

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE METILCETONAS
POR LINHAGEM DE *ASPERGILLUS* sp.

Joaquim Gilberto de Oliveira

Farmacêutico

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore

Orientadora

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por JOAQUIM GILBERTO DE OLIVEIRA aprovada pela Comissão Julgadora em 17 de fevereiro de 1998.

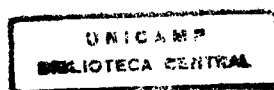
Campinas, 17 de fevereiro de 1998.



**Profa. Dra. GLÁUCIA MARIA
PASTORE**
Presidente da Banca

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

1998



0805550

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	OL4p
V.	
TOMADO	33450
PROG	395/98
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	14/04/98
N.º CPD	

CM-00108991-7

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

OL4p

Oliveira, Joaquim Gilberto de

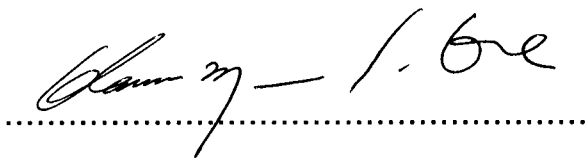
Produção biotecnológica de metilcetonas por linhagem de
Aspergillus sp. / Joaquim Gilberto de Oliveira. – Campinas, SP:
[s.n.], 1998.

Orientador: Gláucia Maria Pastore

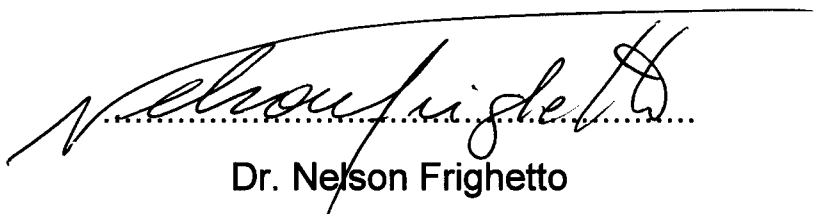
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

aspergillus
1.Aroma. 2.Aspergillus sp. 3.Lipase. I.Pastore, Gláucia Maria.
II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de
Alimentos. III.Título.

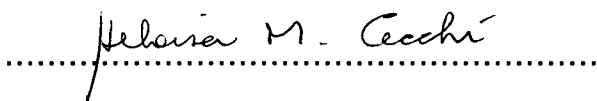
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
(Orientadora)



Dr. Nelson Frighetto
(Membro)



Profa. Dra. Heloísa Máscia Cecchi
(Membro)

.....

Profa. Dra. Hilary Castle de Menezes
(Suplente)

O pastor amoroso

Fernando Pessoa

Quando eu não te tinha
Amava a natureza como um monge calmo a Cristo
Agora amo a natureza
Como um monge calmo à Virgem Maria,
Religiosamente, a meu modo, como dante,
Mas de outra maneira mais comovida e próxima...
Vejo melhor os rios quando vou contigo
Pelos campos até à beira dos rios;
Sentado a teu lado reparando nas nuvens
Reparo nelas melhor -
Tu não me tiraste a natureza...
Tu mudaste a natureza...
Trouxeste-me a natureza para o pé de mim,
Por tu existires vejo-a melhor, mas a mesma,
Por tu me amares, amo-a do mesmo modo, mas mais,
Por tu me escolheres para te ter e te amar,
Os meus olhos fitaram-na mais demoradamente
Sobre todas as coisas.
Não me arrependo do que fui outrora
Porque ainda o sou.

À Cristina,

Aos meus filhos Ana Carolina, Guilherme e Patrícia,
tesouro inestimável na minha vida,

à minha mãe Irene e meu pai José, pela dedicação e carinho,
ao meu irmão André
dedico.

SEGUE o teu destino,
Rega tuas plantas,
Ama as tuas rosas.
O resto é a sombra
De árvores alheias.

Ricardo Reis
(1-7-1916)

AGRADECIMENTOS

À professora Gláucia Maria Pastore pela orientação e amizade.

Ao Nelson Frighetto pela oportunidade e pela ajuda sempre presente.

Aos amigos Paulinho e Sinésio pela amizade sincera.

Aos amigos Roberto, Robertinho e Benito pelo incentivo e amizade constantes.

