Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Lucia Regina Durrant**  
**Orientadora**



**Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Heloisa Mascia Cecchi**  
**Membro**



**Dr.<sup>a</sup>. Tania Akiko Anazawa**  
**Membro**

**Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre**  
**Membro**

*"Trilha a tua estrada  
A tua direção  
Não perca tempo não  
Levanta essa cabeça e vai  
O caminho não se encontra  
A gente mesmo faz  
E quando a estrada é longa  
A gente vive mais  
Se liga... Siga o seu coração  
O grande lance é ser feliz  
O que for na vontade vale,  
E o que for de verdade vale  
E o que for numa boa vale  
O grande lance é a gente ser  
feliz".*

*Rogério Flausino  
(j. quest - 1996).*

*Aos meus pais, irmãos e avó,  
pelo incentivo.*

*Ao tio Carlinhos,  
pelo exemplo de vida dedicada  
ao ensino e à educação.*

*Dedico*

# Agradecimentos

*“No período de março de 1995 a fevereiro de 1997 muitas coisas aconteceram: perdas, descobertas e uma infinidade de momentos difíceis. Não sei dizer. Levar adiante este trabalho sem demonstrar a minha gratidão a quem colaborou para o seu desenvolvimento seria, no mínimo, uma omissão de minha parte. As pessoas seguintes contribuíram com sua mágica, fé, tempo, energia, visão, paixão, apoio e amizade de uma forma única”.*

- À Deus.
- À professora Lucia Regina Durrant pela sua orientação, incentivo e confiança. Obrigado por acreditar em mim.
- À FEA, através de sua direção, biblioteca e coordenadoria de pós-graduação, pelas condições oferecidas para o desenvolvimento desta pesquisa.
- À banca examinadora pela leitura e sugestões para a elaboração desta dissertação.
- Ao CNPq, pelo auxílio financeiro.
- À Margarete, da secretaria de pós-graduação, por sua extrema competência e infindável paciência.
- Aos amigos do laboratório, em especial à Andrea, Daniela M., Edilsa, Eli, Eliane e Raquel, pelo convívio e apoio constantes.
- À Dona Norberta, pelo carinho e dedicação.
- À Daniela Franco e Tania, que além de amizade transmitiram um pouco de seus conhecimentos.

- À Erika Pavarina que, como eu, soube entender as dificuldades e acreditou que valia a pena o esforço. Pelo carinho e respeito.
- À Lara Sette, que contagiou a todos com seus momentos de alegria e sua forma “engraçada” de ver as coisas. Obrigado.
- Aos amigos Luis Leoni e Antônio Marcolino pelos ensinamentos de uma amizade. Sem sua ajuda e incentivo tudo teria sido mais difícil.
- Ao Marco Antonio, amigo desde os tempos de Londrina, pelo companheirismo e amizade, o meu muito obrigado.
- À Regina Furlani e Luciane pela força nos primeiros meses em Campinas.
- À minha família, pelo apoio nas horas difíceis.
- Aos amigos de Londrina, por estarem sempre comigo.

***“Sua ajuda sempre me deu  
uma nítida sensação de conforto e acalanto,  
emocional e espiritual ... Obrigado!”***

## ÍNDICE GERAL

|  | Página |
|--|--------|
| ÍNDICE DE TABELAS.....   | iv     |
| ÍNDICE DE FIGURAS.....   | v      |
| RESUMO.....  | viii   |
| SUMMARY.....   | ix     |
| 1.INTRODUÇÃO.....  | 1      |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....  | 4      |
| 2.1.Vanilina.....  | 4      |
| 2.1.1. Considerações gerais.....                                     | 4      |
| 2.1.2. Requisitos naturais.....                                      | 5      |
| 2.1.3. Adulteração do extrato bruto.....                             | 7      |
| 2.2. Ácido ferúlico.....   | 7      |
| 2.2.1. Considerações gerais.....                                     | 7      |
| 2.2.2. Ocorrência do ácido ferúlico.....                             | 9      |
| 2.2.3. Degradação do ácido ferúlico.....                             | 10     |
| 2.2.3.1. Microrganismos capazes de degradar o<br>ácido ferúlico..... | 11     |
| 2.3. Eugenol.....  | 17     |
| 2.3.1. Considerações gerais.....                                     | 17     |

|   |    |
|---|----|
| 2.3.2. Degradação do eugenol.....   | 18 |
| 2.4. Métodos cromatográficos para determinação da vanilina...   | 19 |
| 2.5. Enzimas do sistema ligninolítico.....  | 21 |
| 2.5.1. Lignina-peroxidase (LiP).....  | 21 |
| 2.5.2. Manganês-peroxidase (MnP).....   | 22 |
| 2.5.3. Fenol-oxidases.....  | 22 |
| 2.5.4. Oxidases.....  | 22 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS.....  | 24 |
| 3.1. Solventes, reagentes e materiais diversos.....   | 24 |
| 3.2. Equipamentos.....  | 24 |
| 3.3. Microrganismos.....  | 25 |
| 3.4. Seleção dos fungos.....  | 26 |
| 3.4.1. Síntese de vanilina.....   | 26 |
| 3.4.2. Determinação de vanilina por cromatografia líquida<br>de alta eficiência (CLAE).....               | 27 |
| 3.4.2.1. Padrões.....   | 27 |
| 3.4.2.1.1. Preparo das soluções estoque...  | 27 |
| 3.4.2.1.2. Preparo das soluções trabalho...   | 27 |
| 3.4.2.2. Preparo da curva padrão de vanilina.....   | 28 |
| 3.4.3. Perfil de crescimento dos fungos em meios de<br>cultura líquidos contendo compostos fenólicos..... | 28 |
| 3.5. Experimentos.....  | 29 |
| 3.5.1. Inóculo.....   | 29 |
| 3.5.2. Condições de cultivo.....  | 30 |
| 3.5.3. Obtenção dos filtrados.....  | 32 |
| 3.6. Determinações enzimáticas.....   | 32 |
| 3.6.1. Atividade de lignina-peroxidase (LiP).....   | 33 |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.6.2. Atividade de álcool veratrílico-oxidase (AVO).....                    | 33        |
| 3.6.3. Atividade de manganês-peroxidase (MnP).....                           | 34        |
| 3.6.4. Atividade de lacase.....  | 34        |
| 3.6.5. Atividade de peroxidase.....  | 35        |
| <b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>  | <b>36</b> |
| 4.1. Curva padrão de vanilina.....   | 36        |
| 4.2. Seleção dos fungos produtores de vanilina.....                          | 37        |
| 4.2.1. Quantificação por CLAE.....   | 37        |
| 4.2.1.1. Resultados cromatográficos.....                                     | 40        |
| 4.2.1.2. Espectroscopia de absorção.....                                     | 43        |
| 4.2.2. Perfil de crescimento dos fungos frente a<br>diversos substratos..... | 44        |
| 4.3. Experimentos.....   | 46        |
| 4.4. Efeito do pH sobre a síntese de vanilina.....                           | 55        |
| 4.5. Determinação da atividade de enzimas ligninolíticas.....                | 59        |
| 4.5.1. Atividade de lignina-peroxidase.....                                  | 59        |
| 4.5.2. Atividade de álcool veratrílico-oxidase.....                          | 60        |
| 4.5.3. Atividade de manganês-peroxidase.....                                 | 62        |
| 4.5.4. Atividade de lacase.....  | 63        |
| 4.5.5. Atividade de peroxidases.....   | 65        |
| <b>5. CONCLUSÕES.....</b>  | <b>67</b> |
| <b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                                    | <b>69</b> |

**ÍNDICE DE TABELAS**

|  | Página |
|--|--------|
| Tabela 1. Determinação de vanilina por CLAE.....   | 20     |
| Tabela 2. Composição do meio de cultura basal.....   | 27     |
| Tabela 3. Experimentos realizados visando a síntese de vanilina.....   | 31     |
| Tabela 4. Comparação do tempo de retenção, área dos picos e concentração de vanilina obtidos através dos cromatogramas das amostras dos fungos desenvolvidos em meio de cultura contendo ácido ferúlico..... | 39     |
| Tabela 5. Perfil do crescimento dos fungos em vários substratos.....   | 45     |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   | Página |
|---|--------|
| Figura 1. Estrutura química da vanilina.....  | 5      |
| Figura 2. Produção mundial de extrato de baunilha.....  | 6      |
| Figura 3. Estrutura química do ácido ferúlico.....  | 8      |
| Figura 4. Principal via de degradação do ácido ferúlico e eugenol por microrganismos.....   | 17     |
| Figura 5. Estrutura química do eugenol.....   | 18     |
| Figura 6. Equação para cálculo da atividade das enzimas ligninolíticas.....   | 33     |
| Figura 7. Curva de calibração da vanilina.....  | 36     |
| Figura 8. Quantificação da produção de vanilina nos diversos fungos estudados, por CLAE.....  | 38     |
| Figura 9. Perfil cromatográfico do padrão de vanilina .....   | 40     |
| Figura 10. Perfil cromatográfico dos padrões de ácido ferúlico e ácido vanílico .....   | 41     |
| Figura 11. Perfil cromatográfico da amostra do fungo linhagem 755 (A) e 1051 (B) obtidos a partir dos testes realizados.....  | 42     |
| Figura 12. Espectro de absorção do padrão de vanilina, composto coletado durante análise cromatográfica do caldo obtido do crescimento do fungo 755 - teste 7 e do fungo 1051 - teste 2. A = Absorbância..... | 43     |
| Figura 13. Produção de vanilina obtida no teste 1.....  | 47     |
| Figura 14. Produção de vanilina obtida no teste 2.....  | 48     |

|   |    |
|---|----|
| Figura 15. Produção de vanilina obtida no teste 3.....  | 49 |
| Figura 16. Produção de vanilina obtida no teste 4.....  | 50 |
| Figura 17. Produção de vanilina obtida no teste 5.....  | 51 |
| Figura 18. Produção de vanilina obtida no teste 6.....  | 52 |
| Figura 19. Produção de vanilina obtida no teste 7.....  | 53 |
| Figura 20. Efeito do pH e da massa celular sobre a síntese de vanilina observados nos testes 3 (Figura 20-A) e 6 (Figura 20-B)..... | 56 |
| Figura 21. Efeito do pH e da massa celular sobre a síntese de vanilina observados nos testes 4 (Figura 21-A) e 7 (Figura 21-B)..... | 58 |
| Figura 22. Atividade de lignina-peroxidase nos meios líquidos de crescimento do fungo linhagem 755.....                             | 59 |
| Figura 23 Atividade de lignina-peroxidase nos meios líquidos de crescimento do fungo linhagem 1051.....                             | 60 |
| Figura 24. Atividade de álcool veratrílico-oxidase nos meios líquidos de crescimento do fungo linhagem 755.....                     | 61 |
| Figura 25. Atividade de álcool veratrílico-oxidase nos meios líquidos de crescimento do fungo linhagem 1051.....                    | 61 |
| Figura 26. Atividade de manganês - peroxidase nos meios líquidos de crescimento do fungo linhagem 755.....                          | 62 |
| Figura 27. Atividade de manganês - peroxidase nos meios líquidos de crescimento do fungo linhagem 1051.....                         | 63 |
| Figura 28. Atividade de lacase nos meios líquidos de crescimento do fungo linhagem 755.....   | 64 |
| Figura 29. Atividade de lacase nos meios líquidos de crescimento do fungo linhagem 1051.....  | 64 |
| Figura 30. Atividade de peroxidase nos meios líquidos de  |    |

|  |    |
|--|----|
| crescimento do fungo linhagem 755.....                   | 65 |
| Figura 31. Atividade de peroxidase nos meios líquidos de |    |
| crescimento do fungo linhagem 1051.....                  | 66 |

## RESUMO

No presente trabalho 37 fungos isolados das margens do rio Una do Prelado, na Estação Ecológica Juréia-Itatins foram estudados quanto a sua capacidade de sintetizar vanilina a partir do ácido ferúlico e do eugenol. Alguns testes foram realizados variando-se os substratos, e utilizando-se agitação ou culturas estáticas. Após a seleção baseada no perfil de crescimento dos fungos frente a substratos diversos e nos cromatogramas obtidos dos caldos de crescimento, as linhagens que apresentaram melhores resultados de produção de vanilina foram 755 (55,2 mg/L - teste 7) e 1051 (27,1 mg/L - teste 2). O método utilizado para a quantificação da vanilina foi a cromatografia líquida de alta eficiência utilizando-se uma coluna ZORBAX ODS (fase reversa) e detecção a 279 nm. O espectro de absorção UV foi utilizado para a confirmação da identidade do composto de interesse. Dos dez testes realizados, sete utilizaram ácido ferúlico e três utilizaram eugenol como substrato. Os testes envolvendo o eugenol não apresentaram resultados satisfatórios, embora condizentes com a literatura afirm. A atividade de enzimas ligninolíticas foi estudada. As enzimas lignina- peroxidase, manganês- peroxidase e álcool veratrílico-oxidase afetaram negativamente a síntese de vanilina.

## SUMMARY

In the present work, 37 fungal strains isolated from the Una do Prelado river, at the Ecological Station Jureia-Itatins, were studied for their ability to synthesize vanillin from ferulic acid and eugenol. Some tests were done varying the substrates and using shaken or unshaken cultures. After selection based on the growth profile in medium containing several compounds and on the chromatograms obtained from the growth cultures, the strains that presented high values of vanillin production were numbers 755 (55,2 mg/L - test 7) and 1051 (27,1 mg/L - test 2). Vanillin production was quantified using HPLC employing a ZORBAX ODS column, reverse phase, and detection at 279 nm. The absorption spectrum UV was used to confirm the identity of the compounds. In 10 tests, 7 utilized ferulic acid and 3 utilized eugenol as the substrate. The tests involving eugenol did not show good results, although agreeing with results reported in recent literature. The activities of the ligninolytic enzymes were studied. The enzymes Lignin-peroxidase, Manganese-peroxidase and Veratryl alcohol-oxidase affected negatively vanillin synthesis.

## 1. INTRODUÇÃO

O extrato de baunilha é um dos mais populares ingredientes mundialmente conhecidos e utilizados na fabricação de alimentos. É um componente importante em geléias, sobremesas, sorvetes, pães, iogurtes, doces, bolos, refrigerantes, bebidas alcoólicas, tabaco e fragrâncias. Os componentes do extrato de baunilha possuem características muito agradáveis ao paladar. O conjunto dos compostos presentes no extrato confere a este um amplo e rico "bouquet", tornando-o universalmente aceito e difundido.

A vanilina é o principal componente responsável pelo aroma de baunilha e aparece juntamente com inúmeros outros compostos. O produto comercial é um extrato etanólico diluído de frutas verdes fermentadas de um gênero de orquídeas, *Vanilla*, geralmente *Vanilla fragrans*, também conhecida como *Vanilla planifolia*.

Originária da América tropical e de outros países com o mesmo clima, algumas espécies de orquídeas foram cultivadas e processadas pelos Astecas, que utilizavam seu aroma e sabor em bebidas e chocolates. Devido ao processo de obtenção demorado e dispendioso, o extrato de baunilha puro ainda é considerado muito caro. A polinização é realizada manualmente, já que os botões destas orquídeas abrem-se somente uma vez ao ano e apenas por algumas horas, o que torna a sua polinização natural bastante difícil (FOUCHE & COUMANS, 1992). Acredita-se que estas plantas estariam extintas sem a intervenção humana.

Uma vez que a disponibilidade de extrato puro de baunilha não atende à demanda crescente entre os países industrializados, faz-se então necessária a sua obtenção a partir de outras fontes, sejam elas naturais ou artificiais, sendo as mais utilizadas a oxidação química de componentes da madeira obtidos durante a fase de polpação nas indústrias de papel e celulose (MATHIAS et al., 1995); a partir de produtos petroquímicos como o guaiacol (CLARK, 1990); ou por biocatálise, ou seja, a utilização de microrganismos vivos ou suas enzimas para se obter este produto a partir de compostos orgânicos como substratos (ROSAZZA, 1995).

O interesse de pesquisadores tem aumentado significativamente, sempre na tentativa de encontrar alternativas biotecnológicas para este fim. A exploração industrial de microrganismos para a produção de aromas é, na verdade, uma extensão da biotecnologia utilizada para processos tradicionais como a produção de metabólitos primários e secundários.

Tendo em vista estas considerações, os objetivos para o presente trabalho foram:

1. Encontrar fungos altamente produtores de vanilina a partir de ácido ferúlico e eugenol.
2. Estudar o efeito de outros compostos fenólicos derivados da lignina quanto a inibição ou não do crescimento fúngico.

3. Monitorar a atividade das enzimas do sistema ligninolítico destes fungos, e verificar a correlação entre a atividade enzimática e a produção de vanilina.

4. Manipulação dos meios de cultura, variação dos substratos e agitação na tentativa de otimizar as condições de cultivo visando um maior rendimento na síntese de vanilina.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Vanilina

#### 2.1.1. Considerações gerais

A vanilina é o principal componente responsável pelo aroma de baunilha existente na semente de orquídeas do gênero *Vanilla*, e aparece na concentração de  $\pm 2$  %. Outros componentes importantes do aroma são o ácido vanílico, o ácido 4-hidroxibenzóico, além de muitos outros compostos presentes em quantidades bastante inferiores (WESTCOTT et al., 1994).

Segundo BURRI et al. (1989), além das características que lhe conferem aroma e sabor, a vanilina tem sido utilizada visando uma tentativa de mascarar o aparecimento de "off-flavours" indesejáveis desenvolvidos durante a estocagem de produtos susceptíveis à degradação oxidativa natural. Apresenta ainda um poder antioxidante muito potente em alimentos que contenham ácidos graxos poli-insaturados, o que tem aumentado seu uso como ingrediente nas formulações industriais.

A vanilina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído), cuja estrutura se encontra representada na Figura 1, é um composto fenólico do tipo aldeído e aparece na forma de pequenos cristais brancos ou levemente amarelados. Apresenta ponto de fusão a 81 °C e ponto de ebulição a 285 °C. Os extratos de baunilha convencionais possuem um conteúdo mínimo de etanol na faixa de 35 %.

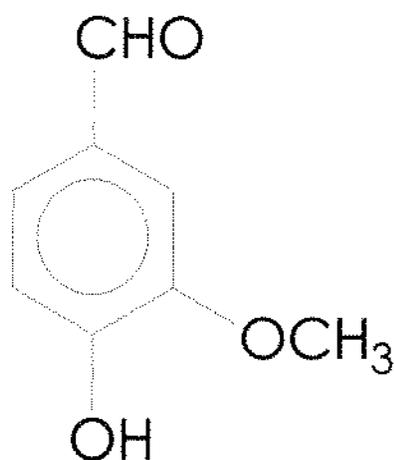


Figura 1. Estrutura química da vanilina.

As características do aroma de baunilha são bastante interessantes. Suas sementes recém colhidas são desprovidas de aroma e sabor, pois os eventuais componentes do aroma ocorrem na forma de glicosídeos, como a glicovanilina, e somente são potencializados durante o processo de cura, o qual estimula a hidrólise enzimática destes glicosídeos (RILEY & KLEYN, 1989).

### 2.1.2. Requisitos naturais

As plantas do gênero *Vanilla* crescem em climas tropicais, 20 graus ao norte e ao sul da linha do equador. As condições ideais para o crescimento dessas plantas são, entre outras, um clima anual médio de 24 a 30 °C, alta umidade e baixa incidência de ventos. O solo deve ser rico em matérias orgânicas, levemente inclinado e bastante escuro.

ADEDEJI et al. (1993) reportaram que a vanilina é um produto obtido da agricultura e, por esta razão, práticas de agricultura, país de origem, fatores climáticos, tipos de solos, grau de maturidade da semente no momento da colheita e métodos de fermentação ou cura terão um papel importante na qualidade dos constituintes do aroma final do produto.

A maioria dos países tropicais apresentam estes pré-requisitos, mas mesmo assim, nem todos conseguem desenvolver a produção de extrato de baunilha (WEBSTER, 1995). Entre os países que se destacam na produção de vanilina natural, os países africanos, asiáticos e outros com clima úmido e quente possuem no extrato de baunilha um de seus principais elementos para exportação, como representado na Figura 2.

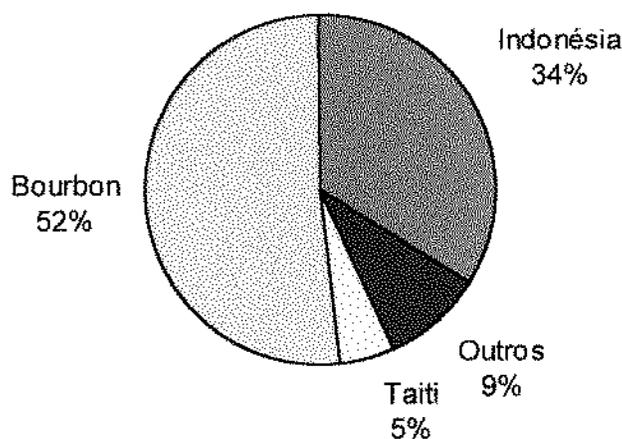


Figura 2. Produção mundial de extrato de baunilha (%).

A denominação "Bourbon" envolve as sementes de países como Madagascar, Comores, Reunion e Ilhas Seychelles.

### 2.1.3. Adulteração do extrato bruto

Por se tratar de um composto relativamente caro e de difícil obtenção, a indústria tem buscado alternativas para adulterar o extrato puro sem perda substancial da qualidade do aroma. Atualmente há uma busca de sofisticação nas técnicas de adulteração e, conseqüentemente, um maior desenvolvimento nos métodos de detecção desta adulteração.

Os extratos de baunilha podem ser adulterados com derivados da lignina, guaiacol ou eugenol e esta vanilina sintética exhibe características semelhantes à vanilina natural, porém, perde alguns de seus fatores aromáticos presentes somente na semente de *Vanilla* (RILEY & KLEYN, 1989).

O composto mais utilizado para a adulteração da vanilina é a etil-vanilina (EV), a qual possui um aroma duas ou três vezes mais intenso, e geralmente é utilizado em conjunto com a vanilina (LAMPRECHT et al., 1994).

## 2.2. Ácido Ferúlico

### 2.2.1. Considerações gerais

O ácido ferúlico foi descrito primeiramente em 1866 como um componente de *Ferula foetida* Reg. (*Umbelliferae*), e seu nome obviamente deriva do nome botânico da planta da qual é obtido (ROSAZZA et al., 1995).

Este ácido deriva do ataque oxidativo ao álcool coniferílico, um dos mais representativos monômeros da lignina (CRAWFORD & CRAWFORD, 1980; HIGUCHI, 1980).

O ácido ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxicinâmico - Figura 3), assim como outros ácidos fenólicos, ocorre geralmente na configuração *trans* e aparece covalentemente ligado à parede celular de várias famílias de vegetais, incluindo a economicamente importante família *Gramineae*. Estes componentes fenólicos são esterificados aos polissacarídeos da parede celular. Isto é evidenciado após tratamento alcalino, que promove a sua liberação. As mudanças espectrais que ocorrem são diagnóstico de quebra de ligação do tipo éster (SMITH & HARTLEY, 1983).

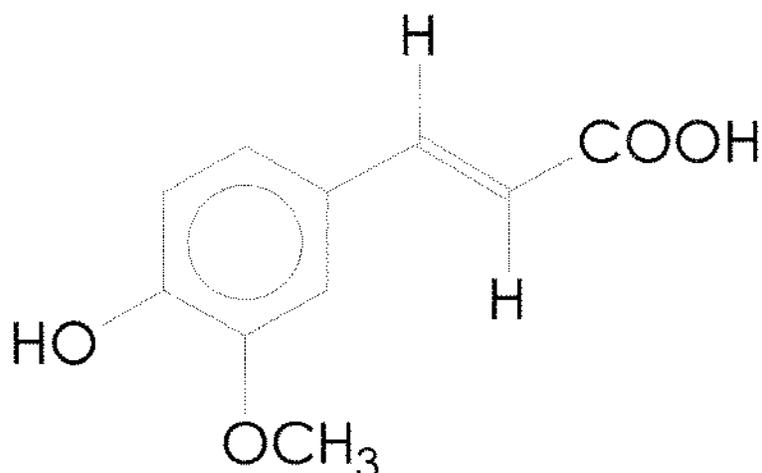


Figura 3. Estrutura química do ácido ferúlico.

### 2.2.2.- Ocorrência do ácido ferúlico

Ele raramente ocorre na forma livre. Além de aparecer esterificado a polissacarídeos, pode ser encontrado também como amida e outros ésteres, na forma monomérica ou dimérica (AKIN et al., 1992; FRIEND, 1981 e GRAFF, 1992). A ligação do ácido ferúlico à parede celular vegetal tem sido estudada determinando-se a estrutura dos compostos solúveis em água liberados pelo tratamento de bagaço de cana, casca de trigo e casca de milho com alguns tipos de celulases (MUELLER-HARVEY et al., 1986). Todos estes produtos contêm ácido ferúlico esterificado à arabinose, que por sua vez é ligada à xilana, indicando que são derivados de arabinoxilanas ferúlicas.

Pode também aparecer na forma dimérica, como ácido diferúlico, em ligação com a hemicelulose (MARKWALDER & NEUKOM, 1976; HARTLEY & JONES, 1976).

FRY (1983) desenvolveu um trabalho relativo ao ácido ferúlico, sua estrutura e possíveis funções. Utilizando-se de folhas de espinafre, encontrou ácido ferúlico esterificado a resíduos de galactopirranose e arabinopirranose dos polissacarídeos.

ROMBOUTS & THIBAUT (1986) reportaram a presença de ácido ferúlico e outros fenóis esterificados a substâncias pécticas encontradas na polpa de beterraba utilizada para a produção de açúcar. Os principais açúcares encontrados nesta polpa foram a

arabinose e galactose. Ramnose, fucose, xilose, manose e glicose também estavam presentes, porém em menores quantidades.

O ácido trans-ferúlico é o isômero dominante e constitui acima de 90% dos ácidos fenólicos totais da farinha de trigo (SOSULSKI et al., 1982). Na última década alguns tipos de arabinoxilanas ferúlicas foram isoladas de várias plantas (KATO & NEVINS, 1985 ; AHLUWALIA & FRY, 1986).

O ácido ferúlico livre ou esterificado também pode se polimerizar com a lignina, formando ligações alcali-resistentes (SCALBERT et al., 1985).

Este pode ainda aparecer como um vilão na indústria de suco de laranja, onde atua como precursor de "off-flavors" (NAIM et al., 1988; PELEG et al., 1992), ou também produzir um efeito desejado no amadurecimento dos vinhos em tonéis de madeira, pois confere um aroma agradável ao produto (CHATONNET et al., 1992).

### **2.2.3. Degradação do ácido ferúlico**

Por ser um composto extremamente abundante na natureza, este ácido fenólico desperta em muitos pesquisadores o sentido de curiosidade, de descoberta da potencialidade de se manipular as vias do seu metabolismo.

Várias etapas importantes da via metabólica de degradação já são devidamente conhecidas e apresentam interesse comercial; outras, por sua vez, necessitam de estudos mais aprofundados.

As transformações microbianas ou enzimáticas do ácido ferúlico e outros derivados cinâmicos tem sido examinadas sob diversas perspectivas. Seus metabólitos apresentam um papel muito importante na germinação e crescimento das plantas (TURNER & RICE, 1975). Os derivados do tipo estirenos conferem resistência a pragas na lavoura (HASHIKADO et al., 1993).

Muitos são os compostos de interesse industrial que podem ser obtidos do metabolismo do ácido ferúlico, como: vanilina, estirenos oxigenados, epóxidos, guaiacol, catecol, alquil-benzenos e polímeros de estirenos (HUANG et al., 1993; ROSAZZA, 1995).

LEHTONEN (1983) e CHATONNET et al. (1992), atribuíram aos hidroxiestirenos e metabólitos microbianos do ácido ferúlico a capacidade de conferir aroma a sucos de frutas, vinhos, cerveja, etc. O ácido ferúlico também é utilizado como um modelo de substrato de lignina para o estudo da degradação de compostos aromáticos presentes em resíduos da indústria química, farmacêutica, petroquímica e de alimentos, através de enzimas ligninolíticas.

#### **2.2.3.1. Microrganismos capazes de degradar o ácido ferúlico**

A conversão de ácido ferúlico a vanilina é atualmente de grande interesse e ressalta a viabilidade de se obter produtos caros e de

grande importância para a indústria.

Inúmeros são os microrganismos capazes de degradar os compostos semelhantes a lignina, embora os fungos filamentosos apresentem mais facilidade (ANDER et al., 1980 ; BETTS & DART, 1988).

Várias rotas de degradação tem sido propostas, todas levando ao ácido vanílico como um intermediário importante, e pequena quantidade de compostos reduzidos, como a vanilina. Sabe-se que os fungos de degradação branca são ricos em fenol-oxidases, as quais catalisam a polimerização dos precursores aromáticos (BUSWELL et al., 1982). Em trabalho de GUPTA et al. (1981), imediatamente após a adição do ácido ferúlico às culturas de *Pycnoporus cinnabarinus*, uma coloração marrom tornou-se aparente, o que demonstrou a ocorrência de polimerização do composto fenólico induzida pela lacase presente.

Para se atingir uma quantidade razoável do produto em questão, as vias metabólicas devem acarretar a quebra da cadeia lateral. Vários são os microrganismos descritos na literatura, capazes de realizar esta conversão. ISHIKAWA et al. (1963) demonstraram que os fungos de degradação branca *Polyporus versicolor* e *Fomes fomentarius* tinham a capacidade de bioconverter o ácido ferúlico à vanilina, e esta então ser reduzida a álcool vanílico ou oxidada a ácido vanílico. CARTWRIGHT & SMITH (1967) e TOMS & WOOD (1970) obtiveram resultados semelhantes com bactérias do gênero *Pseudomonas*.

A rota de degradação proposta por GURUJEYALAKSHMI & MAHADEVAN (1987) demonstra uma perda da cadeia lateral do ácido ferúlico através da ação de uma deacetilase, produzindo a vanilina, que seria então metabolizada a ácido vanílico e ácido protocatecólico.

NAZARETH & MARVINKURVE (1986), utilizando uma linhagem de *Fusarium solani* que mostrava um ótimo crescimento em outros substratos fenólicos, sugeriram uma rota diferente, onde o ácido ferúlico passaria por um metabólito intermediário, o 4-vinilguaiacol, um composto não identificado anteriormente nas vias de degradação dos fungos, e este, por sua vez, seria metabolizado a vanilina e ácido vanílico, entre outros compostos de menor interesse.

EDLIN et al. (1995) demonstraram a mesma via de metabolismo descrita anteriormente onde a degradação do ácido ferúlico pela levedura *Bretanomyces anomalus* passa pela descarboxilação e subsequente redução a derivados 4-vinil e 4-etil, sendo que os resultados obtidos foram os mesmos para frascos agitados e em repouso.

TILLET & WALKER (1990) propuseram uma nova rota desenvolvida por uma linhagem de *Penicillium* sp, provavelmente *Penicillium rubrum* e que envolvia a demetilação preliminar do ácido ferúlico a ácido cafeico, seguido de encurtamento da cadeia lateral produzindo ácido protocatecólico, o qual sofreu subsequente uma quebra na posição *orto* do anel benzênico. Esta rota alternativa provocou uma queda nos níveis de produção de vanilina.

Poucos actinomicetos são capazes de metabolizar compostos fenólicos derivados da lignina. Uma linhagem de *Streptomyces setonii* termotolerante e degradadora de fenol e lignina apresentou produção de vanilina a partir do ácido ferúlico, por rompimento na cadeia lateral do ácido. Houve também uma produção de acetato, na medida em que o ácido ferúlico era consumido (SUTHERLAND et al., 1983). A presença de catecol 1,2-dioxigenase e ácido protocatecólico 3,4-dioxigenase não permitiram que houvesse acúmulo de vanilina no meio de cultura.

GUPTA et al. (1981) reportaram a degradação do ácido *trans*-ferúlico por uma linhagem mutante de um fungo de degradação branca, o *Sporotrichum pulverulentum*, com baixa atividade de fenol-oxidase, porém a produção de vanilina foi da ordem de traços, uma vez que altos níveis de produtos reduzidos foram obtidos, incluindo aldeído coniferílico, ácido dihidroferúlico e álcool dihidroconiferílico.

O metabolismo do ácido ferúlico foi estudado em culturas do fungo de degradação branca *Pycnoporus cinnabarinus* linhagem I-937 por FALCONNIER et al., (1994). Após 6 dias de crescimento, durante o metabolismo secundário do fungo, a concentração de vanilina atingiu um máximo de 64 mg/L, correspondendo a um produto molar de 27,5 %. O processo de biotransformação não foi facilmente controlado uma vez que este fungo liberava lacase para o meio de cultura. Quando produzida, a enzima ligninolítica lacase conteve a formação de vanilina promovendo a polimerização do ácido ferúlico em polímeros semelhantes à lignina. Uma outra rota metabólica foi

evidenciada neste fungo, gerando álcool e derivados diméricos, como resultado de várias reduções químicas.

Em trabalho pioneiro utilizando compostos derivados de lignina, TOMS & WOOD (1970) demonstraram a degradação de ácido ferúlico em ácido vanílico e vanilina, utilizando suspensões de células lavadas de *Pseudomonas acidovorans*, na presença de nicotinamida-adenina dinucleotídeo. O ácido ferúlico foi marcado com [2-<sup>14</sup>C] e a degradação foi assim evidenciada.

ÖTÜK (1985) utilizou uma linhagem de *Escherichia coli* isolada de matéria orgânica em decomposição. Após crescimento em ácido ferúlico como única fonte de carbono, os produtos de degradação foram identificados por espectroscopia na região de infravermelho e ultravioleta e por cromatografia em camada delgada (CCD). O autor sugeriu que o ácido ferúlico é degradado via vanilina, ácido vanílico e ácido protocatecólico, uma vez que estes metabólitos se acumularam no meio de cultura. Quase toda a vanilina foi oxidada a ácido vanílico.

Um processo de bioconversão em duas etapas para a produção de vanilina a partir de ácido ferúlico foi desenvolvido por LESAGE-MEESSEN et al. (1996) combinando os microrganismos *Aspergillus niger* e *Pycnoporus cinnabarinus*. No primeiro passo, a linhagem de *Aspergillus niger* transformou o ácido ferúlico em ácido vanílico, e este então foi reduzido à vanilina pela linhagem de *Pycnoporus cinnabarinus*. A primeira etapa ocorre por uma via de degradação da cadeia propenóica, e a segunda etapa consiste de uma redução química simples. Pouco se sabe sobre essa conversão do ácido

vanílico à vanilina. Os passos de redução no metabolismo fúngico de compostos aromáticos poderiam ser parte de um sistema de detoxificação para manter o nível de compostos inibitórios abaixo de uma concentração limiar prejudicial.

RAHOUTI et al. (1989) reportaram o aparecimento de vanilina (15,2 mg/L) em culturas de *Paecilomyces variotii* com 24 horas de incubação, e em culturas de *Pestalotia palmarum* também com 24 horas de incubação (2,0 mg/L).

Observando-se a literatura, várias rotas alternativas para o encurtamento da cadeia lateral tem sido propostas, todas levando à produção do ácido vanílico:

a) Oxidativa: TOMS & WOOD (1970) propuseram uma rota oxidativa onde uma sub-unidade de 2 carbonos era clivada do ácido ferúlico para produzir vanilina, a qual era quase que automaticamente oxidada a ácido vanílico;

b) Redutiva: ENOKI et al., (1981) encontraram mais intermediários reduzidos que oxidados nos estudos do metabolismo de ácido ferúlico por *Sporotrichum pulverulentum*. Similarmente NISHIDA & FUKUZUMI (1978) reportaram que um fungo basidiomiceto (*Trametes* sp.) reduzia o ácido ferúlico a álcool coniferílico, o qual era subsequente convertido a vanilina.

c) Não-oxidativa: Esta rota passa obrigatoriamente pela formação de intermediários 4-vinil e 4-etil (NAZARETH & MARVINKURVE, 1986).

De acordo com os trabalhos revisados anteriormente, a rota de degradação do ácido ferúlico mais comum em fungos imperfeitos passaria por compostos como vanilina, ácido vanílico, ácido protocatecólico e derivados do ciclo do  $\beta$ -cetoadipato, como pode ser visto na Figura 4.

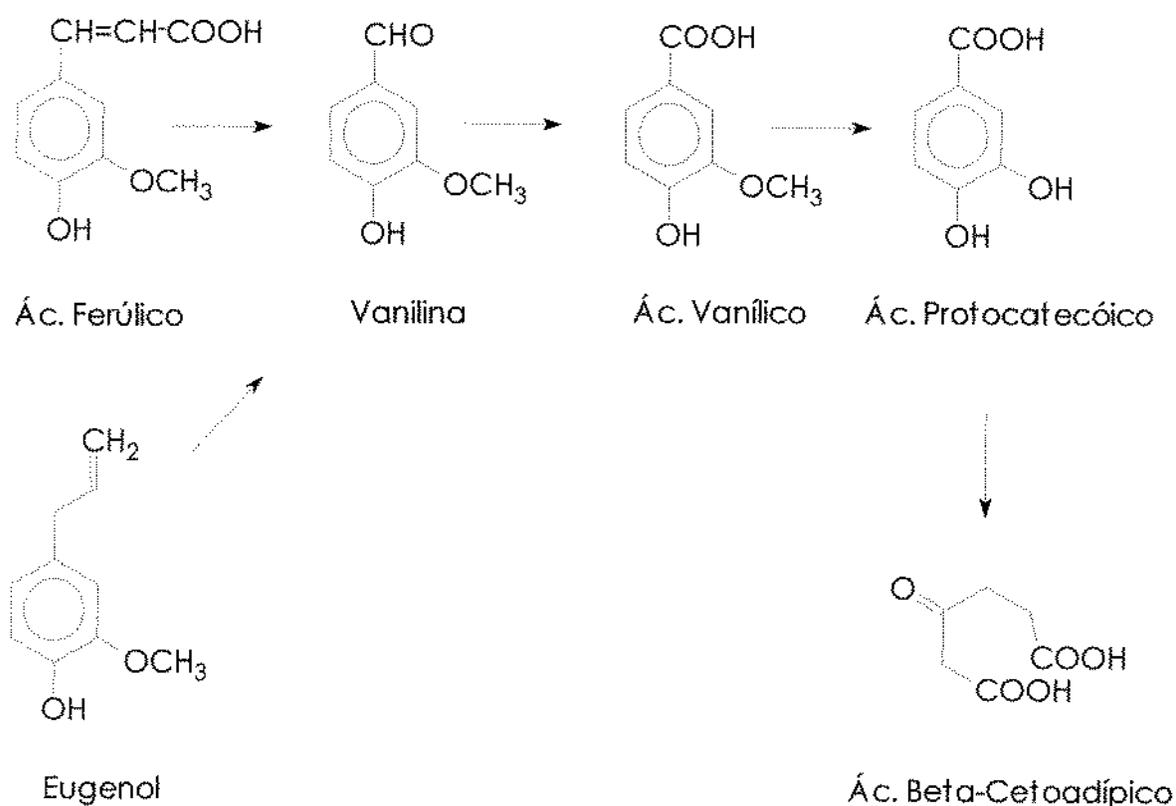


Figura 4. Principal via de degradação do ácido ferúlico e eugenol por microrganismos.

## 2.3. Eugenol

### 2.3.1. Considerações gerais

O eugenol, representado na Figura 5, é o principal constituinte do óleo de cravo-da-Índia. Existem vários relatos evidenciando a presença de vanilina e ácido ferúlico como intermediários metabólicos

da degradação do eugenol por microrganismos (TADASA, 1977; TADASA & KAYANARA, 1983).