À Vera, Adilson, André e todos mais do CPQBA que me auxiliaram durante a realização desse trabalho.

À Dora , Danielle e à Roseli Muniz pela amizade.

Aos amigos do laboratório de Bioquímica pelo incentivo e auxílio.

À Margarete Randi Moraes e todos da secretaria de pós graduação, pela ajuda constante.

Aos professores e funcionários da Faculdade de Engenharia de Alimentos pelo apoio recebido.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DAS TABELAS..... v

ÍNDICE DAS FIGURAS..... vi

RESUMO x

SUMMARY..... xi

1. INTRODUÇÃO 1

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 11

3. MATERIAIS E MÉTODOS 32

3.1. Material

3.1.1. Reagentes e Materiais Específicos 32

3.1.2. Equipamentos 33

3.2. Métodos 34

3.2.1. Produção de suspensão de esporos..... 34

3.2.2. Produção da Lipase 34

3.2.2.1. Produção da Suspensão Enzimática bruta 34

3.2.2.2. Produção da Suspensão Enzimática bruta liofilizada . 35

3.2.2.3. Produção da Suspensão Enzimática bruta livre de es-
poros..... 35

3.2.3. Determinação da Atividade Lipolítica	35
3.2.4. Caracterização dos Principais Ácidos Graxos presentes substratos	36
3.2.5. Produção das Metilcetonas	37
3.2.6. Extração das Metilcetonas	38
3.2.7. Identificação das Metilcetonas	38
3.2.7.1. Cromatografia Gasosa acoplada a Detetor Seletivo de Massas.....	38
3.2.7.2. Índice de Retenção das Metilcetonas	39
3.2.8. Análise Quantitativa por Cromatografia Gasosa	40
3.2.9. Efeito do Substrato na Produção de Metilcetonas	40
3.2.10. Efeito da concentração do substrato creme de leite de cabra na produção de Metilcetonas	41
3.2.11. Efeito do pH na produção de Metilcetonas.....	41
3.2.12. Efeito da Temperatura na produção de Metilcetonas..	41
3.2.13. Efeito do Tempo de incubação na produção de Metilce- tonas	42
3.2.14. Importância da presença de esporos na produção de metilcetonas.....	42
3.2.15. Efeito da concentração de esporos na produção de metilcetonas.....	43
 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	 44
4.1. Determinação da atividade Lipolítica de suspensões enzimá- ticas em relação a diferentes substratos.....	44
4.2. Identificação por GC/MS dos principais ácidos graxos presen-	

tes nos substratos utilizados na produção de metilcetonas	47
4.2.1. Creme de Leite de Cabra	47
4.2.2. Creme de Leite de Vaca	48
4.3. Extração das Metilcetonas	50
4.4. Identificação das principais Metilcetonas produzidas	53
4.4.1. Identificação por GC/MS	53
4.4.2. Identificação por Índice de Retenção	61
4.5. Efeito do tipo de substrato na produção de Metilcetonas	62
4.5.1. Utilização do substrato Creme de Leite de Cabra	62
4.5.2. Utilização do substrato Creme de Leite de Vaca	64
4.6. Efeito da concentração do substrato creme de leite de cabra na produção de 2-nonanona	66
4.7. Efeito do pH na produção de metilcetonas	69
4.7.1. Substrato Creme de Leite de Vaca	69
4.7.2. Substrato Creme de Leite de Cabra	70
4.8. Efeito da Temperatura na produção de Metilcetonas	72
4.8.1. Substrato Creme de Leite de Vaca	72
4.8.2. Substrato Creme de Leite de Cabra	73
4.9. Efeito do Tempo de Incubação na produção de metilceto- nas	75
4.10. Efeito da Presença de Esporos na produção de metil- cetonas	76
4.10.1. Produção de Metilcetonas por Suspensão Enzimática livre de Esporos	76
4.10.2. Efeito da concentração de Esporos na produção de metilcetonas	78

4.11. Suspensão Enzimática Bruta contra Suspensão Enzimática Liofilizada 80

4.11.1. Substrato Creme de Leite de Cabra..... 81

4.11.2. Substrato Creme de Leite de Vaca 82

5. CONCLUSÕES 84

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 86

ÍNDICE DAS TABELAS

Tabela 1
Atividade lipolítica das suspensões enzimáticas estudadas
frente à vários substratos 45

Tabela 2
Principais ácidos graxos presentes em creme de leite de
cabra 47

Tabela 3
Principais ácidos graxos presentes em creme de leite de
vaca..... 48

Tabela 4
Eficiência de recuperação de metilcetonas por extração
sólido/líquido..... 51

Tabela 5
Índice de retenção das metilcetonas estudadas 61

Tabela 6
Efeito do tempo de incubação na produção de metilceto-
nas 75

ÍNDICE DAS FIGURAS

Figura 1
Cromatograma de meio de produção de metilcetonas
a partir de creme de leite de cabra 54

Figura 2
Espectro de massas de 2-Pentanona de amostra obtida
a partir de creme de leite de cabra 55

Figura 3
Espectro de massas de 2-Heptanona de amostra obtida
a partir de creme de leite de cabra 56

Figura 4
Espectro de massas de 2-Nonanona de amostra obtida
a partir de creme de leite de cabra 57

Figura 5
Espectro de massas de 2-Undecanona de amostra obtida
a partir de creme de leite de cabra 58

Figura 6
Espectro de massas de 2-Pentanona padrão 59

Figura 7

Espectro de massas de 2-Heptanona padrão..... 59

Figura 8

Espectro de massas de 2-Nonanona padrão..... 60

Figura 9

Espectro de massas de 2-Undecanona padrão..... 60

Figura 10

Principais metilcetonas produzidas utilizando-se creme de leite de cabra 63

Figura 11

Principais metilcetonas produzidas utilizando-se creme de leite de vaca 64

Figura 12

Efeito da concentração de creme de leite de cabra na produção de 2-Nonanona 67

Figura 13

Rendimento líquido de 2-Nonanona em diferentes concentrações de creme de leite de cabra..... 68

Figura 14

Efeito do pH na produção de metilcetonas em creme de leite de vaca 69

Figura 15

Efeito do pH na produção de metilcetonas em creme de leite de cabra 70

Figura 16

Efeito da temperatura na produção de metilcetonas em creme de leite de vaca 72

Figura 17

Efeito da temperatura na produção de metilcetonas em creme de leite de cabra 73

Figura 18

Produto de biocatálise de creme de leite de cabra com suspensão enzimática livre de esporos 77

Figura 19

Efeito da concentração de esporos na produção de metilcetonas 78

Figura 20

Comparação entre suspensão enzimática bruta e

suspensão enzimática bruta liofilizada na produção de
2-nonanona em substrato creme de leite de cabra 81

Figura 21

Comparação entre suspensão enzimática bruta e sus-
pensão enzimática bruta liofilizada na produção de
2-nonanona 82

RESUMO

Foram estudados alguns parâmetros de processo para a produção de metilcetonas por uma nova linhagem de *Aspergillus sp.* pré selecionada como produtora de lipase extracelular, ainda não relatada na literatura.

Através da utilização da técnica de cromatografia gasosa acoplada a detetor seletivo de massas e de cálculo de índice de retenção, foram identificadas as quatro principais metilcetonas produzidas que são: 2-pentanona, 2-heptanona, 2-nonanona e 2-undecanona.

As maiores concentrações de metilcetonas (2-pentanona, 2-heptanona, 2-nonanona e 2-undecanona) encontradas quando foi utilizado creme de leite de cabra foram: 0.5, 1.4, 2.4 e 0.4 mg / g de substrato respectivamente e de 0.3, 0.8, 1.04 e 0.22 mg / g de substrato quando se utilizou creme de leite de vaca.

Creme de leite de cabra e creme de leite de vaca foram os dois substratos adequados para a produção das metilcetonas, devido a sua composição de ácidos graxos, sendo que, a maior concentração de ácidos graxos de cadeia média esteve presente no creme de leite de cabra e portanto foi obtido uma maior concentração de metilcetonas quando se utilizou este substrato.

Foi observado que as melhores condições para produção de metilcetonas foram : período de incubação de 96 horas a 30°C, pH 4,5 e sistema de reação contendo uma mistura de lipase e esporos da linhagem nº 1099.

Uma suspensão de lipase isenta de esporos foi incapaz de produzir metilcetonas.