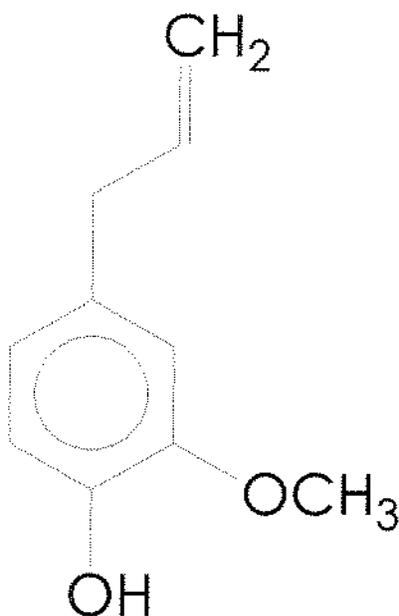


Figura 5. Estrutura química do eugenol.

### 2.3.2. Degradação do eugenol

Uma linhagem de *Corynebacterium* foi isolada de eugenol e baixos níveis de vanilina foram encontrados (8,0 mg/L) (TADASA, 1977).

Uma linhagem de *Serratia marcescens* foi utilizada para oxidar o isoeugenol a vanilina, atingindo um máximo de 3,8 g/L e um produto teórico de 5%. O microrganismo foi primeiramente crescido em glicerol e então transferido para um meio mínimo contendo isoeugenol. Porém a taxa de degradação foi muito baixa (0,018 g/L por hora). O eugenol também foi metabolizado por esta bactéria, mas

altos níveis de extrato de levedura e de carne foram utilizados, e a síntese de vanilina foi bem menor (HOOP, 1993).

O eugenol é um composto comumente utilizado como antimicrobiano, com amplo espectro de ação contra *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Mycoderma* sp, *Lactobacillus acidophilus* e *Bacillus cereus*, entre muitas outras espécies de fungos, bactérias e leveduras, e isto explica o fato de poucos microrganismos serem capazes de degradá-lo (MEENA & SETHI, 1994).

#### **2.4. Métodos cromatográficos para determinação da vanilina**

Estudando-se o metabolismo do eugenol e ácido ferúlico na obtenção de vanilina foram encontrados muitos relatos na literatura que descrevem a determinação da vanilina por métodos de cromatografia à líquido (CLAE), empregando colunas de fase reversa e eluição isocrática ou por gradiente.

HUANG et al. (1993) relataram em seu trabalho sobre as transformações microbianas do ácido ferúlico a detecção da vanilina e de outros metabólitos utilizando coluna Versapack C18 (30 cm x 4,6 mm) e fase móvel constituída por metanol / água / ácido acético (30:70:1, v/v/v) e uma vazão de 1,2 mL/min.

A Tabela 1 evidencia alguns trabalhos que, ao longo dos anos apresentaram metodologias diversas para a determinação de vanilina e outros compostos originários da degradação da lignina.

Tabela 1. Determinação de vanilina por CLAE.

| Produto                             | Coluna             | Fase móvel  | Detector             | Referência                              |
|-------------------------------------|--------------------|---|----------------------|---|
| bebidas<br>alcoólicas<br>destiladas | FR C <sub>18</sub> | Água/ácido<br>acético/metanol/<br>1-propanol<br>(gradiente) | UV (280 nm)          | LEHTONEN,<br>(1983)                     |
| sorgo                               | FR C <sub>18</sub> | Água/ácido<br>acético/butanol/<br>metanol<br>(gradiente)    | UV (254 nm)          | HAHN et al.,<br>(1983)                  |
| bebida alcóolica                    | FR C <sub>18</sub> | Dioxana/ácido<br>acético<br>(15:85)                         | UV (280 nm)          | REGNAULT-<br>ROGER<br>et al.,<br>(1987) |
| extrato de<br>baunilha              | FR C <sub>8</sub>  | Metanol/água<br>acidificada<br>(10:90)                      | UV (254 nm)          | KAHAN et al.,<br>(1989)                 |
| metabolismo de<br>ácido ferúlico    | FR C <sub>18</sub> | Metanol/água/<br>ácido acético<br>(30:70:1)                 | UV (279 nm)          | RAHOUTI et al.,<br>(1989)               |
| azeite de oliva                     | FR C <sub>18</sub> | Água/metanol/<br>ácido acético<br>(95:15:5)                 | UV (254 nm)          | NERGIZ &<br>ÜNAL<br>(1991)              |
| produtos de<br>"maple"              | FR C <sub>18</sub> | Metanol/água/<br>ácido<br>trifluoroacético<br>(gradiente)   | UV (280 e 320<br>nm) | KERMASHA<br>et al.,<br>(1995)           |

FR = fase reversa, UV = ultravioleta

## **2.5. Enzimas do sistema ligninolítico**

Embora o objetivo principal do trabalho não tenha sido o estudo da degradação de lignina, resolveu-se tentar encontrar uma relação entre a síntese de vanilina por fungos e a produção de enzimas ligninolíticas, uma vez que os fungos foram isolados das margens do rio Una do Prelado, conhecido por suas altas quantidades de ácidos húmicos decorrentes da matéria orgânica em decomposição o que demonstra se tratar de um ecossistema em constante mutação.

Sabe-se que os fungos especializados na degradação de lignina são principalmente os pertencentes à classe dos basidiomicetos (CAI et al., 1993; BUSWELL & ERIKSSON, 1994).

### **2.5.1. Lignina-peroxidase (LiP)**

Esta enzima foi primeiramente conhecida como ligninase e, mais recentemente, recebeu o nome atual. O mecanismo de ação da LiP envolve a abstração de um elétron de compostos fenólicos e não fenólicos existentes na molécula de lignina, formando radicais catiônicos, os quais são decompostos quimicamente.

A medida da atividade de LiP está baseada na oxidação do álcool veratrílico, reação esta que absorve intensamente a 310 nm. A LiP tem sido caracterizada por catalisar a oxidação inicial de muitos xenobióticos, assim como modelos de lignina não-fenólicos (VAZQUEZ-DUHALT et al., 1994).

### **2.5.2. Manganês-peroxidase (MnP)**

A manganês peroxidase é um outro tipo de peroxidase que necessita de manganês para sua atividade. Presumivelmente, Mn(II) difunde-se na matriz polimérica de lignina e oxida grupos fenólicos livres (MILLIS et al., 1989). A enzima MnP pode ser quantificada através da oxidação do vermelho de fenol (GOLD et al., 1992) na presença de Mn (II).

### **2.5.3. Fenol-oxidases**

Este nome genérico designa três tipos de enzimas: peroxidases, lacases e tirosinases (ANDER et al., 1980). As peroxidases são enzimas que contém grupos heme e requerem peróxido de hidrogênio. Lacases e tirosinases contém cobre, não requerem peróxido e variam entre si pela especificidade do substrato. As tirosinases em geral são intracelulares, o que as torna de pouca importância na degradação da lignina.

A lacase é uma enzima que catalisa a abstração de um elétron de grupos hidroxil-fenólicos de lignina, formando radicais fenóxi. Assim como a MnP, a lacase pode catalisar o fenil-alquil e clivar a ligação C $\alpha$ -C $\beta$  de dímeros de lignina, além de catalisar a demetoxilação de diversos radicais fenólicos.

### **2.5.4. Oxidases**

As oxidases são enzimas que utilizam o oxigênio como

acceptor final de hidrogênio. Estas enzimas são responsáveis pela produção de  $H_2O_2$  extracelular para a ação das peroxidases. É possível que oxidases estejam envolvidas diretamente na biodegradação de lignina como sugerido após a descoberta da enzima álcool veratrílico-oxidase (AVO).

A enzima álcool veratrílico-oxidase apresenta duas funções conhecidas na degradação da lignina. Ela parece estar envolvida na produção de peróxido de hidrogênio a ser utilizado pelas peroxidases (GUILLÉN et al., 1992). Pode desempenhar também a prevenção da polimerização dos compostos fenólicos, reduzindo assim o peso molecular dos lignosulfonatos solúveis gerados durante a degradação da lignina (MARZULLO et al., 1995).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Solventes, reagentes e materiais diversos**

- Padrões: vanilina, ácido vanílico, ácido ferúlico, marca Aldrich;
- Filtros para fase móvel orgânica HVLP 04700, 0,45 $\mu$ m de poro e 47 mm de diâmetro, marca Millipore;
- Reagentes de uso comum em laboratório, grau para análise;
- Reagentes grau cromatográfico, Lichrosolv, marca Merck.
- Substratos: ácido ferúlico e eugenol, marca Aldrich.

#### **3.2. Equipamentos**

- Agitador rotatório, marca New Brunswick Scientific.
- Banho-maria, modelos SB-9 / SB-11, marca Eyela.
- Banho ultra-som, marca Heat Systems.
- Câmara de fluxo laminar, marca Veco.
- Centrífuga, modelo Himac CR 21, marca Hitachi.
- Cromatógrafo a líquido, marca Shimadzu, constituído de: degaseificador de solventes modelo DGU-4A, bomba de alta pressão modelo LC-6A, detector UV de comprimento de onda variável entre 195 e 350 nm, cela de 8  $\mu$ L de volume modelo SPD-6A, integrador modelo CR4-A, injetor Rheodyne e coluna cromatográfica com fase estacionária de octadecilsilano, ZORBAX ODS, 5  $\mu$ m, 15 cm x 4,6 mm.
- Espectrofotômetro ultravioleta/visível, modelo UV - 1201, marca Shimadzu.

- Micropipetadores com volumes reguláveis 10 - 100  $\mu\text{L}$ , 10 - 200  $\mu\text{L}$  e 100 - 1000  $\mu\text{L}$ , marca Gilson.
- Ultrapurificador de água para uso em CLAE, marca Milli-Q plus.

### 3.3. Microrganismos

Os fungos selecionados para o presente trabalho foram isolados da Estação Ecológica Juréia-Itatins, próxima ao litoral do Estado de São Paulo. Foram coletadas amostras de várias regiões da reserva, como: mangue, estuário, rios, encostas, vegetação, etc.

Inicialmente foram testadas 37 espécies de fungos quanto a sua capacidade de sintetizar vanilina a partir do ácido ferúlico. Estes fungos foram testados também quanto ao crescimento em meios contendo outros compostos fenólicos derivados da lignina, tais como ácido *p*-anisico, ácido *t*-cinâmico, ácido cafeico, ácido lignosulfônico, vanilina, aldeído veratrílico e éter guaiacol-glicérico. Estes compostos foram utilizados para destacar os fungos que possuem maior facilidade em degradar compostos quimicamente semelhantes e de vários níveis de complexidade.

Os fungos selecionados foram mantidos em câmara fria a 16°C, em tubos inclinados contendo ágar batata-dextrose. Posteriormente foram testados também quanto ao crescimento em meio de cultura contendo eugenol.

Sabe-se que estes fungos pertencem à classe dos Deuteromicetos, ou seja, são fungos imperfeitos que se reproduzem

de maneira assexuada, geralmente através de conídeas. Recebem o nome “imperfeitos” pois há uma perda na “perfeição” do estágio sexual (DUBE, 1983).

### 3.4. Seleção dos fungos

#### 3.4.1. Síntese de vanilina

O crescimento dos fungos foi realizado em tubos contendo 20 mL de um meio de cultura apropriado composto por sais minerais (Tabela 2) e ácido ferúlico como única fonte de carbono. Após 6 dias de crescimento, os meios foram centrifugados a 17.000 rpm, durante 15 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram recolhidos e filtrados em lã de vidro. Estes foram estocados a -10°C para posterior determinação da produção de vanilina por cromatografia a líquido.

Tabela 2. Composição do meio de cultura basal.

| Composto                                  | Concentração |
|---|--------------|
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$              | 1,4 g/L      |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                  | 2,0 g/L      |
| Uréia                                     | 0,15 g/L     |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,30 g/L     |
| $\text{CaCl}_2$                           | 0,30 g/L     |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 5,0 mg/L     |
| $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  | 1,56 mg/L    |
| $\text{CoCl}_2$                           | 2,0 mg/L     |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 1,4 mg/L     |

### **3.4.2. Determinação de vanilina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

A determinação da vanilina foi realizada por CLAE, em um cromatógrafo da marca Shimadzu, utilizando-se uma coluna com fase reversa, ZORBAX ODS, 5  $\mu\text{m}$ , com dimensões de 15 cm x 4,6 mm. O volume de amostra injetado foi de 20  $\mu\text{L}$ . Foi utilizado um sistema isocrático de solventes como fase móvel, constituído por metanol/água na proporção 30:70(v/v) a uma vazão de 0,8 mL/min. A detecção foi realizada em detector ultravioleta, utilizando-se 279 nm.

#### **3.4.2.1. Padrões**

##### **3.4.2.1.1. Preparo das soluções estoque**

As soluções estoque foram preparadas pesando-se os padrões em balança analítica e dissolvendo-os em metanol, grau cromatográfico. As concentrações das soluções foram determinadas pela razão entre o peso do composto e o volume de solvente utilizado. As concentrações das soluções estoque foram: vanilina, ácido ferúlico e ácido vanílico 10,0 mg / 50 ml.

##### **3.4.2.1.2. Preparo das soluções de trabalho**

As soluções de trabalho foram preparadas a partir das soluções estoque, fazendo-se as diluições necessárias com metanol grau cromatográfico. As concentrações das soluções trabalho foram: vanilina 2,0 mg/L, ácido ferúlico 4,0 mg/L e ácido vanílico 2,0 mg/L.

Todas as soluções de trabalho foram armazenadas sob temperatura de  $-15^{\circ}\text{C}$ , em frascos âmbar fechados. A qualidade dos padrões foi verificada diariamente e foram preparadas novas soluções padrões de estoque e trabalho quando houve o aparecimento de picos estranhos aos anteriores, indicando oxidação.

#### **3.4.2.2. Preparo da curva padrão de vanilina**

Para a quantificação de vanilina presente nos sobrenadantes das culturas foi desenvolvida uma curva padrão de vanilina, utilizando-se um padrão 10,0 mg/L (em metanol, grau cromatográfico) diluído para se obter as concentrações de 1,0 mg/L, 2,0 mg/L, 4,0 mg/L, 6,0 mg/L, 8,0 mg/L e 10,0 mg/L. Quando a concentração de vanilina encontrada era superior a 10,0 mg/L, uma nova determinação era realizada utilizando-se a amostra diluída.

#### **3.4.3. Perfil de crescimento dos fungos em meios de cultura líquidos contendo compostos fenólicos**

O crescimento dos fungos foi realizado em tubos de ensaio contendo 20 mL de meio basal de sais minerais acrescido de 0,2 % do composto a ser testado. Alguns destes compostos não são facilmente dissolvidos em água, e por esse motivo foram previamente dissolvidos em NaOH, para a sua completa dissolução. Posteriormente foram adicionados ao meio líquido. O pH foi ajustado a 5,5.

Para a devida seleção dos fungos, alguns parâmetros foram observados atentamente, principalmente o crescimento abundante

nos tubos contendo ácido ferúlico e a inibição do crescimento nos tubos contendo vanilina, pois não havia o interesse em se selecionar um fungo que degradasse o ácido ferúlico além da vanilina, o que acarretaria uma baixa produção do composto de interesse.

Deve-se ainda observar que a vanilina é descrita na literatura como um composto altamente inibidor do crescimento de fungos, bactérias e leveduras, quando presente em concentrações acima de 0,5% (PERESTELO et al., 1989).

### **3.5. Experimentos**

Após a primeira seleção dos fungos, alguns testes foram realizados na tentativa de otimizar as condições para a máxima produção de vanilina. Estes testes foram baseados na literatura ou realizados aleatoriamente, variando-se condições de oxigenação, presença de co-substratos, presença de cisteína e modificações no tempo de adição do substrato.

#### **3.5.1. Inóculo**

O inóculo foi preparado semeando-se os fungos em placas contendo meio GYP (glicose / extrato de levedura / peptona). A concentração do agar base foi igual a 1,0 %. Isto colaborou para que o inóculo se desprendesse facilmente do meio, evitando assim que compostos presentes no meio GYP fossem transferidos para os Erlenmeyers dos experimentos posteriores, que deviam conter somente ácido ferúlico como fonte de carbono.

Cada inóculo foi preparado marcando-se uma área de 1,0 cm x 1,0 cm na parte de trás da placa de Petri. Esta padronização do inóculo foi essencial para que os resultados obtidos pudessem ser estudados e comparados entre si. A retirada do inóculo foi realizada lentamente e com o máximo cuidado, evitando-se assim a perda de micélio e esporos.

### 3.5.2. Condições de cultivo

Foram desenvolvidos 10 experimentos variando-se o tempo de adição do substrato e a utilização ou não de agitação. O meio de cultura básico de sais minerais foi o mesmo utilizado para a seleção por CLAE, sendo que o ácido ferúlico foi utilizado como substrato nos testes de número 1 a 7 e o eugenol nos testes de número 8 a 10 (Tabela 3).

Os fungos foram crescidos em Erlenmeyers contendo volume final de 50 ml. Em alguns experimentos, o ácido ferúlico foi adicionado ao meio basal e autoclavado a seguir, e em outros foi introduzido assepticamente ao mesmo meio basal contendo 2% de glicose e 0,1% de extrato de levedura como substrato após 3 dias de crescimento, para favorecer o metabolismo secundário dos microrganismos. A temperatura utilizada foi de 30°C.

Nos testes de 6 a 10, o agente redutor cisteína foi utilizado.

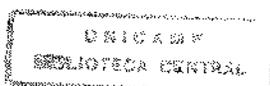


Tabela 3. Experimentos realizados visando a síntese de vanilina.

| Teste e Substrato | Diluição do Substrato | Agitação 200 rpm | Adição do Inóculo | Co-Substratos           | Cisteína |
|-------------------|-----------------------|------------------|-------------------|-------------------------|----------|
| 1-Ác. Ferúlico    | NaOH                  | Não              | Primeiro dia      | -                       | Não      |
| 2-Ác. Ferúlico    | NaOH                  | Não              | Após 72 horas     | Glicose 2%<br>E.L. 0,1% | Não      |
| 3-Ác. Ferúlico    | Etanol                | Sim              | Após 72 horas     | Glicose 2%<br>E.L. 0,1% | Não      |
| 4-Ác. Ferúlico    | Etanol                | Não              | Após 72 horas     | Glicose 2%<br>E.L. 0,1% | Não      |
| 5-Ác. Ferúlico    | NaOH                  | Sim              | Após 72 horas     | Glicose 2%<br>E.L. 0,1% | Não      |
| 6-Ác. Ferúlico    | Etanol                | Sim              | Após 72 horas     | Glicose 2%<br>E.L. 0,1% | Sim      |
| 7-Ác. Ferúlico    | NaOH                  | Não              | Após 72 horas     | Glicose 2%<br>E.L. 0,1% | Sim      |
| 8-Eugenol         | -                     | Sim              | Primeiro dia      | -                       | Sim      |
| 9-Eugenol         | -                     | Sim              | Após 72 horas     | Glicose 2%<br>E.L. 0,1% | Sim      |
| 10-Eugenol        | -                     | Não              | Após 72 horas     | Glicose 2%<br>E.L. 0,1% | Sim      |

E.L. = Extrato de levedura.

As alíquotas de sobrenadante foram retiradas em cada um dos 6 dias subseqüentes à introdução do ácido ferúlico ao meio e submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência e à verificação das atividades das enzimas ligninolíticas (para os testes 4 a 10).

### **3.5.3. Obtenção dos filtrados**

Todos os Erlenmeyers foram filtrados para a coleta do sobrenadante que foi então submetido à CLAE, determinação da massa seca e a uma série de quantificações enzimáticas na tentativa de relacionar a síntese de vanilina com a atividade de determinadas enzimas do sistema ligninolítico. A filtração foi realizada em funis comuns, com pequena quantidade de algodão de vidro que é quimicamente inerte e impossibilita a ligação inespecífica com enzimas presentes nos meios líquidos.