SUMMARY

A newly strain of *Aspergillus sp.* which produced extracellular lipase was chosen to study some of the process parameters for the production of methyl ketones.

Four methyl ketones (2-pentanone, 2-heptanone, 2-nonanone and 2-undecanone) were identified from their retention indices and using a gas chromatograph equipped with a mass detector.

Of the two substrates used (goat's milk cream and cow's milk cream) the best results were obtained with in the goat's milk cream. The reason for this behaviour could be differences in the fatty acid composition of the two substrates.

The high concentrations of methyl ketones (2-pentanone, 2-heptanone, 2-nonanone and 2-undecanone) observed were: 0.5, 1.4, 2.4 e 0.4 mg/g respectively, when goat's milk cream was used as substrate. When cow's milk cream was used, the concentrations of methyl ketones were: 0.3, 0.8, 1.04 e 0.22 mg / g respectively.

The results suggest good conditions to produce methyl ketones in 96 hours of incubation at 30°C, pH 4,5 and a reaction system with a mixture of lipase and spores of strain n° 1099.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de aromatizantes remonta aos primórdios da humanidade. O homem percebeu que poderia melhorar o sabor de sua dieta se empregasse uma série de produtos de origem vegetal, tais como, raízes, folhas, ervas, etc.

No início eram utilizados somente aromas oriundos de fontes naturais, como as especiarias, que por muito tempo foi determinante de domínio político e econômico pelos portugueses.

Com o advento da Revolução Industrial uma centena de substâncias sintéticas foram introduzidas na alimentação humana para substituir os antigos aromas naturais, com a vantagem de serem mais baratas, de padronização mais fácil, por estarem disponíveis em todas as épocas do ano, etc.

Atualmente apesar de um visível crescimento na demanda de substâncias aromáticas, nota-se também um aumento na preferência do consumidor por alimentos sem aditivos químicos sintéticos, tornando-se cada vez maior a necessidade de se obter aromas de fontes naturais. Um grande obstáculo para o desenvolvimento da produção industrial destes aromas, é a baixa concentração com que esses compostos voláteis são encontrados em suas fontes, bem como, os processos de extração, pois muitas vezes estes são complexos e inviáveis economicamente.

Entretanto, com o crescente desenvolvimento da Biotecnologia, as indústrias mundiais de aromas voltaram suas pesquisas para o desenvolvimento de métodos biotecnológicos para a produção desses aromas naturais, através de cultura de células, cultura de tecidos, microrganismos e enzimas. Até o presente momento o processo microbiológico tem se mostrado o mais promissor para a produção de compostos puros ou misturas complexas de substâncias.

O aroma de queijo sempre foi utilizado na indústria de alimentos em formulações à base de compostos artificiais, devido principalmente ao fato de que no próprio queijo esse aroma se encontra em concentrações tão pequenas que sempre inviabilizaram sua produção por extração. No entanto nos últimos anos com a crescente preocupação com relação a presença de aditivos sintéticos a substituição do aroma artificial de queijo pelo natural vem se tornando cada vez mais necessária.

“Blue Cheese”, é uma classe importante de queijos cujo processo de maturação se dá pela adição de um fungo à massa do queijo fresco. Esse processo de maturação faz com que esse tipo de queijo possua um aroma bastante intenso e característico.

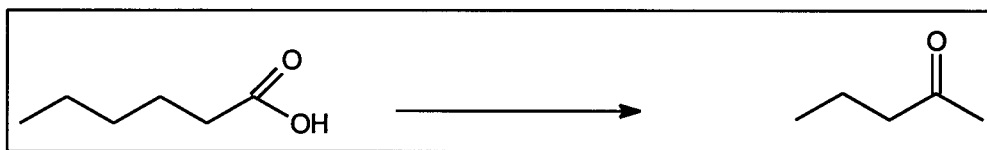
Diversos microrganismos podem ser adicionados no processo de maturação. O mais comumente usado é o *Penicillium roqueforti*, que, quando adicionado ao queijo produzido com leite de ovelhas, e curado nas cavernas de Roquefort ,na França, produz o queijo roqueforti , e

que quando adicionado ao queijo produzido com leite de vaca produz o conhecido gorgonzola. Outras espécies podem ser usadas na produção de outros tipos de queijos, como exemplo, o *Penicillium camemberti* e o *Penicillium candidum* na produção do queijo camemberti.