### **3.6. Determinações enzimáticas**

As culturas dos testes 4 a 10 foram selecionadas para a determinação das enzimas lignina-peroxidase, manganês-peroxidase, lacase, peroxidase e álcool veratrílico-oxidase.

O cálculo para a quantificação da atividade destas enzimas foi realizado de acordo com a equação apresentada na Figura 6.

$$\frac{A}{R \times t} \times 10^6 = UI / L$$

Onde A = Absorbância (nm).

E =  $\epsilon$  (do produto formado).

R = Quantidade de caldo enzimático (mL).

t = tempo de reação (min).

Figura 6. Equação para cálculo da atividade das enzimas ligninolíticas.

### 3.6.1. Atividade de Lignina-peroxidase (LiP)

Esta atividade (TIEN E KIRK, 1984) foi determinada pela oxidação do álcool veratrílico ( $\epsilon_{310} = 9.300 \text{ L/M} \times \text{cm}$ ). A mistura de reação foi composta de 0,6 mL de sobrenadante; 0,2 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  2,0 mM e 0,2 mL de uma solução de álcool veratrílico 2,0 mM em tampão tartarato de sódio 0,4 M, pH 3,0. A reação foi iniciada pela adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e o aparecimento do aldeído veratrílico foi determinado lendo-se a absorbância a 310 nm. Esta atividade foi expressa em UI/L por minuto.

### 3.6.2. Atividade de Álcool Veratrílico-oxidase (AVO)

A atividade de AVO foi determinada da mesma forma que para LiP, excetuando-se o  $\text{H}_2\text{O}_2$  da mistura reacional.

### 3.6.3. Atividade de Manganês-peroxidase (MnP)

Esta atividade foi quantificada através da oxidação do vermelho de fenol ( $\epsilon_{610} = 4.460 \text{ L/M} \times \text{cm}$ ), na presença de manganês e peróxido de hidrogênio (KUWAHARA et al., 1984). A mistura de reação foi composta de 0,5 mL do sobrenadante; 0,1 mL de lactato de sódio 0,25 M; 0,05 mL de  $\text{MnSO}_4$  2,0 mM; 0,2 mL de albumina bovina 0,5 %; 0,1 mL de vermelho de fenol 0,1 %; 0,05 mL de peróxido de hidrogênio 2,0 mM em tampão succinato de sódio 0,2 M, pH 4,5. Essa mistura foi incubada por 5 minutos a 30 °C, e a reação foi interrompida adicionando-se 0,04 mL de NaOH 2,0 N.

Após a adição de NaOH foi lida a absorbância a 610 nm. A preparação do branco foi realizada da mesma forma, sendo o sobrenadante substituído pelo mesmo sobrenadante tratado a 100°C durante 15 minutos. A atividade foi expressa por UI/L por minuto.

### 3.6.4. Atividade de Lacase

Esta atividade foi determinada na ausência de  $\text{H}_2\text{O}_2$  exógeno no meio de reação - tipo lacase (SZKLARZ et al., 1989 - *modificado*). Para descartar uma possível interferência de peroxidase nesta determinação, o caldo foi previamente tratado com catalase (1,0 U/ml) para degradar qualquer  $\text{H}_2\text{O}_2$  presente nos caldos extracelulares.

A mistura de reação foi constituída por 0,6 mL de sobrenadante; 0,2 mL de tampão citrato-fosfato 0,05 M, pH 5,0; 0,1 mL de siringaldazine 1,0 mM em etanol e 0,1 mL de água destilada.

Para o branco, foi utilizado o mesmo caldo aquecido a 100 °C / 15 min. A oxidação da siringaldazine até sua forma quinona foi acompanhada durante 10 minutos a 525 nm ( $\epsilon_{525} = 65.000 \text{ L/M} \times \text{cm.}$ ). A atividade foi expressa em UI/L por minuto.

### **3.6.5. Atividade de Peroxidase**

Esta atividade foi determinada na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (SZKLARZ et al., 1989).

A mistura de reação foi preparada nas mesmas condições como para lacase, utilizando-se os mesmos substratos enzimáticos, porém na presença de 0,1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  2,0 mM em lugar de água destilada. A atividade de peroxidase foi expressa em UI/L por minuto.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Curva padrão de vanilina

A Figura 7 mostra a curva padrão de vanilina que foi elaborada utilizando-se 6 soluções metanólicas de concentrações variadas (1, 2, 4, 6, 8 e 10 mg/L).

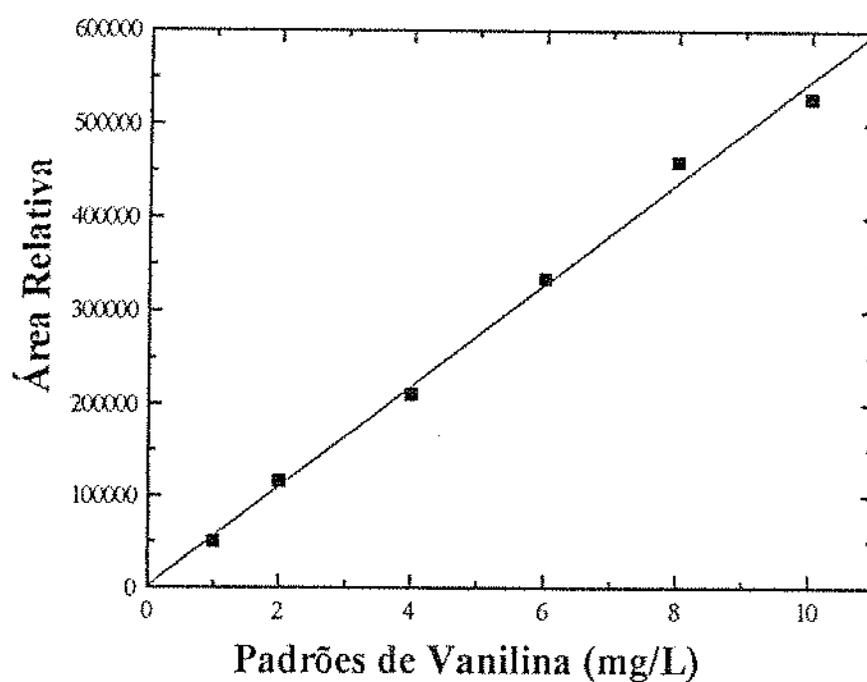


Figura 7. Curva de calibração da vanilina.

A partir dos valores obtidos, foi calculada a regressão linear e determinou-se que  $y = 2195,02466 + 54469,31781 \cdot X$  ( $r = 0,99724$ ).

## **4.2. Seleção dos fungos produtores de vanilina**

### **4.2.1. Quantificação por CLAE.**

A seleção dos fungos produtores de vanilina foi realizada em duas etapas. Primeiramente todos os 37 fungos foram desenvolvidos em meio de cultura líquido contendo ácido ferúlico como fonte de carbono e sais minerais, sob temperatura de 30 °C e sem agitação. Os sobrenadantes foram submetidos à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A quantificação de vanilina foi realizada através de padronização externa. Os valores de área dos picos obtidos através dos cromatogramas foram quantificados com base na curva padrão elaborada para este fim.

A síntese de vanilina nos caldos sobrenadantes está representada na Figura 8.

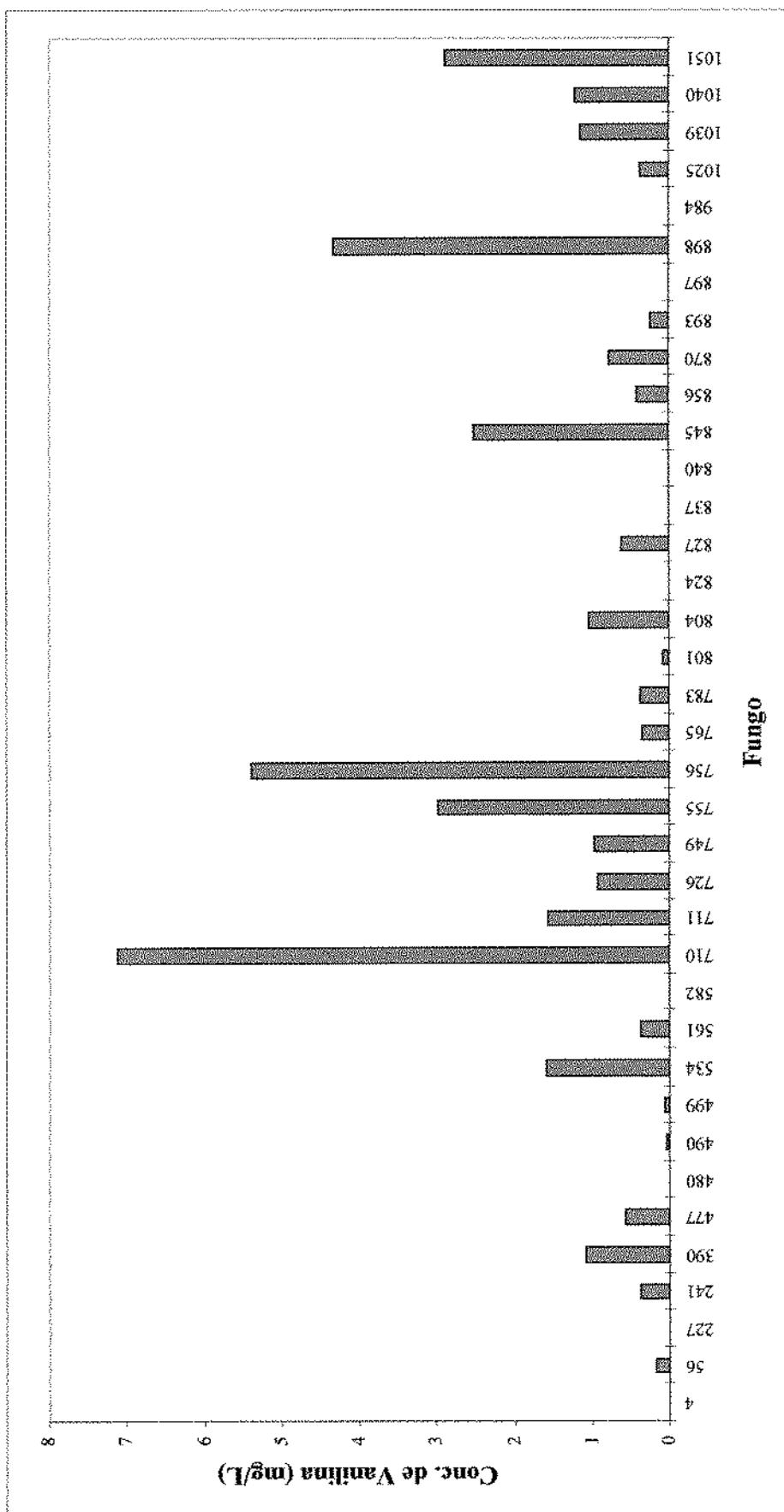


Figura 8. Quantificação da produção de vanilina nos diversos fungos estudados, por CLAE.

As linhagens que apresentaram melhores resultados foram: 534, 710, 711, 755, 756, 804, 845, 898, 1040 e 1051. Os valores de tempo de retenção e concentração de vanilina obtida estão representados a seguir, na Tabela 4.

Tabela 4. Comparação do tempo de retenção, área dos picos e concentração de vanilina obtidos através dos cromatogramas das amostras dos fungos desenvolvidos em meio de cultura contendo ácido ferúlico.

|                               | Tempo de retenção<br>(min.) | Área Relativa | Concentração de<br>Vanilina (mg/L) |
|-------------------------------|-----------------------------|---------------|------------------------------------|
| Fungo                         |                             |               |                                    |
| 534                           | 8,309                       | 88912         | 1,59                               |
| 710                           | 8,245                       | 389543        | 7,11                               |
| 711                           | 8,312                       | 53262         | 0,93                               |
| 755                           | 8,189                       | 165385        | 2,99                               |
| 756                           | 8,287                       | 296882        | 5,4                                |
| 804                           | 8,345                       | 56399         | 0,99                               |
| 845                           | 8,320                       | 137189        | 2,47                               |
| 898                           | 8,219                       | 238876        | 4,34                               |
| 1040                          | 8,314                       | 68835         | 1,22                               |
| 1051                          | 8,333                       | 159973        | 2,89                               |
| Padrão<br>de vanilina (4mg/L) | 8,247                       | 219120        | 3,98                               |

#### 4.2.1.1. Resultados cromatográficos

A Figura 9 apresenta o perfil cromatográfico do padrão de vanilina onde é possível observar o tempo de retenção do composto ( $t_R = 8,247$  minutos).

O padrão foi aplicado na coluna cromatográfica todos os dias em que houve determinação de vanilina nos sobrenadantes das amostras (padrão diário), para a verificação da estabilidade e reprodutibilidade do equipamento. A coluna utilizada mostrou-se eficiente na separação de todos os compostos, o que pôde ser visualizado através dos cromatogramas das amostras.

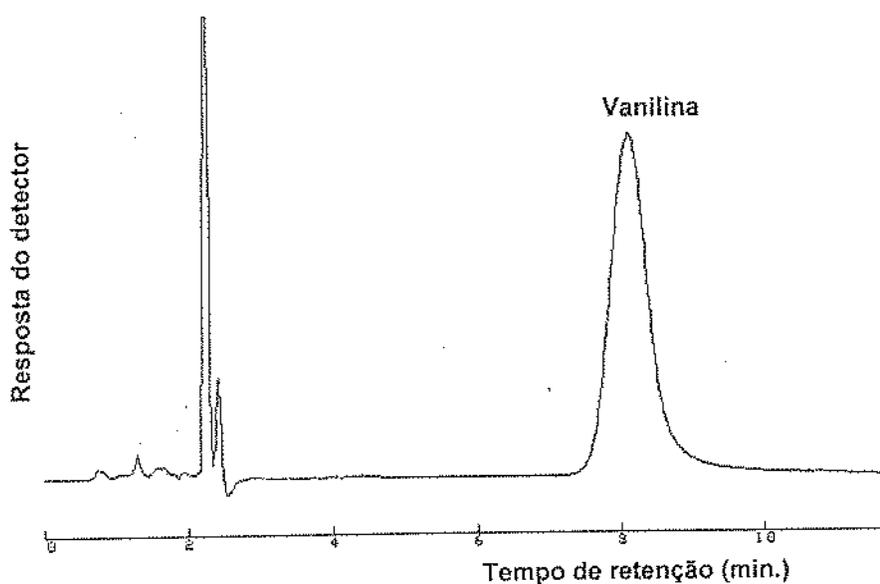


Figura 9. Perfil cromatográfico do padrão de vanilina.

Condições cromatográficas: Coluna: ZORBAX ODS, 5  $\mu\text{m}$ , 15 cm x 4,6 mm, fase móvel: metanol / água (30:70, v/v), vazão: 0,8 mL/min., volume de amostra injetado: 20  $\mu\text{L}$ ., detecção: UV, 279 nm.

A Figura 10 mostra o perfil cromatográfico dos padrões de ácido ferúlico ( $t_R = 2,103$  minutos) e ácido vanílico ( $t_R = 5,324$  minutos).

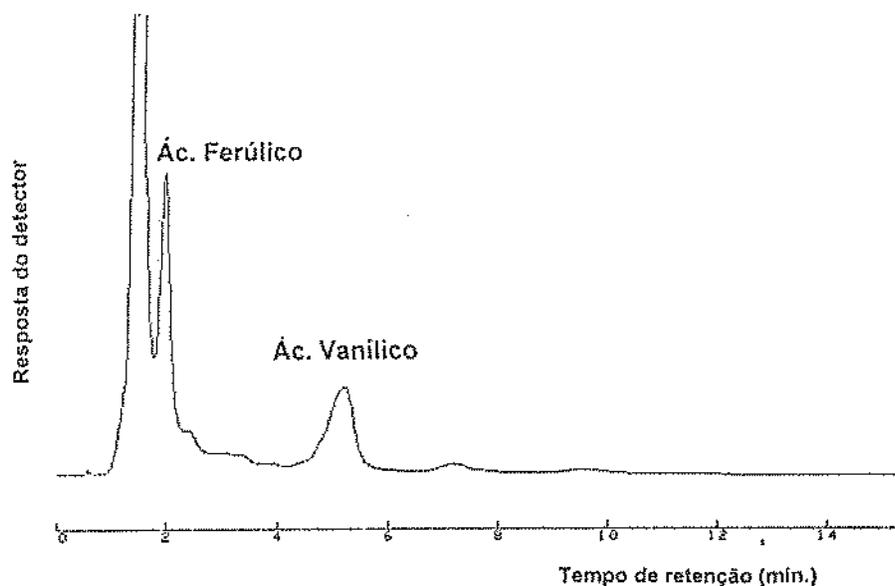


Figura 10. Perfil cromatográfico dos padrões de ácido ferúlico e ácido vanílico.

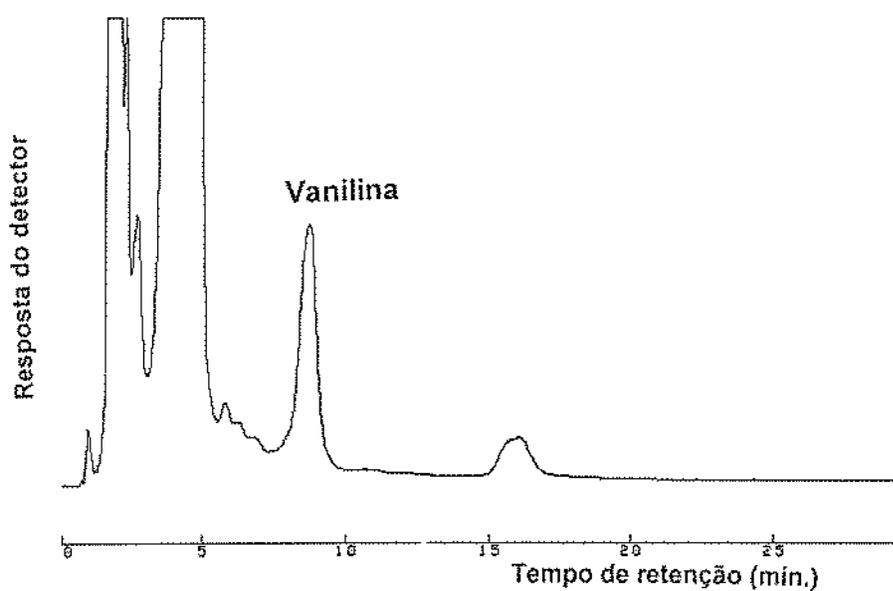
Condições cromatográficas: Coluna: ZORBAX ODS, 5  $\mu$ m, 15 cm x 4,6 mm, fase móvel: metanol / água (30:70, v/v), vazão: 0,8 mL/min., volume de amostra injetada: 20  $\mu$ L, detecção: UV, 279 nm.

Para uma melhor visualização do comportamento cromatográfico dos compostos encontrados nos caldos obtidos dos crescimentos fúngicos, encontra-se demonstrado na Figura 11 o perfil cromatográfico das amostras. A Figura 11-A representa o cromatograma de uma amostra do fungo linhagem 755 - teste 7, onde se verifica a presença do pico de vanilina ( $t_R = 8,401$  minutos).

Na Figura 11-B está representada uma amostra do fungo 1051 - teste 2, onde o pico de vanilina também está presente ( $t_R = 8,367$

minutos). Estes picos foram confirmados através do espectro de absorção.