Durante o processo de maturação desse tipo de queijo, algumas modificações importantes ocorrem com os substratos presentes, principalmente os lipídeos, as proteínas e os aminoácidos. As metilcetonas são as principais substâncias responsáveis pelo aroma tão característico desses queijos.

1.1. A biossíntese do aroma de "Blue Cheese"

A produção de um aroma de qualidade depende sem dúvida nenhuma do metabolismo dos lipídeos do queijo. As metilcetonas, substâncias mais importantes no aroma de "Blue Cheese", são produtos da β -oxidação parcial dos ácidos graxos durante o metabolismo dos lipídeos:



Outras classes de substâncias voláteis desempenham papel importante no desenvolvimento do aroma, dentre as quais podemos citar os ácidos graxos, álcoois, ésteres, lactonas, aldeídos, cetonas, aminas, compostos de enxofre, etc.

1.2. Principais classes de compostos responsáveis pelo aroma de "Blue Cheese"

1.2.1. Ácidos graxos

A presença de Ácidos Graxos Livres não é somente importante pela sua contribuição para o aroma, mas também pelo fato deles serem precursores biossintéticos das metilcetonas, álcoois, lactonas e ésteres. Os triglicerídeos presentes na gordura do leite são transformados em diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos livres e glicerol por ação de uma série de lipases ou glicerol éster hidrolase, presentes no meio. Alguma atividade lipolítica se deve a presença, nos queijos, de lipases nativas do leite, no entanto, a maior parte da lipólise se dá pela ação das enzimas produzidas pelo microrganismo adicionado na maturação

Os ácidos graxos estão presentes nos queijos comerciais em concentrações que variam entre 600 a 822 mg/100 g de queijo com uma grande variação entre algumas amostras.

1.2.2. Metilcetonas

As metilcetonas são os compostos mais importantes no aroma de "Blue Cheese", estando presentes na ordem de 136 mg/100 g de queijo. As maiores concentrações de 2-heptanona e 2-nonanona são: 52 $\mu\text{mol}/10\text{ g}$ e 40,9 $\mu\text{mol}/10\text{ g}$ de queijo respectivamente.

Essas substâncias são sintetizadas a partir dos ácidos graxos liberados no meio, pela ação das lipases. Esses ácidos graxos livres, principalmente os de cadeia curta, são relativamente tóxicos aos microrganismos presentes na maturação. Provavelmente para uma rápida degradação desses ácidos graxos, os mesmos são transformados em metilcetonas, que são muito menos tóxicas, numa rota alternativa da β -oxidação .

Com a utilização de ácidos graxos marcados com radioisótopos demonstra-se que as metilcetonas presentes são verdadeiramente originadas dos ácidos graxos (DARTEY & KINSELLA 1973a). No entanto observa-se que as metilcetonas apresentam sempre um átomo de carbono a menos que o ácido graxo original. Sugeriu-se então que essas metilcetonas são produzidas por descarboxilação dos β -cetoácidos. Durante a β -oxidação os β -cetoacil-CoA formados pela desidrogenação dos β -hidroxi-acyl-CoA são deacilados para β -cetoácidos e CoA por uma β -cetoacil-CoA Deacilase ou Tioidrolase. Os β -cetoácidos são então rapidamente descarboxilados para as metilcetonas, que assim possuem um átomo de carbono a menos pela ação de uma enzima descarboxilase.

Nos microrganismos produtores de metilcetonas a atividade da β -cetoacil-CoA Deacilase é muito maior que a da tiolase e aparentemente a descarboxilase causa rápida descarboxilação para a formação das metilcetonas evitando um acúmulo dos β -cetoácidos.

Alguns estudos indicam que β -ceto-octanoil-CoA é o substrato preferido para a reação de desacilação e que β -cetolaurato é preferido pela enzima descarboxilase. Entretanto, outras metilcetonas de variados tamanhos de cadeia carbônica podem ser formadas. Alguns estudos mostram a formação de várias metilcetonas na presença de ácidos graxos de cadeia longa, o que sugere a possibilidade de ocorrerem vários ciclos de β -oxidação do mesmo ácido graxo para a produção dessas metilcetonas. Têm sido identificadas algumas outras cetonas nesse tipo de aroma, como por exemplo 2-butanona, oct-3-ona, oct-1-en-3-ona.

1.2.3. Álcoois

Os álcoois, juntamente com as metilcetonas, são componentes fundamentais no aroma. O metabolismo da lactose leva à formação de etanol através da via pentose fosfato e de outros álcoois, como por exemplo o butan-2,3-diol.

Os álcoois secundários derivam de uma redução das metilcetonas correspondentes pela ação de uma redutase.

Outros álcoois podem ser obtidos através do metabolismo dos aminoácidos ou da degradação de aldeídos que são derivados da Degradação de Strecker por via não enzimática. Por desaminação

oxidativa, aminoácidos podem ser transformados em cetoácidos e então a aldeídos que são reduzidos a álcoois.

Os ácidos linoleico e linolênico são precursores de alguns álcoois com 8 átomos de carbono, particularmente oct-1-en-3-ol, oct-2-en-1-ol, octa-1,5-dien-3-ol e octa-1,5-dien-1-ol. As principais enzimas envolvidas na biossíntese desses álcoois são a lipoxigenase e a hidroperóxido liase.

1.2.4. Lactonas

As principais lactonas encontradas são γ -decalactona, δ -decalactona, γ -dodecalactona, δ -dodecalactona e todas possuem uma nota pronunciada de fruta.

A ação dos microrganismos na produção das lactonas não está totalmente elucidada. Os precursores das lactonas são os hidroxiácidos que podem ser obtidos via β -oxidação dos ácidos graxos insaturados pela ação das lipoxigenases ou hidratases. Alguns hidroxiácidos, no entanto, podem estar presentes na forma de triglicerídeos no leite. Ocorre então a lipólise e posterior ciclização.

1.2.5. Ésteres

Uma variedade grande de ésteres podem estar presentes no aroma de “Blue Cheese” devido a diversidade das suas origens metabólicas. A maior parte deles no entanto, se originam de reações que ocorrem entre álcoois e ácidos presentes no próprio queijo.

Acetato e propanoato de feniletila, cinamato de metila, hexanoato de metila, pentanoato de etila, entre outros, podem ser encontrados. Reações de esterificação entre ácidos graxos de cadeia curta ou média e álcoois (etanol), derivados do metabolismo da lactose e de aminoácidos, são as vias de obtenção da maioria dos ésteres encontrados. Ésteres de acetato podem ser obtidos a partir de álcoois e acetil-coenzima A.

1.2.6. Aldeídos

Os principais aldeídos encontrados são : hexanal, Acetaldeído, 3-metilbutanal, benzaldeído etc. Eles têm sua origem na degradação de Strecker dos aminoácidos durante o processo de maturação. Esses passos não requerem catálise enzimática. Os aldeídos são compostos transitórios nos queijos pois são rapidamente metabolizados para os álcoois ou ácidos correspondentes.

1.2.7. Outros Compostos

Uma série de compostos minoritários estão presentes em quantidades “traços” no aroma de “Blue Cheese”. Dentre eles podemos citar os compostos derivados de enxofre, tais como: 2,4-ditiopentano, dissulfeto de dietila, 2,4,5-tritiohexano, etc. Esses compostos se originam essencialmente do metabolismo da metionina, que através da enzima metionina demetilase quebra a ligação carbono-enxofre da molécula do aminoácido.

Algumas aminas voláteis também podem ser encontradas nos queijos maturados. Dimetilamina é encontrada na concentração de 0,811 a 1,623 ppm por exemplo.

1.3. Histórico

Foram isoladas no laboratório de Bioquímica (COSTA, M. C. 1996) duas linhagens de *Aspergillus sp.* nº 1099 e 1068.

Durante os ensaios de caracterização bioquímica das lipases produzidas por essas duas linhagens, verificou-se que em ambos os casos havia juntamente com a formação dos produtos de hidrólise dos triglicerídeos testados, o aparecimento de um aroma que lembrava queijo gorgonzola.

Numa primeira análise por GC/MS percebeu-se que essas duas linhagens também eram capazes de produzir metilcetonas, as principais responsáveis pelo aroma dos queijos maturados na presença de fungos.