A)



B)

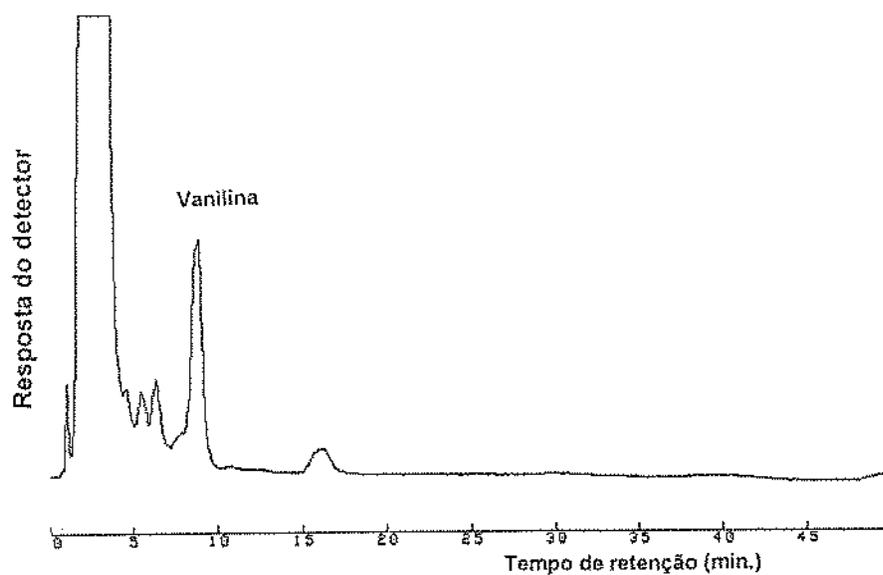


Figura 11. Perfil cromatográfico da amostra do fungo linhagem 755 (A) e 1051(B), obtidos a partir dos testes realizados. Condições cromatográficas: Coluna: ZORBAX ODS, 5  $\mu$ m, 15 cm x 4,6 mm, fase móvel: metanol / água (30:70, v/v), vazão: 0,8 mL/min., volume da amostra injetado: 20  $\mu$ L e detecção: UV, 279 nm.

#### 4.2.1.2. Espectroscopia de absorção

O detector utilizado não permite a comprovação da identidade dos picos, por não se tratar de um detector por arranjo de diodos. Faz-se necessária a confirmação através de algum método analítico para este fim. No presente trabalho, a espectroscopia de absorção na região ultravioleta foi utilizada por apresentar facilidade de manuseio e rapidez de resultados.

O espectro de absorção da vanilina está representado na Figura 12, bem como dos compostos obtidos após separação cromatográfica nos testes 2 e 7.

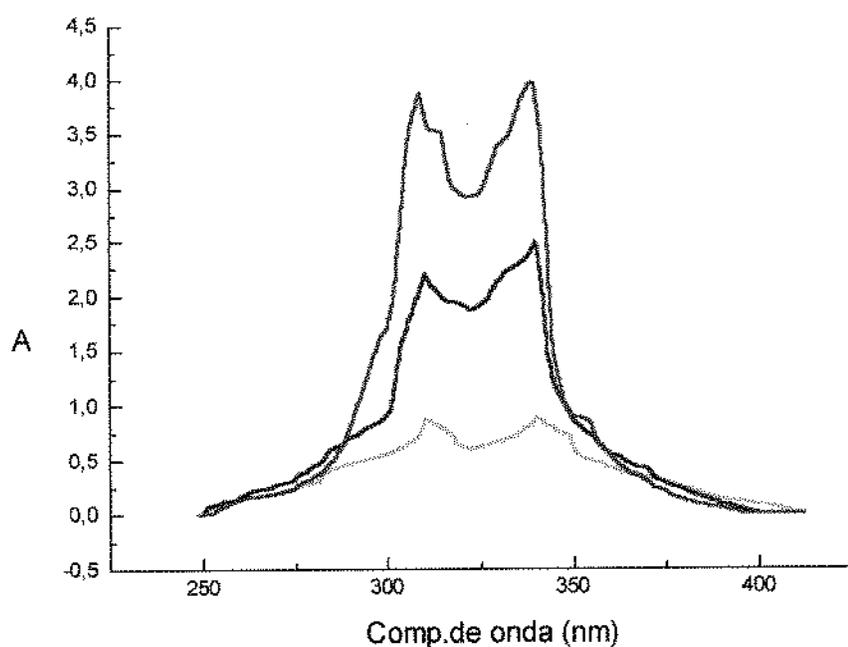


Figura 12. Espectro de absorção do padrão de vanilina ( — ), composto coletado durante análise cromatográfica do caldo obtido do crescimento do fungo 755 - teste 7 ( — ) e do fungo 1051 - teste 2 ( ———). A = Absorbância.

O espectro de absorção dos produtos metabólicos encontrados nos caldos de crescimento dos fungos 755 e 1051 confirmaram a identidade do composto vanilina, pois apresentaram dois picos de maior absorção (309 nm e 340 nm), em conformidade com os valores apresentados para o padrão. ÖTUK (1985) utilizou uma linhagem da bactéria *Escherichia coli* na degradação do ácido ferúlico para obtenção de vanilina, e os resultados obtidos para o espectro de absorção foram equivalentes aos encontrados neste trabalho.

#### **4.2.2. Perfil de crescimento dos fungos frente a diversos substratos fenólicos.**

Através da análise do perfil de crescimento dos fungos em diversos substratos pode-se verificar que os fungos apresentaram crescimento em alguns dos substratos testados, mas encontraram certa dificuldade em degradar o ácido *p*-anísico, aldeído veratrílico e a vanilina. Estes compostos são quimicamente mais simples que os compostos onde houve maior crescimento e este crescimento pode estar relacionado com a indução de enzimas ligninolíticas ocasionada pelos compostos mais complexos, o que não ocorreria na presença de monômeros mais simples.

A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos neste teste, demonstrando o crescimento das 37 linhagens de fungos utilizadas neste trabalho.

Tabela 5. Perfil do crescimento dos fungos em vários substratos.

| Fungo | Ác. Ferúlico | Ác. Cafeico | Ác. Cinâmico | Ác. p-anísico | Ác. Lignosulfônico | Éter Guaiacol glicérico | Aldeído. Veratrílico | Vanilina |
|-------|--------------|-------------|--------------|---------------|--------------------|-------------------------|----------------------|----------|
| 4A    | -            | -           | -            | -             | -                  | -                       | -                    | -        |
| 56    | +++          | +++         | ++           | +++           | ++                 | ++                      | -                    | +++      |
| 227   | -            | -           | -            | -             | -                  | -                       | -                    | -        |
| 241   | +            | +           | -            | +             | ++                 | ++                      | -                    | -        |
| 390   | ++           | ++          | -            | +             | +++                | +                       | -                    | -        |
| 477   | +            | ++          | -            | -             | ++                 | ++                      | -                    | +        |
| 480   | +++          | +++         | ++           | ++            | ++                 | +                       | -                    | -        |
| 490   | ++           | +           | -            | -             | +                  | +                       | +                    | ++       |
| 499   | +            | +++         | +            | +++           | +++                | +                       | +                    | -        |
| 534   | +            | +           | +            | -             | ++                 | +                       | -                    | -        |
| 561   | +            | +           | +            | -             | ++                 | +                       | -                    | -        |
| 582   | ++           | +++         | +            | +             | ++                 | +                       | -                    | -        |
| 710   | +++          | +++         | +            | +             | +                  | ++                      | -                    | -        |
| 711   | +            | ++          | -            | -             | ++                 | +                       | -                    | +        |
| 726   | ++           | +++         | -            | +             | ++                 | +                       | -                    | -        |
| 749   | +            | ++          | -            | +             | ++                 | +                       | -                    | -        |
| 755   | +            | +           | +            | +             | +                  | +                       | +                    | -        |
| 756   | +            | +++         | -            | -             | ++                 | ++                      | -                    | -        |
| 765   | +++          | +++         | -            | -             | +                  | ++                      | -                    | -        |
| 783   | +            | +++         | -            | -             | ++                 | ++                      | +                    | +        |
| 801   | ++           | ++          | -            | +             | +                  | +++                     | +                    | +        |
| 804   | +            | ++          | -            | +             | +                  | +                       | -                    | -        |
| 824   | +++          | +++         | +++          | +++           | +++                | +                       | +                    | -        |
| 827   | +            | ++          | -            | ++            | ++                 | +                       | +                    | +        |
| 837   | +++          | +++         | +            | -             | +                  | +                       | -                    | -        |
| 840   | ++           | +++         | ++           | ++            | +                  | +                       | +                    | -        |
| 845   | +++          | +++         | -            | -             | ++                 | +                       | +                    | -        |
| 856   | +            | +++         | +            | +++           | +                  | +                       | ++                   | +        |
| 870   | +            | -           | ++           | +++           | ++                 | +                       | -                    | -        |
| 893   | ++           | +           | ++           | -             | ++                 | +                       | -                    | -        |
| 897   | +++          | +++         | -            | +             | +                  | +                       | -                    | -        |
| 898   | +++          | +++         | +            | +             | ++                 | +                       | -                    | -        |
| 984   | ++           | +++         | +++          | +++           | ++                 | ++                      | -                    | +++      |
| 1025  | ++           | +           | +            | +++           | +                  | +++                     | +                    | +        |
| 1039  | +            | +           | ++           | +++           | ++                 | +                       | -                    | -        |
| 1040  | ++           | +++         | ++           | -             | +++                | +                       | +                    | -        |
| 1051  | +            | +++         | -            | -             | ++                 | ++                      | -                    | -        |

(-) Não houve crescimento. (+) Crescimento fraco. (++) Crescimento moderado.  
 (+++) Crescimento intenso.

Após as análises cromatográficas durante a fase de seleção dos fungos, as linhagens 534, 711 e 1040 apresentaram crescimento em vanilina, e por esse motivo foram abandonadas. Para o prosseguimento dos trabalhos foram selecionados os fungos 710, 755, 756, 804, 845, 898 e 1051.

### 4.3. Experimentos

Os sete fungos selecionados (710, 755, 756, 804, 845, 898 e 1051) foram estudados em uma série de 10 experimentos, para avaliação de sua capacidade em degradar ácido ferúlico e eugenol em vanilina, pois estes são os substratos mais utilizados para este fim, de acordo com a literatura.

Os testes consistiram de seu crescimento em um meio de cultura basal fixo contendo sais minerais e a inclusão ou não de glicose 2%, extrato de levedura 0,1 %, cisteína 0,1 %, eugenol 0,001M ou ácido ferúlico 0,001 M dissolvido em etanol ou NaOH, e adicionados ao meio antes ou após o crescimento dos fungos, conforme descrito anteriormente na Tabela 3, num volume final de 50 mL. Somente os testes número 1 e 8 foram realizados com o substrato sendo adicionado no momento da incubação, sendo que para os demais o substrato foi adicionado após o terceiro dia de crescimento.

Para melhor entendimento dos testes foram atribuídas letras que identificam os parâmetros utilizados na realização dos mesmos. Glicose 2% (G), extrato de levedura 0,1 % (Y), cisteína 0,1 % (C),

ácido ferúlico 0,001 M diluído em etanol (FEt), ácido ferúlico 0,001 M diluído em NaOH (FNa) e eugenol 0,001 M (E). A temperatura utilizada para todos os testes foi de 30° C, e o pH do meio sem o inóculo foi de 5,5. Quando houve agitação, a indicação está presente na legenda dos gráficos.

A Figura 13 mostra os resultados obtidos após a realização do Teste 1.

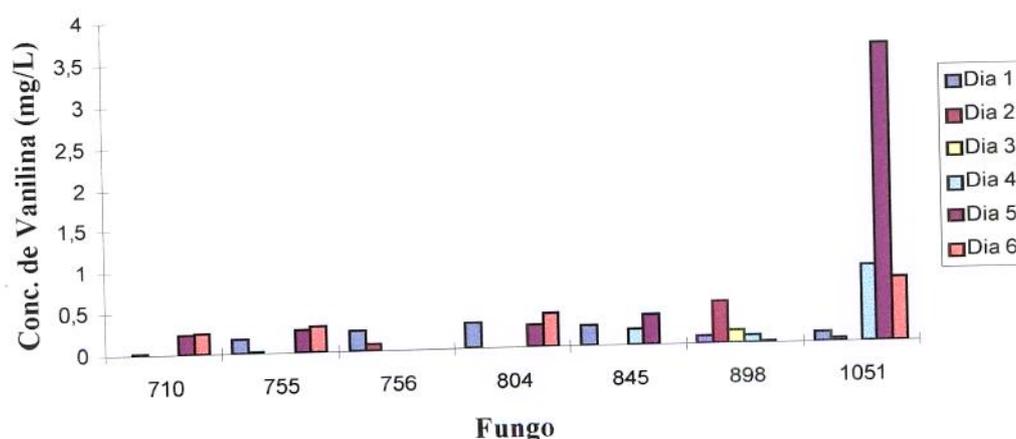


Figura 13. Produção de vanilina obtida no Teste 1.

(meio FNa, sem agitação).

Pode-se observar que o Teste 1 utilizou o substrato ácido ferúlico, onde este foi adicionado ao meio de crescimento antes da inoculação do microrganismo. Os resultados de produção de vanilina foram bastante baixos, excetuando-se o fungo linhagem 1051 (3,6

mg/L), o que pode estar relacionado ao fato de que esta síntese faz parte do metabolismo secundário do fungo, e neste teste os demais microrganismos provavelmente utilizaram o ácido ferúlico para a produção de biomassa ou crescimento celular.

A Figura 14 apresenta os resultados obtidos no Teste 2.

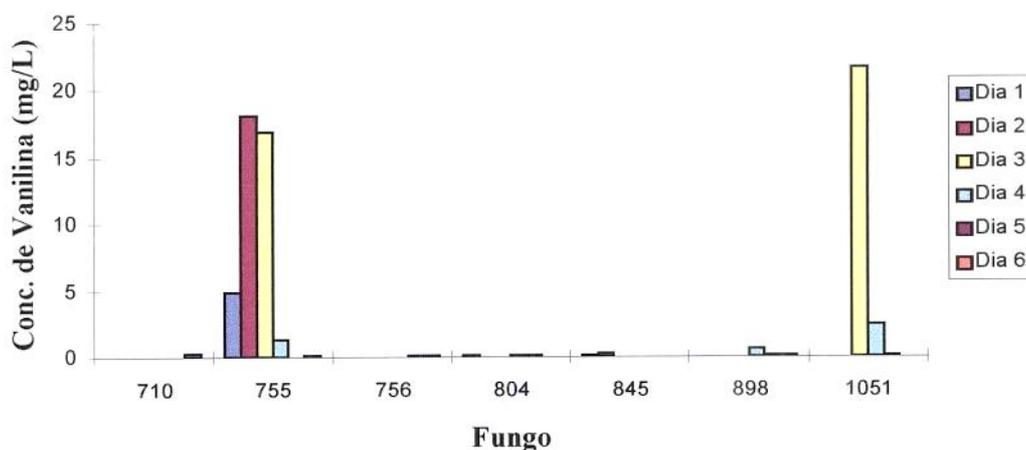


Figura 14. Produção de vanilina obtida no Teste 2.  
(meio GYFNa, sem agitação).

Com a adição de ácido ferúlico após os três dias de crescimento, duas linhagens, 755 e 1051 apresentaram crescimento e síntese de vanilina satisfatórios (18,2 mg/L e 21,7 mg/L respectivamente) frente às outras linhagens utilizadas no teste, embora não tenham produzido níveis de interesse industrial. Quando o ácido ferúlico é dissolvido em NaOH forma-se o sal de ácido ferúlico

ou ferulato, que pode ser mais facilmente assimilável pelo microrganismo empregado no teste.

Na Figura 15 estão apresentados os resultados obtidos após a realização do Teste 3.

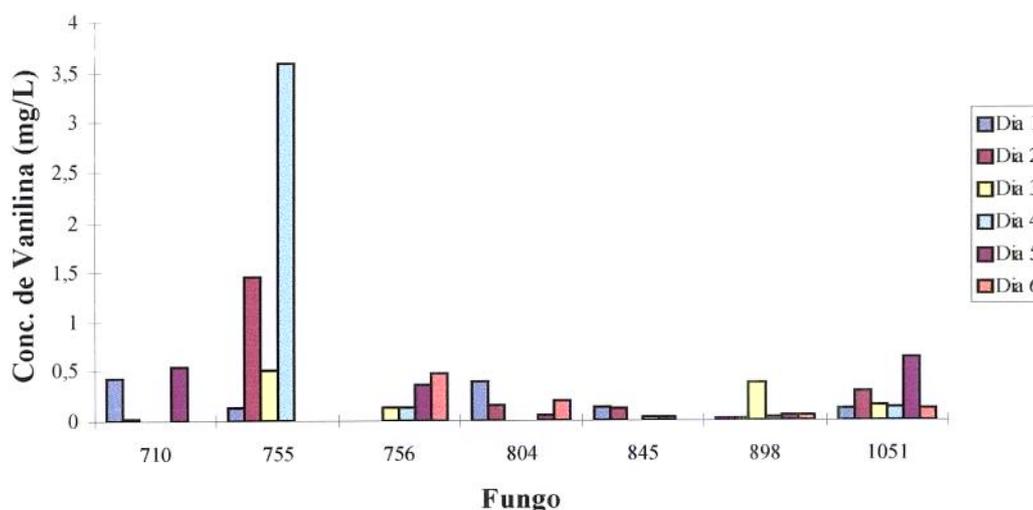


Figura 15. Produção de vanilina obtida no Teste 3.

(meio GYFET, com agitação).

As linhagens 755 (3,6 mg/L) e 1051 (0,64 mg/L) novamente apresentaram capacidade superior para sintetizar vanilina, porém, a produção foi afetada negativamente. Posteriormente, durante a realização de outros testes, verificou-se que a agitação a 150 rpm afeta a síntese de vanilina, causando diminuição desta, em comparação com os testes similares sem agitação.

A partir destes três testes iniciais, uma segunda seleção foi realizada baseada nos resultados obtidos. Os fungos linhagens 755 e 1051 foram os que atingiram melhores resultados nestes testes e, por essa razão, escolhidos para a continuidade do trabalho.

A Figura 16 mostra o desempenho das linhagens selecionadas na produção de vanilina no Teste 4.

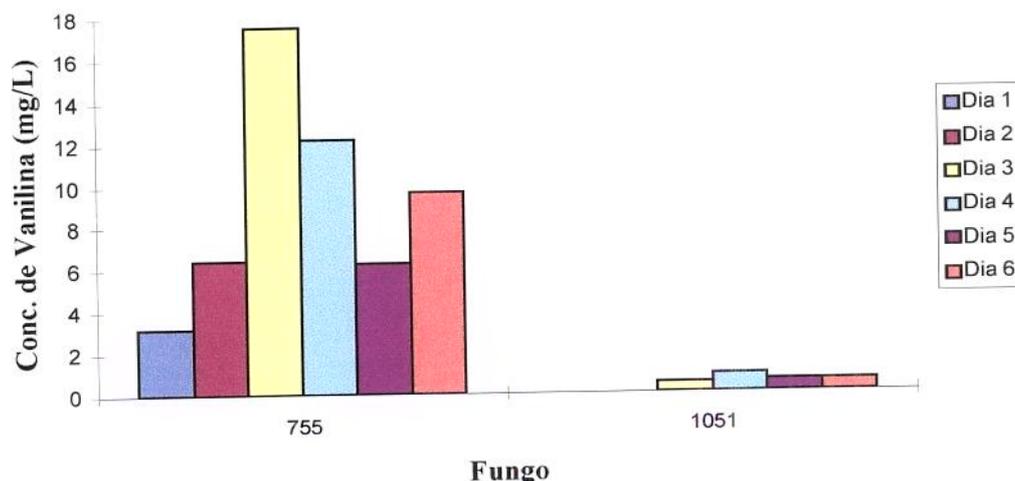


Figura 16. Produção de vanilina obtida no Teste 4.

(meio GYFET, sem agitação).

Após a realização do Teste 4 a linhagem 755 apresentou melhor síntese de vanilina (17,5 mg/L) que a linhagem 1051 (0,82 mg/L). Esse comportamento pode ser verificado em quase todos os testes realizados, uma vez que a linhagem 755 apresenta valores bem mais altos que o outro fungo utilizado nos experimentos.

Estes valores obtidos, quando comparados ao Teste similar com agitação (Teste 3) são bastante superiores.

A Figura 17 ilustra a produção de vanilina obtida após a realização do Teste 5.

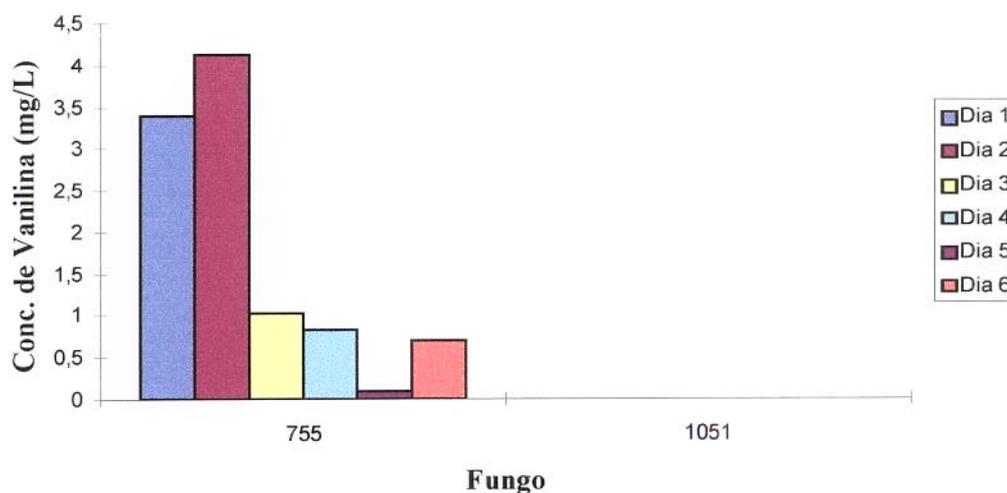


Figura 17. Produção de vanilina obtida no Teste 5.

(meio GYFNa, com agitação).

Conforme pode-se observar na Figura 17, novamente o fungo linhagem 755 apresentou melhores resultados (4,1 mg/L) que o fungo linhagem 1051 (não sintetizou vanilina). A influência da agitação pôde novamente ser evidenciada, o que refletiu na obtenção de valores menores quando comparados ao teste similar sem agitação (Teste 2).

A linhagem 1051 havia produzido grande quantidade de vanilina no Teste 2 e, por algum motivo, não obteve êxito no teste com agitação.

A partir do Teste 6 o agente redutor cisteína foi empregado, em conformidade com alguns relatos encontrados na literatura (GRBIC-GALIC, 1985, TURNER & RICE, 1975 e ANGELES De La TORRE & GOMEZ-ALARCON, 1991). A Figura 18 apresenta os resultados obtidos no Teste 6.

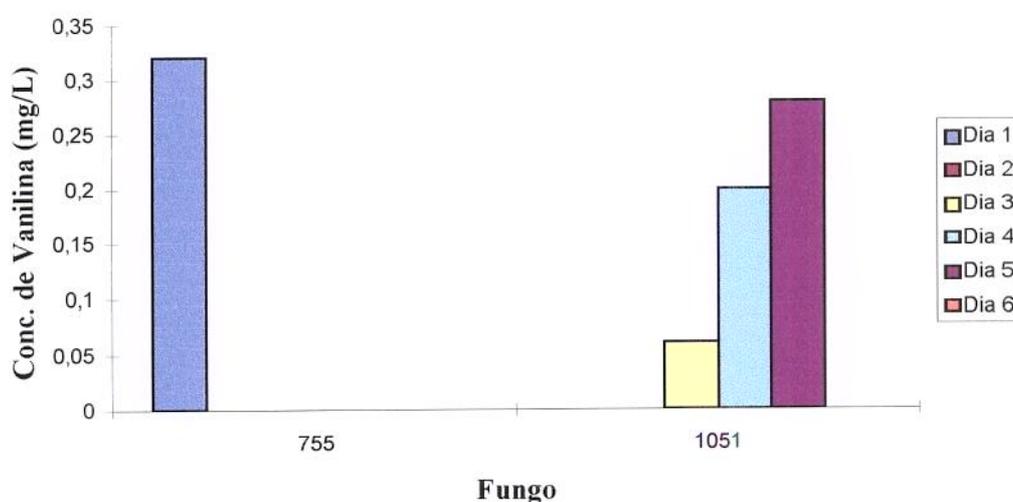


Figura 18. Produção de vanilina obtida no Teste 6.

(meio GYCFEt, com agitação).

Neste teste o fungo linhagem 755 novamente apresentou melhores resultados de síntese de vanilina (0,32 mg/L) que o fungo linhagem 1051 (0,28 mg/L), ainda que em valores bastante reduzidos quando comparados aos testes anteriores (Testes 2 a 5). A presença do agente redutor cisteína não causou elevação na síntese de vanilina, pelo contrário, os níveis obtidos foram menores que no teste similar sem a presença de cisteína (Teste 3), e mais uma vez a agitação teve uma importante influência, diminuindo os níveis de

vanilina gerados.

Na Figura 19 podemos observar os resultados de síntese de vanilina obtidos através do Teste 7.

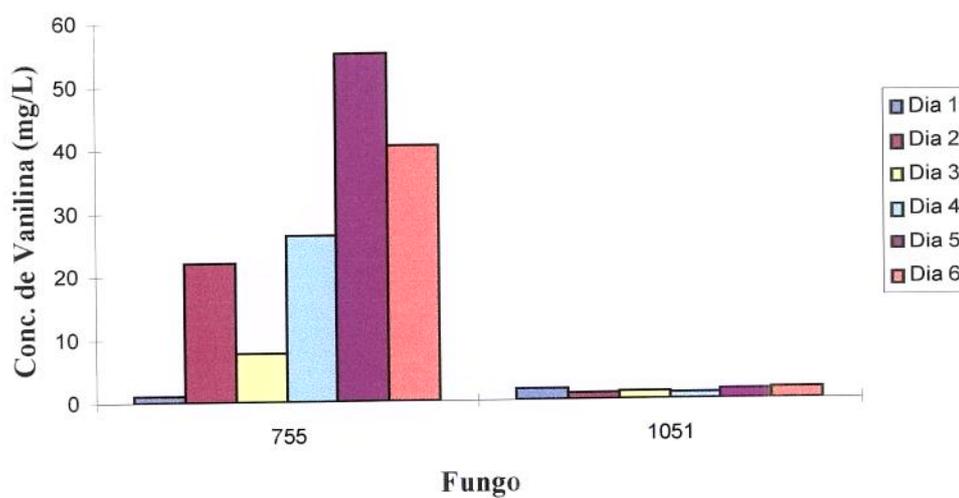


Figura 19. Produção de vanilina obtida no Teste 7.

(meio GYCFNa, sem agitação).

Analisando a Figura 19 podemos verificar que o teste 7 foi o que apresentou melhores resultados (55,2 mg/L-produto molar de 28,4 %), principalmente quando comparado aos outros testes que utilizaram agitação a 150 rpm. Neste teste 7 o fungo linhagem 755 novamente se mostrou mais eficiente que o 1051. Quando comparado com o Teste 2, onde o mesmo meio (excetuando-se a cisteína) foi empregado, observa-se que a síntese de vanilina foi 3 vezes superior para o fungo 755, mas a produção pelo fungo 1051 caiu bastante.

A concentração de vanilina alcançada neste teste foi maior que a obtida por FALCONNIER et al., (1994) utilizando uma linhagem do

fungo basidiomiceto *Pycnoporus cinnabarinus*, que foi de 64 mg/L , com um produto molar de aproximadamente 27,5 %. Por ser um fungo deuteromiceto pouco estudado, o fungo 755 demonstrou ótimos resultados e, por esse motivo, a realização de estudos posteriores é indicada.

Empregando agitação de 120 rpm e uma bioconversão em duas etapas, ou seja, utilizando dois microrganismos, *Aspergillus niger* e *Pycnoporus cinnabarinus*, LESAGE-MEESSEN et al., (1996) conseguiram atingir um máximo de 237 mg/L de vanilina.

As maiores concentrações de vanilina foram alcançadas durante a realização deste trabalho quando não se utilizou agitação, fato não observado na maioria dos trabalhos encontrados na literatura, onde foram utilizadas culturas agitadas variando de 80 a 300 rpm.

Os testes seguintes utilizaram eugenol como substrato. Não foi observado nenhuma produção de vanilina, devido ao fato do eugenol ser um antifúngico potente, e bem poucos microrganismos são capazes de crescer em meios contendo este substrato, conforme já foi discutido no capítulo de revisão bibliográfica.

Teste 8: Crescimento em meio EC, com agitação.

Teste 9: Crescimento em meio GYCE, com agitação.

Teste 10: Crescimento em meio GYCE, sem agitação.

#### 4.4. Efeito do pH sobre a síntese de vanilina

Durante a realização dos testes o valor do pH dos caldos filtrados foi constantemente monitorado para verificar uma possível relação entre o pH e a síntese de vanilina. De uma maneira geral esta síntese é acompanhada pelo abaixamento exacerbado do pH , atingindo valores próximos a 2,0.

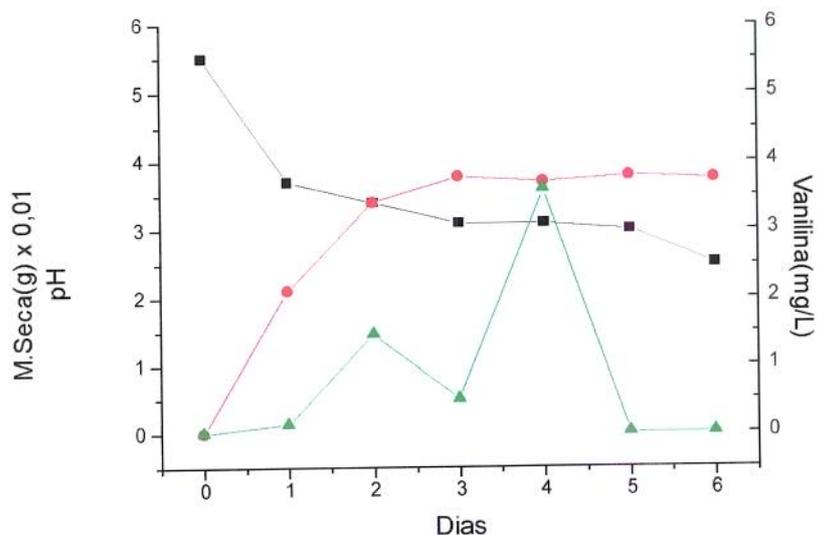
Durante a degradação do ácido ferúlico os microrganismos utilizam-se de uma enzima deacetilase que rompe a cadeia lateral, formando a vanilina e liberando uma molécula de acetato para cada molécula de vanilina gerada, causando acidificação do meio (GURUJEYALAKSHMI & MAHADEVAN, 1987 e ROSAZZA et al., 1995). As linhagens 755 e 1051 parecem apresentar esta enzima e promover a degradação do ácido ferúlico por esta via metabólica, conforme os resultados dos cromatogramas das amostras. Como a linhagem 755 foi a que apresentou melhores resultados de síntese de vanilina, o efeito do pH foi analisado somente para este fungo.

Para melhor visualização e comparação dos resultados, foram agrupados os testes 3 e 6 pois estes apresentaram baixa concentração de vanilina, e os testes 4 e 7 que forneceram concentrações maiores de vanilina.

Na Figura 20-A são apresentados os níveis de pH observados durante o crescimento do fungo linhagem 755 durante a realização do teste 3, ou seja, na presença de agitação e sem adição de cisteína como agente redutor e a Figura 20-B mostra os valores de pH

anotados durante a realização do teste 6, o qual utilizou agitação e adição de cisteína.

A)



B)

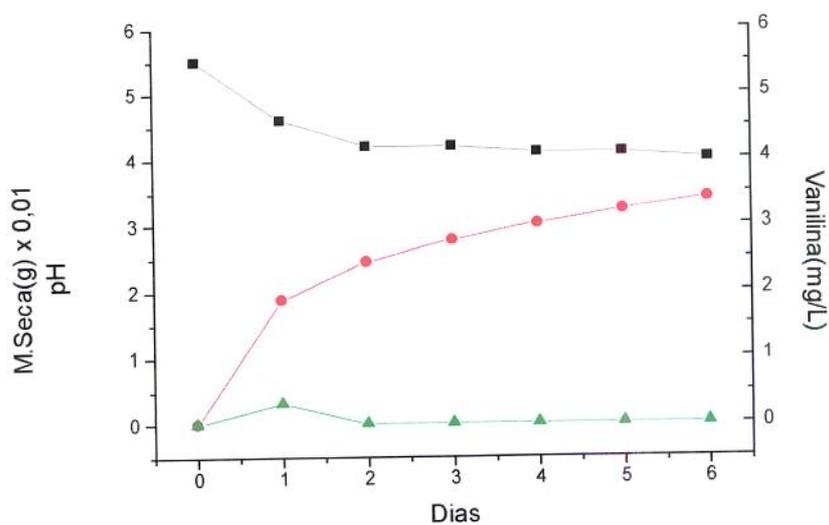


Figura 20. Efeito do pH e da massa celular sobre a síntese de vanilina observados nos testes 3 (Figura 20-A) e 6 (Figura 20-B).

■ pH, ● massa celular, ▲ conc. de vanilina.

Conforme os resultados demonstrados nas Figuras 20-A e 20-B, nota-se que o abaixamento do pH foi bastante discreto, principalmente no teste 6, e a concentração de vanilina obtida neste teste é inferior aos níveis encontrados no teste 3, onde houve um maior decréscimo do pH. O crescimento celular também foi menor no teste 6. Estes dois fatores em conjunto podem ter levado à diminuição da síntese de vanilina durante a realização do teste 6.

Estes valores de pH encontrados durante a síntese de vanilina são bastante próximos dos valores encontrados em trabalho de GUPTA et al., (1981), embora o abaixamento do pH tenha sido maior. Já a curva que representa a massa celular apresenta características similares.

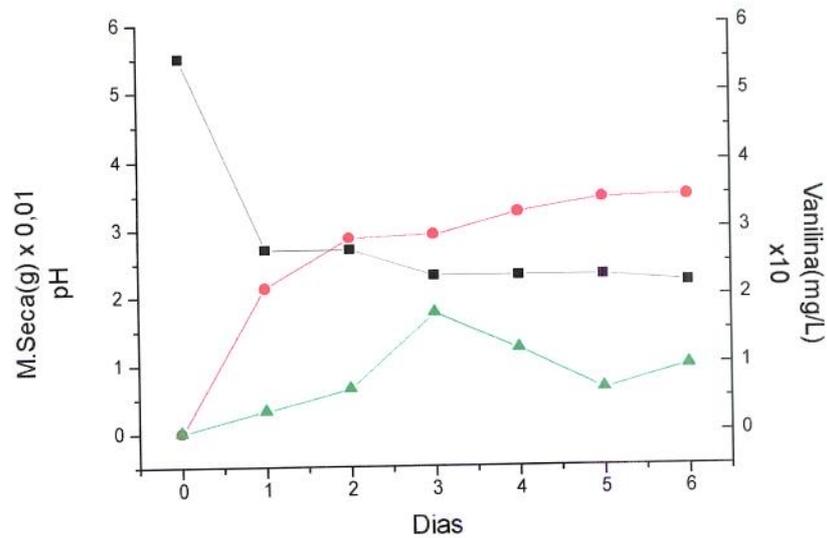
No teste 6, o qual utilizou cisteína, é observado um crescimento celular um pouco menor em relação ao crescimento apresentado pelo fungo linhagem 755 durante a realização do teste 3, que não utilizou cisteína. Não há como avaliar a extensão da influência da cisteína sobre o crescimento celular e a variação do pH somente com a realização destes testes.

Por outro lado, como pode ser observado nas Figuras 21-A e 21-B, o abaixamento do pH teve uma notável influência sobre a produção de vanilina durante a realização dos testes 4 e 7.

Os valores baixos de pH parecem ter colaborado para o aumento de massa celular e a síntese de vanilina poderia estar relacionada com este crescimento, uma vez que, quanto maior o

abaixamento do pH, maior foi o crescimento observado o que poderia ter ocasionado uma maior síntese de vanilina.

A)



B)

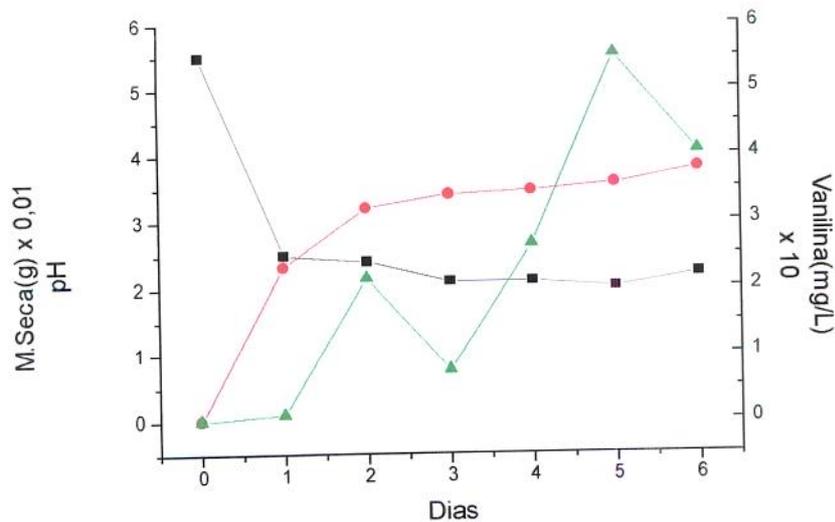


Figura 21. Efeito do pH e da massa celular sobre a síntese de vanilina observados nos testes 4 (Figura 21-A) e 7 (Figura 21-B).

■ pH, ● massa celular, ▲ conc. de vanilina.

#### 4.5. Determinação da atividade de enzimas ligninolíticas

Foram realizadas várias determinações de atividades enzimáticas responsáveis pela degradação da lignina numa tentativa de relacionar estas atividades e a síntese de vanilina, porém os resultados comprovaram que algumas dessas enzimas exercem uma influência negativa, diminuindo ou impedindo que maiores valores de vanilina sejam encontrados.

##### 4.5.1. Atividade de Lignina-peroxidase

Durante o crescimento do fungo linhagem 755 nos diversos testes, foram encontrados valores baixos, porém significativos de lignina-peroxidase (Figura 22), sendo que no teste 7, quando ela apareceu em pequena quantidade (0,56 UI/L), a produção de vanilina diminuiu.

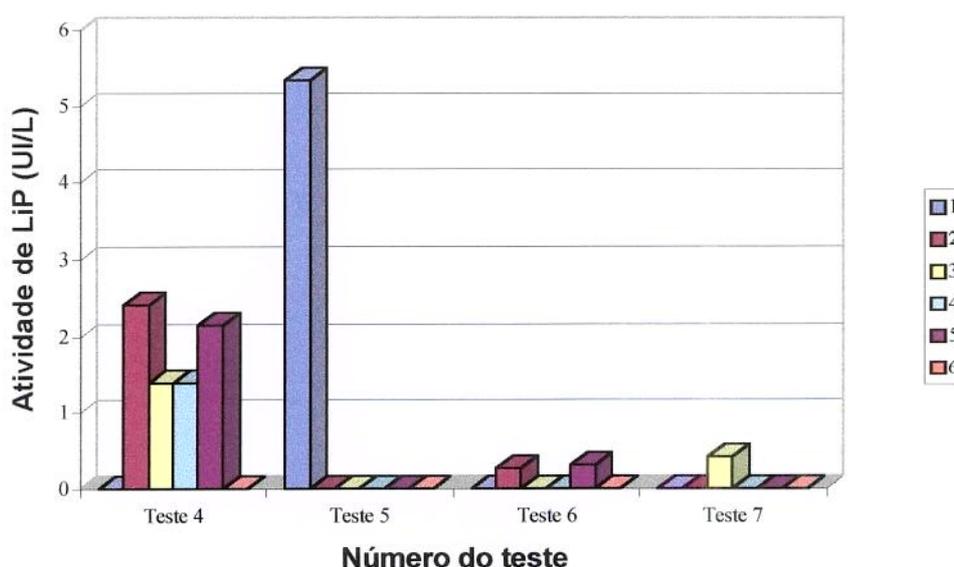


Figura 22. Atividade de lignina-peroxidase nos meios líquidos de crescimento do fungo linhagem 755.

Para o fungo linhagem 1051 a influência da enzima lignina-peroxidase pôde mais facilmente ser observada, pois, nos testes onde ela aparece (testes 5 e 6), concentrações mais baixas de vanilina foram encontradas.

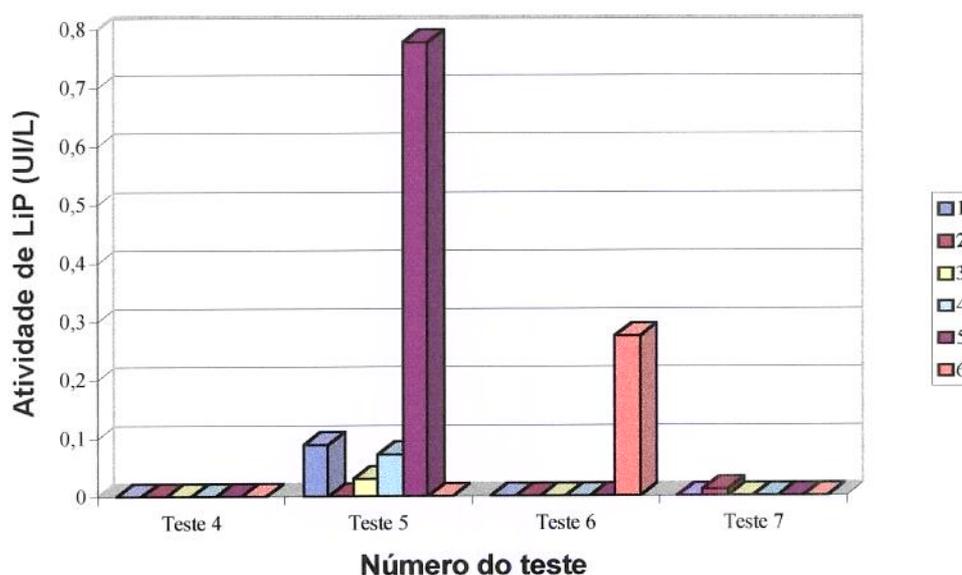


Figura 23. Atividade de lignina-peroxidase nos meios líquidos de crescimento do fungo linhagem 1051.

#### 4.5.2. Atividade de álcool veratrílico-oxidase (AVO)

Conforme se observa na Figura 24, nos testes realizados com o fungo linhagem 755, a enzima AVO apresenta níveis comparados aos de LiP e ocorre juntamente com esta.

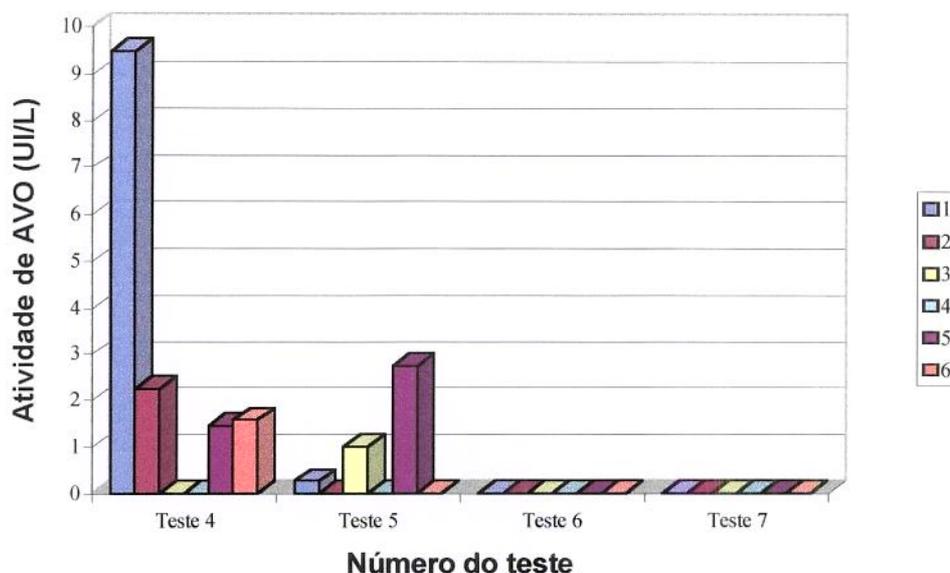


Figura 24. Atividade de álcool veratrílico-oxidase nos meios líquidos de crescimento do fungo linhagem 755.

Nos caldos obtidos dos testes relacionados com o fungo linhagem 1051 (Figura 25), a enzima AVO revelou o mesmo padrão de comportamento observado nos testes envolvendo a linhagem 755.

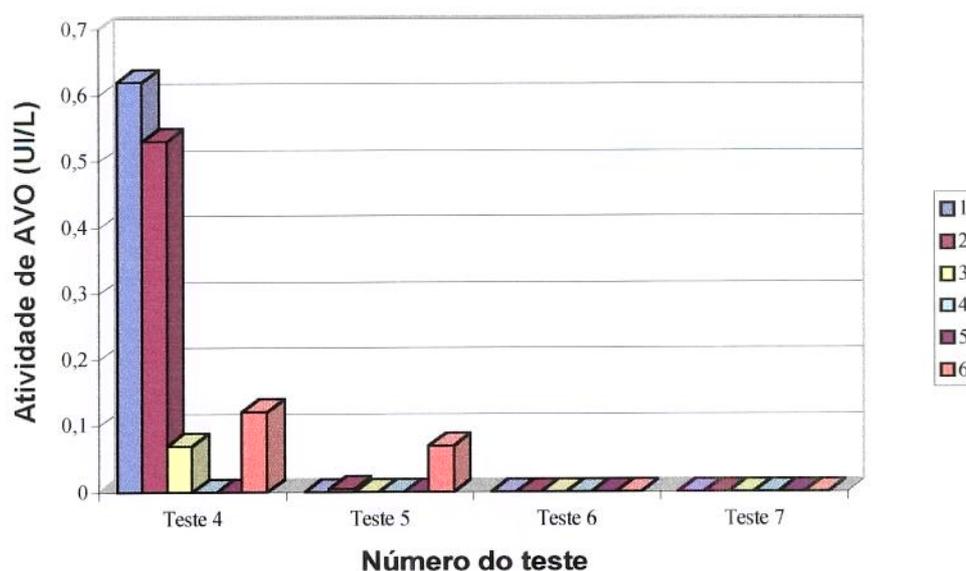


Figura 25. Atividade de álcool veratrílico-oxidase nos meios líquidos de crescimento do fungo linhagem 1051.

### 4.5.3. Atividade de manganês-peroxidase (MnP)

A enzima manganês-peroxidase esteve ausente em todos os testes realizados com o fungo linhagem 755, como pode ser visto na Figura 26. Isso pode ter contribuído para a obtenção de maiores resultados de concentração de vanilina pela linhagem 755.

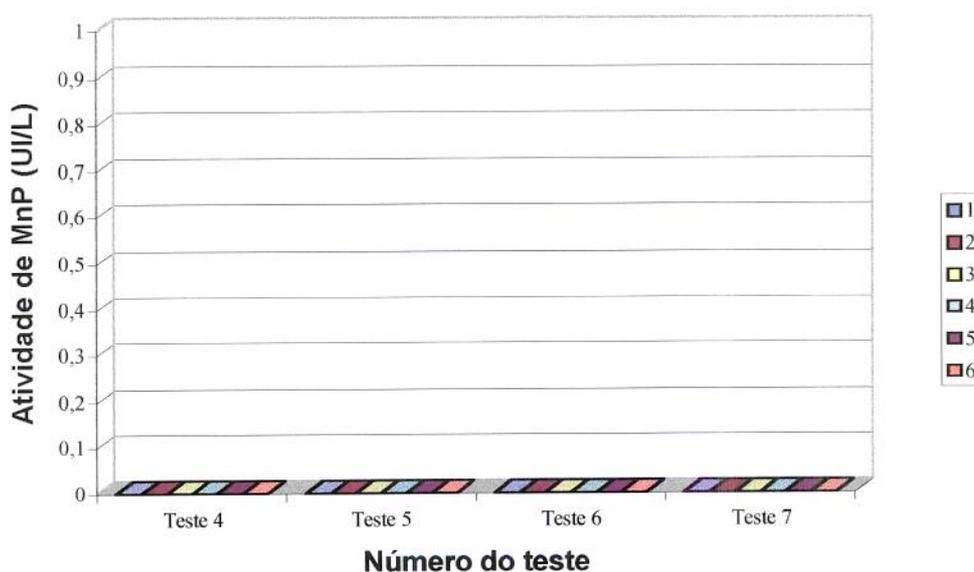


Figura 26. Atividade de manganês-peroxidase nos meios líquidos de crescimento do fungo linhagem 755.

Conforme demonstrado na Figura 27, os altos níveis de MnP encontrados para o fungo 1051 podem ter acarretado baixa na produção de vanilina por este fungo, quando comparado aos valores obtidos com a outra linhagem.

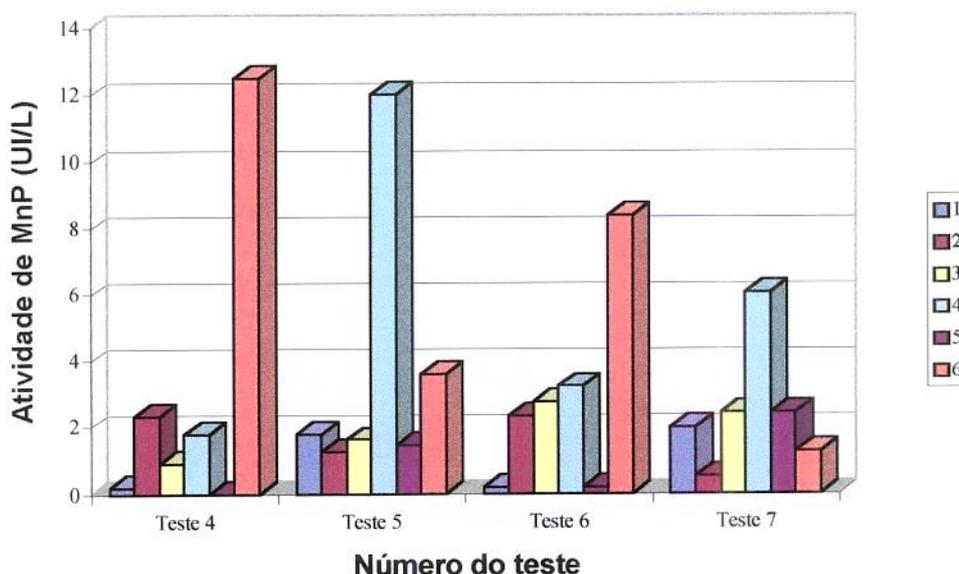


Figura 27. Atividade de manganês-peroxidase nos meios líquidos de crescimento do fungo linhagem 1051.

#### 4.5.4. Atividade de Lacase

A enzima lacase esteve mais regularmente distribuída nos caldos do fungo linhagem 755 e 1051 (ver Figuras 28 e 29), porém uma tentativa de se explicar a sua influência sobre a produção de vanilina seria muito imprudente. Um maior número de testes deveriam ser realizados para se determinar a relação entre a atividade de lacase e a produção de vanilina. A lacase é descrita na literatura como causadora de polimerização de substratos fenólicos, e pode estar agindo desta forma nos caldos dos testes.

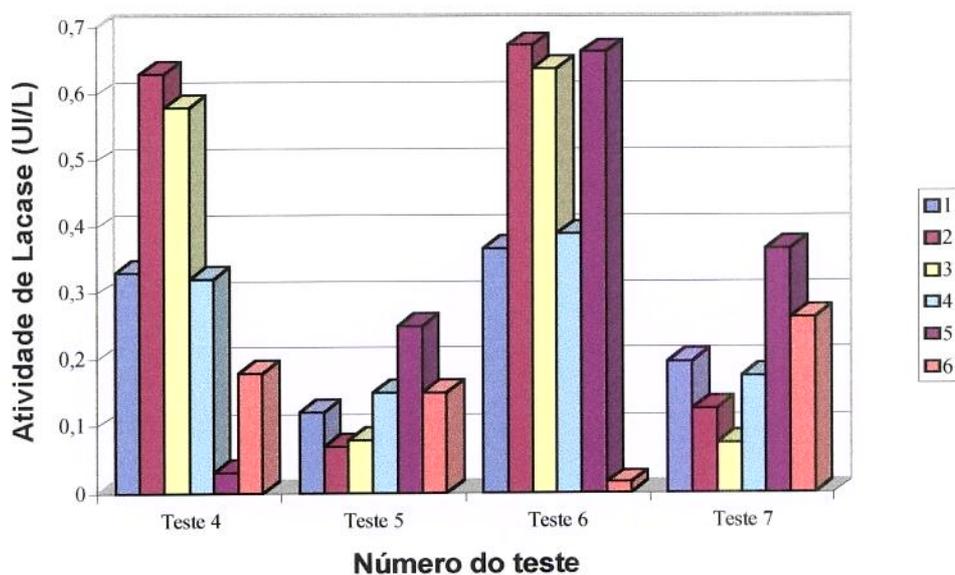


Figura 28. Atividade de lacase nos meios líquidos de crescimento do fungo linhagem 755.

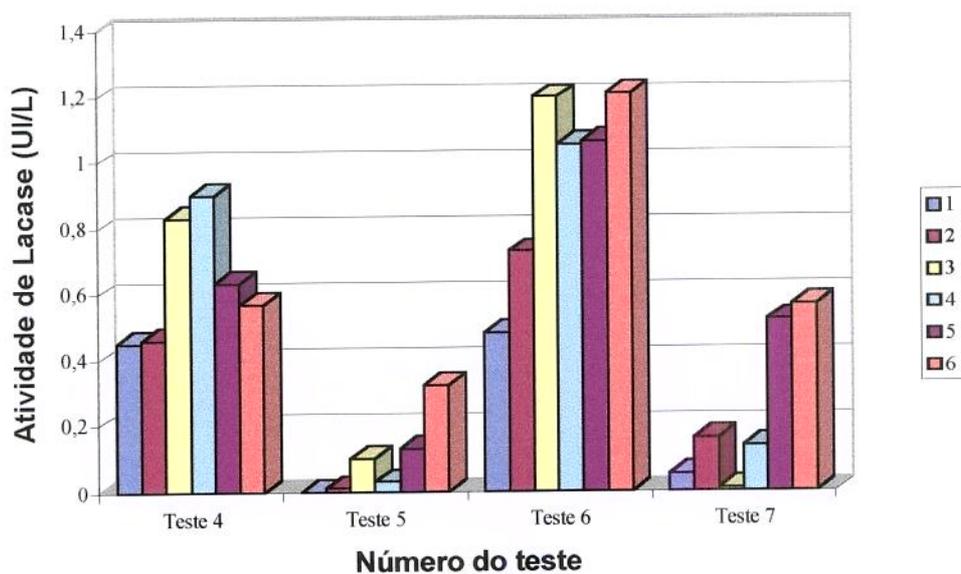


Figura 29. Atividade de lacase nos meios líquidos de crescimento do fungo linhagem 1051.

Os fungos com alta produção de lacase devem ser descartados quando se visa a síntese de vanilina (LESAGE-MEESSEN *et alii*, 1996).

#### 4.5.5. Atividade de Peroxidase

De acordo com as Figuras 30 e 31, a enzima peroxidase encontrava-se amplamente difundida nos caldos de ambas as linhagens, inclusive aparecendo nos testes que utilizaram o eugenol como substrato. Nos testes que utilizaram o eugenol não houve crescimento dos fungos, e o surgimento de peroxidases sugere que, ou os fungos sintetizaram essa enzima após a indução frente a um substrato tóxico e complexo, ou houve interferência do eugenol no método de determinação da enzima.

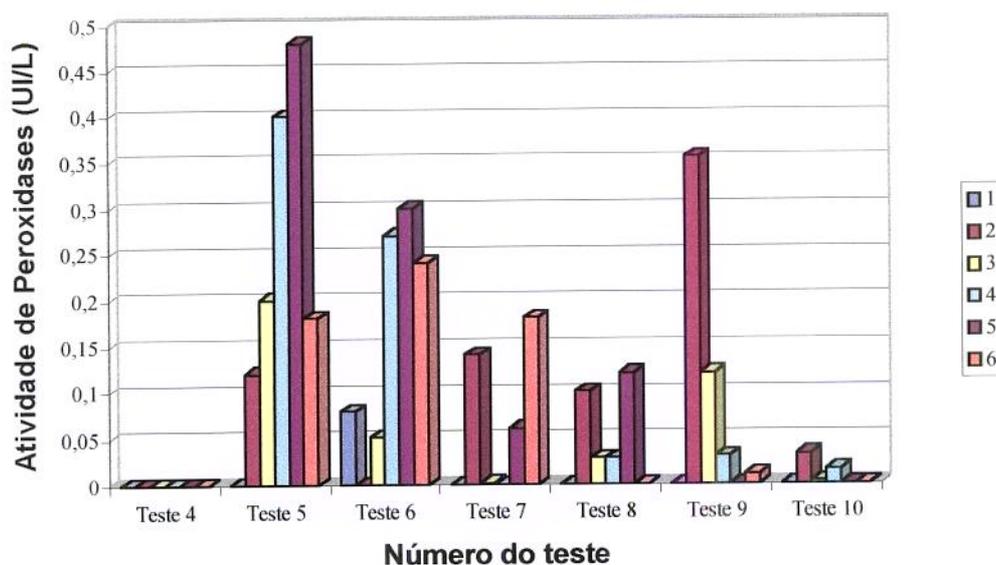


Figura 30. Atividade de peroxidase nos meios líquidos de crescimento do fungo linhagem 755.

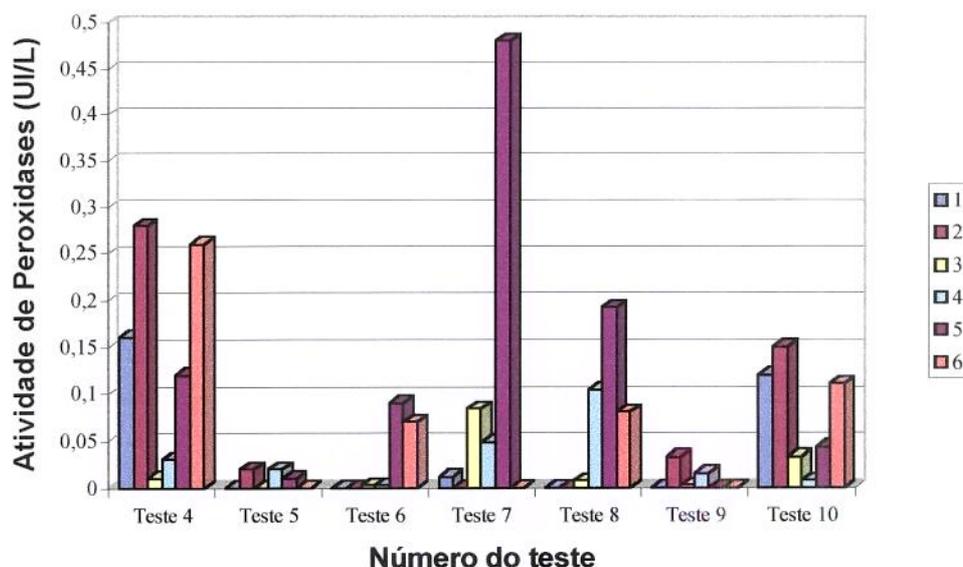


Figura 31. Atividade de peroxidase nos meios líquidos de crescimento do fungo linhagem 1051.

Como a lacase, a enzima peroxidase foi encontrada amplamente distribuída nos meios de cultura e para tentar explicar sua atividade sobre a síntese de vanilina seriam necessários novos experimentos, uma vez que não foram encontrados trabalhos na literatura que expliquem sua influência.

A determinação dessas enzimas ligninolíticas procurou estabelecer parâmetros para o entendimento das vias metabólicas e enzimas envolvidas na degradação do ácido ferúlico e do eugenol.

Dos resultados obtidos, pode-se abstrair que as enzimas ligninolíticas atuam de forma diferenciada e complexa, geralmente inibindo a produção de vanilina.

## 5. CONCLUSÕES

Durante o desenvolvimento dos experimentos deste trabalho algumas características dos fungos foram evidenciadas:

1) Os fungos que apresentaram melhores resultados de síntese de vanilina foram os fungos linhagem 755 (55,2 mg/L -teste 7) e linhagem 1051 (21,7 mg/L-teste 2).

2) A melhor combinação de substratos visando a síntese de vanilina foi o ácido ferúlico adicionado ao meio basal de sais minerais após o terceiro dia de crescimento, dissolvido em etanol ou NaOH, na presença de cisteína 0,1 %. A cisteína como agente redutor causou um acréscimo na concentração de vanilina obtido quando comparado aos testes sem a presença de cisteína, desde que não tenha sido utilizado o fator agitação.

3) A agitação foi o fator que mais influenciou a síntese de vanilina durante a realização dos experimentos. Quando comparados entre si, os testes com agitação apresentaram valores bem inferiores aos atingidos pelos testes similares sem agitação. A vanilina é oxidada naturalmente por uma enzima, a vanilina-oxidase, que aparece intracelularmente. Talvez por este motivo os valores de vanilina encontrados nos frascos agitados tenham sido muito inferiores. A agitação mecânica pode causar um rompimento dos micélios fúngicos, liberando as enzimas presentes para o meio de cultura.

4) Entre os dois substratos, o ácido ferúlico demonstrou ser o composto de escolha para o estudo da síntese de vanilina, inclusive sendo encontrado em um maior número de trabalhos na literatura. Quando o eugenol foi utilizado, o crescimento fúngico aparente foi pequeno, o que é perfeitamente explicado, uma vez que o eugenol é conhecido e utilizado como antimicrobiano em diversas situações.

5) Quanto maior o abaixamento do pH, maior o crescimento celular e isso parece ter sido preponderante para a obtenção de altos valores de vanilina.

6) Nos testes visando a determinação de enzimas ligninolíticas destacou-se o fato de que nenhuma enzima demonstrou ativar ou melhorar a síntese de vanilina nos fungos testados. As enzimas LiP, MnP e AVO parecem atuar negativamente pois, quando elas ocorreram a síntese foi prejudicada.

7) As concentrações de vanilina obtidas durante a realização dos experimentos não são suficientes para aplicação industrial. O fungo linhagem 755 é um fungo imperfeito e que possui características diferentes das apresentadas pelos fungos de degradação branca, mais conhecidos nos estudos de síntese de vanilina. Os valores de concentração de vanilina tornaram-se então muito importantes e sugerem a continuidade dos estudos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADEDEJI, J., HARTMAN, T.G. & CHI-TANG, H. Flavor characterization of different varieties of vanilla beans. Perfumer & Flavorist, vol. 18, pp. 25-33, 1993.
2. AHLUWALIA, B. & FRY, S.C. Barley endosperm cell walls contain a feruloylated arabinoxylan and non-feruloylated  $\beta$ -glucan. J. Cereal Sci. vol. 4, pp. 287, 1986
3. AKIN, D.E., HARTLEY, R.D., RIGSBY, L.L. & MORRISON III, W.H. Phenolic acids released from bermudagrass (*Cynodon dactylon*) by sequential sodium hydroxide treatment in relation to biodegradation of cell types. J. Sci. Food Agric. vol. 58, pp. 207-214, 1992.
4. ANDER, P., HATAKKA, A. & ERIKSSON, K-E. Vanillic acid metabolism by the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. Arch. Microbiol. vol. 125, pp. 189-202, 1980.
5. ANGELES De La TORRE, M. & GOMEZ-ALARCON, G. Ferulic acid anaerobic degradation by marsh sediment microorganisms. Microbios. vol. 68, pp. 119-127, 1991.
6. BETTS, W.B. & DART, R.K. Screening of fungi and bacteria for their ability to degrade insoluble, lignin-related aromatic compounds. Microbios. vol. 55, pp. 85-93, 1988.

7. BURRI, J., GRAFF, M., LAMBELET, P. & LÖLIGER, J. Vanillin: more than a flavouring agent - a potent antioxidant. J. Sci. Food Agric. vol. 48, pp. 49-56, 1989.
8. BUSWELL, J.A. & ERIKSSON, K-E. Effect of lignin-related phenols and their methylated derivatives on the growth of eight white-rot fungi. World J. Microbiol. Biotechnol. vol. 10, pp. 169-174, 1994.
9. BUSWELL, J.A., ERIKSSON, K-E., GUPTA, J.K., HAMP, S.G. & NORDH, I. Vanillic acid metabolism by selected soft-rot, brown-rot and white-rot fungi. Arch. Microbiol. vol. 131, pp. 366-374, 1982.
10. CAI, Y.J., BUSWELL, J.A. & CHANG, S.T. Effect of lignin-derived phenolic monomers on the growth of the edible mushrooms *Lentinus edodes*, *Pleurotus sajor-caju* and *Volvariella volvacea*. World J. Microbiol. Biotechnol. vol. 9, pp. 503-507, 1993.
11. CARTWRIGHT, N.J. & SMITH, A.R.W. Bacterial attack on phenolic ethers. An enzyme system demethylating vanillic acid. Biochem. J. vol. 102, pp. 826-841, 1967.
12. CHATONNET, P., DUBOURDIEU, D., BOIDRON, J.N. & PONS, M. The origin of ethylphenols in wines. J. Sci. Food. Agric. vol. 60, pp. 165-178, 1992.
13. CLARK, G.S. Vanillin. Perfum. Flavor. vol. 15, pp. 45-54, 1990.

14. CRAWFORD, D.L. & CRAWFORD, R.L. Microbial degradation of lignin. Enzyme Microb. Technol. vol. 2, pp. 11-22, 1980.
15. DUBE, H.C. Sub-division Deuteromycotina. In: An introduction to fungi. Vikas Publishing House PVT LTD, pp 394-396, Ravindra Offset, Delhi - 32, 1983.
16. EDLIN, D.A.N., NARBAD, A., DICKINSON, J.R. & LLOYD, D. The biotransformation of simple phenolic compounds by *Brettanomyces anomalus*. FEMS Microbiol. Lett. vol. 125, pp. 311-316, 1995.
17. ENOKI, A., YAJIMA, Y. & GOLD, M.H. Olefin saturation and acid reduction of 3,4-dimethoxycinnamic acid and derivatives by *Phanerochaete chrysosporium*. Phytochem. vol. 20, pp. 1543-1546, 1981.
18. FALCONNIER, B., LAPIERRE, C., LESAGE - MEESSEN, L., YONNET, G., BRUNERIE, P., COLONNA - CECCALDI, B., CORRIEU, G. & ASTHER, M. Vanillin as a product of ferulic acid biotransformation by the white - rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus* I-037: Identification of metabolic pathways. J. Biotechnol. vol. 37, pp. 123-132, 1994.
19. FOUCHE, J.G. & COUMANS, M. Vanilla: Pollination. American Orchid Society Bulletin. West Palm Beach, Florida The Society vol. 61(11), pp. 1118-1122, 1992.
20. FRIEND, J. Plant phenolics, lignification and plant disease. In: Progress in phytochemistry, vol 7 (Reinhold L, JB Harborne and

- T Swain, eds.), pp. 197-261, Pergamon Press, Oxford, UK, 1981.
21. FRY, S. C. Feruloylated pectins from the primary cell wall: their structure and possible functions. Planta, vol. 157, pp. 111-123, 1983.
22. GOLD, M.H., MAYFIELD, M.B., CHENG, T.M., KRISNANGKURA, K., SHIMADA, M., ENOKI, A. & GLENN, J.K. A *Phanerochaete chrysosporium* mutant defective in lignin degradation as well as several other secondary metabolic function. Arch. Microbiol. vol. 132, pp. 115-122, 1992.
23. GRAFF, E. Antioxidant potential of ferulic acid. Free Radical Biol. Med. vol.3, pp. 435-448, 1992.
24. GRBIC - GALIC, D. Fermentative and oxidative transformation of ferulate by a facultatively anaerobic bacterium isolated from sewage sludge. Appl. Environm. Microbiol. vol. 50 (4) , pp. 1052 - 1057, 1985.
25. GUILLÉN, F., MARTINEZ, A.T & MARTINEZ, M.J. Substrate specificity and properties of the aryl - alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. Eur. J. Biochem. vol. 209, pp. 603-611, 1992.
26. GUPTA, J.K., HAMP, S.G., BUSWELL, J.A. & ERIKSSON, K-E. Metabolism of trans-ferulic acid by the white - rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. Arch. Microbiol. vol. 128, pp. 349-354, 1981.

27. GURUJEYALAKSHMI, G. & MAHADEVAN, A. Dissimilation of ferulic acid by *Bacillus subtilis*. Curr. Microbiol. vol.16, pp. 69-73, 1987.
28. HAHN, D.H., FAUBION, J.M. & ROONEY, L.W. Sorghum phenolic acids, their high performance liquid chromatography separation and their relation to fungal resistance. Cereal Chem. vol. 60(4), pp. 255-259, 1983.
29. HARTLEY, R.D. & JONES, E.C. Diferulic acid as a component of cell walls of *Lolium multiflorum*. Phytochemistry . vol. 15, pp. 1157-1160, 1976.
30. HASHIKADO, Y., URASHIMA, M., YOSHIDA, T. & MIZUTANI, J. De-carboxylative conversion of hydroxycinnamic acids by *Klebsiella oxytoca* and *Erwinia uredovora*, epiphytic bacteria of *Polymnia sonchifolia* leaf, possibly associated with formation of microflora on the damaged leaves. Biosci. Biotech. Biochem. vol. 57, pp. 215 -219, 1993.
31. HIGUCHI, T. Lignin structure and morphological distribution in plant cell wall. In: Kirk, T.K., Higushi, T., Chang, H.M. (eds) Lignin biodegradation: microbiology, chemistry and potential applications, vol 1, New York, CRC Press, pp 1-19, 1980.
32. HOOP, R. Some highlights of H&R research. A review of nearly 120 years of research at Harmann & Reimer. In Recent developments in flavor and fragrance chemistry. New York. VCH, 1993.

33. HUANG, Z., DOSTAL, L. & ROSAZZA, J.P.N. Mechanisms of ferulic acid conversions to vanillic acid and guaiacol by *Rhodotorula rubra*. J. Biol. Chem. vol. 268(32), pp. 23954-23958, 1993.
34. ISHIKAWA, H., SCHUBERT, W.J. & NORD, F.F. Investigations on lignins and lignification. XXVII. The enzymatic degradation of soft-wood lignin by white-rot fungi. Arch. Biochem. Bioanal. vol.100, pp. 131-139, 1963.
35. KAHAN, S., BROWN, S.M., FILANDRO, A., KRUEGER, D.A., LALLY, N.E., McDONALD, M.W., SCHOEN, K.L. & SCHWARTZ, H. Liquid chromatographic method for determination of vanillin and related flavor compounds in vanilla extract: Colaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem. vol. 72(4), pp. 614-618, 1989.
36. KATO, Y. & NEVINS, D.J. Isolation and identification of *O*-(5-*O*-feruloyl- $\alpha$ -L - arabinofuranosyl) - (1 $\rightarrow$ 3)-*O*- $\beta$ -D-xylanopiranosyl-(1 $\rightarrow$ 4) D-xylanopiranosose as a component of *Zea* shoot cell - walls. Carbohydr. Res. vol. 137, p. 139, 1985.
37. KERMASHA, S., GOETGHEBEUR, M. & DUMONT, J. Determination of phenolic compound profiles in maple products by high-performance liquid chromatography. J. Agric. Food Chem. vol. 43, pp. 708 -716., 1995.
38. KUWAHARA, M., GLENN, J.K., MORGAN, M.A. & GOLD, M.H. Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. Febs Lett. vol. 169, pp. 247-250, 1984.

39. LAMPRECHT, G., PICHLMAYER, F. & SCHMID, E.R. Determination of the authenticity of vanilla extracts by stable isotope ratio analysis and component analysis by HPLC. J. Agric. Food Chem. vol. 42, pp. 1722-1727, 1994.
40. LEHTONEN, M. High performance liquid chromatographic determination of nonvolatile phenolic compounds in matured distilled alcoholic beverages. J. Assoc. Off. Anal. Chem. vol. 66(1), pp. 71-78, 1983.
41. LESAGE-MEESSEN, L., DELATTRE, M., HAON, M., THIBAUT, J-F., CECCALDI, B.C., BRUNERIE, P. & ASTHER, M. A two-step bioconversion process for vanillin production from ferulic acid combining *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*. J. Biotechnol. vol. 50, pp. 107-113, 1996.
42. MARKWALDER, H.U. & NEUKOM, H. Diferulic acid as a possible crosslink in hemicelluloses from wheat germ. Phytochem. vol. 15, pp. 836-837, 1976.
43. MARZULLO, L., CANNIO, R., GIARDINA, P., SANTINI, M.T., & SANNIA, G. Veratryl alcohol oxidase from *Pleurotus ostreatus* participates in lignin biodegradation and prevents polymerization of laccase - oxidized substrates. J. Biol. Chem. vol. 270(8), pp. 3823-3827, 1995.

44. MATHIAS, A.L., LOPRETTI, M.I. & RODRIGUES, A.E. Chemical and biological oxidation of *Pinus pinaster* lignin for the production of vanillin. J. Chem. Tech. Biotechnol. vol. 64, pp. 225-234, 1995.
45. MEENA, M.R. & SETHI, V. Antimicrobial activity of essential oils from spices. J. Food Sci. Technol. vol. 31(1), pp. 68-70, 1994.
46. MILLIS, C.D., CAI, D., STANKOVICH, M.T., & TIEN, M. Oxidation-reduction potentials and ionization states of extracellular peroxidases from the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Biochem. vol. 28, pp. 8484-8489, 1989.
47. MUELLER-HARVEY, I., HARTLEY, R.D., HARRIS, P.J. & CURZON, E.H. Linkage of *p*-coumaroyl and feruloyl groups to cell-wall polysaccharides of barley straw. Carbohydr. Res. vol. 148, pp. 71-85, 1986.
48. NAIM, M., STRIEM, B.J., KANNER, J. & PELEG, H. Potential of ferulic acid as a precursor to off-flavors in stored orange juice. J. Food Sci. vol. 53(2), pp. 500-503, 1988.
49. NAZARETH, S. & MARVINKURVE, S. Degradation of ferulic acid via 4-vinylguaiacol by *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. Can. J. Microbiol. vol. 32, pp. 494-497, 1986.
50. NERGIZ, C. & ÜNAL, K. Determination of phenolic acids in virgin olive oil. Food Chem. vol. 39, pp. 237-240, 1991.
51. NISHIDA, A. & FUKUZUMI, T. Formation of coniferyl alcohol from ferulic acid by the white-rot fungus *Trametes*. Phytochem. vol. 17, pp. 417-419, 1978.

52. ÖTÜK, G. Degradation of ferulic acid by *Escherichia coli*. J. Ferment. Technol. vol. 63(6), pp. 501-506, 1985.
53. PELEG, H., NAIM, M., ZEHAVI, U., ROUSEFF, R.L. & NAGY, S. Pathways of 4-vinylguaiacol formation from ferulic acid in model solutions of orange juice. J. Agric. Food Chem. vol. 40, pp. 764-767, 1992.
54. PERESTELO, F., FALCÓN, M.A. & DE LA FUENTE, G. Production of vanillic acid from vanillin by resting cells of *Serratia marcescens*. Appl. Environm. Microbiol. vol. 55(6), pp. 1660-1662, 1989.
55. RAHOUTI, M., SEIGLE-MURANDI, F., STEIMAN, R. & ERIKSSON, K-E. Metabolism of ferulic acid by *Paecilomyces variotii* and *Pestalotia palmarum*. Appl. Environm. Microbiol. vol. 55(9), pp. 2391-2398, 1989.
56. REGNAULT-ROGER, C., HADIDANE, R., BIARD, J-F., & BOUKEF, K. High performance liquid and thin layer chromatographic determination of phenolic acids in palm (*Phoenix dactilifera*) products. Food Chem. vol. 25, pp. 61-71, 1987.
57. RILEY, K.A. & KLEYN, D.H. Fundamental principles of vanilla / vanilla extract processing and methods of detecting adulteration in vanilla extracts. Food Technol. vol. 43, pp. 64-77, 1989.
58. ROMBOUTS, F.M. & THIBAUT, J-F. Feruloylated pectic substances from sugar - beet pulp. Carbohydr. Res. vol. 154, pp. 177 - 187, 1986.

59. ROSAZZA, J.P.N. Biocatalysis, microbiology, and chemistry: The power of positive linking. ASM news. vol. 61(5), pp. 241 - 245, 1995.
60. ROSAZZA, J. P. N., HUANG, Z., DOSTAL, L., VOLM, T., & ROUSSEAU, B. Review: Biocatalytic transformations of ferulic acid: an abundant aromatic natural product. J. Indust. Microbiol. vol. 15, pp. 457-471, 1995.
61. SCALBERT, A., MONTIES, B., LALLEMAND, J-Y. & GUITET, E. Ether linkage between phenolic acid and lignin fractions from wheat straw. Phytochem. vol. 24, p. 1359, 1985.
62. SMITH, M.M. & HARTLEY, R.D. Occurrence and nature of ferulic acid substitution of cell - wall polysaccharides in graminaceous plants. Carbohydr. Res. vol. 118, pp. 65-80, 1983.
63. SOSULSKI, F., KRYGIER, K. & HOGGE, L. Free esterified and insoluble - bound phenolic acids. 3. Composition of phenolic acids in cereal and potato flours. J. Agric. Food Chem. vol. 30, p. 337, 1982.
64. SUTHERLAND, J.B., CRAWFORD, D.L. & POMETTO III, A.L. Metabolism of cinnamic, *p*-coumaric, and ferulic acids by *Streptomyces setonii*. Can. J. Microbiol. vol. 29, pp. 1253-1257, 1983.
65. SZKLARZ, G.D., ANTIBUS, R.K., SINSABAUGH, R.L. & LINKINS, A.E. Production of phenol - oxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. Mycol. vol. 81, pp. 234-240, 1989.

66. TADASA, K. Degradation of eugenol by a microorganism. Agric. Biol. Chem. vol. 41, pp. 925-929, 1977.
67. TADASA, K. & KAYANARA, H. Initial steps in eugenol degradation pathway of a microorganism. Agric. Biol. Chem. vol. 47, pp. 2639-2640, 1983.
68. TIEN, M. & KIRK, T.K. Proceedings of the National Academy of Science USA . vol. 81, pp. 2280-2284, 1984.
69. TILLET, R., & WALKER, R. L. Metabolism of ferulic acid by a *Penicillium* sp. Arch. Microbiol. vol. 154, pp. 206-208, 1990.
70. TOMS, A. & WOOD, J.M. The degradation of trans-ferulic acid by *Pseudomonas acidovorans*. Biochem. vol. 9(2), pp. 337-343, 1970.
71. TURNER, J.A. & RICE, E.L. Microbial decomposition of ferulic acid in soil. J. Chem. Ecol. vol. 1, pp. 41-58, 1975.
72. VAZQUEZ - DUHALT, R., WESTLAKE, D.W.S. & FEDORAK, P.M. Lignin peroxidase oxidation of aromatic compounds in systems containing organic solvents. Appl. Environm. Microbiol. vol. 60(2), pp. 459-466, 1994.
73. WEBSTER, T. M. New perspectives on vanilla. Cereal Foods World vol. 40(4), pp. 198-200, 1995.

74. WESTCOTT, R.J., CHEETHAM, P.S.J. & BARRACLOUGH, A.J.  
Use of organized viable vanilla plant aerial roots for the  
production of natural vanillin. Phytochem. vol. 35, pp. 135-136,  
1994.