A lipase produzida pela linhagem nº 1099 mostrou uma alta especificidade para ácidos graxos de cadeia média (ác. Capróico, ácido Caprílico e ácido Cáprico).

O presente trabalho teve então o objetivo de estudar a capacidade da linhagem nº 1099 de produzir essas metilcetonas e as condições de produção visando o desenvolvimento de um processo biotecnológico para a produção de aroma natural de “Blue Cheese” em trabalho futuro.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

PATTON (1950) descreveu a extração dos compostos voláteis por arraste de vapor de amostra de queijo tipo "Blue Cheese" durante pelo menos 1 hora. O destilado foi extraído continuamente com éter etílico previamente destilado e livre de compostos carbonílicos. O extrato foi seco e o solvente evaporado. O resíduo obtido foi então destilado em coluna de fracionamento. As frações obtidas foram analisadas medindo-se o índice de refração, faixa de ebulição e derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina e semicarbazida. Os compostos identificados foram acetona, 2-pentanona, 2-heptanona e 2-nonanona, que foram relacionados ao aroma dos queijos tipo "Blue Cheese".

JACKSON & HUSSONG (1958) relataram a hidrodestilação de amostras de "Danish Blue Cheese" com posterior saturação do destilado aquoso com cloreto de sódio e extração com dietil éter livre de peróxidos. O solvente foi então evaporado suavemente na presença de sulfato de cálcio. O concentrado obtido foi destilado sob vácuo à temperatura máxima de 35°C utilizando-se um "trap" de gelo seco e acetona para condensar os compostos voláteis. Foram identificados através de cromatografia gasosa os seguintes compostos: 2-pentanona, 2-heptanona, 2-nonanona, 2-pentanol, 2-heptanol e 2-nonanol. Foi então sugerido que esses álcoois secundários seriam originados de redução enzimática das metilcetonas formadas durante a maturação dos queijos. Foi testada a bioconversão de ácido caprílico, 2-heptanona e 2-heptanol na presença de micélio de *P. roqueforti* isolado do queijo

em estudo. Descobriu-se que após 4 horas de incubação a 30°C e pH 6,8 2-heptanona rende a formação de 2-heptanol, ácido caprílico a formação de 2-heptanona e 2-heptanol leva a formação de 2-heptanona através de um processo de oxidação enzimática.

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

ANDERSON & DAY (1965a) descreveram a análise quantitativa dos principais ácidos graxos importantes para o aroma de queijo. Quatro amostras de queijo foram analisadas utilizando-se colunas cromatográficas recheadas com ácido silícico. As frações eluídas foram tituladas com KOH usando-se fenolftaleína como indicador. As frações foram esterificadas com metanol/H₂SO₄ e os ésteres metílicos dos

ácidos graxos foram analisados por cromatografia gasosa contra padrões autênticos. Os principais ácidos graxos encontrados foram: ácido cáprico, ácido capróico, ácido caprílico, ácido palmítico, ácido oleico entre outros em menor quantidade.

ANDERSON & DAY (1965b) desenvolveram uma metodologia de extração dos compostos neutros do aroma de "Blue Cheese" utilizando centrifugação de amostras do queijo, obtendo-se um óleo com aroma idêntico ao do queijo intacto. Uma destilação molecular foi realizada a uma temperatura de 45°C. Cada fração obtida foi então analisada por cromatografia gasosa em 2 colunas: uma polar e outra apolar. Foram então calculados os índices de retenção dos compostos presentes na amostras e de padrões autênticos. Foram feitas também análise dessas frações em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Foram analisadas uma centena de substâncias e identificadas aproximadamente 50 delas, dentre os quais: aldeídos, cetonas, compostos aromáticos, ésteres, metilcetonas, entre outras.

ANDERSON & DAY (1966) analisaram a influência de certos microrganismos na formação dos compostos voláteis responsáveis pelo aroma de "Blue Cheese". Foram quantificadas as metilcetonas e os álcoois secundários de amostras de queijos comerciais para avaliação da qualidade do aroma em comparação à produção desses compostos em meio de cultura por alguns microrganismos. Algumas culturas de *P. roqueforti*, *Torulopsis sphaerica*, *Mycoderma sp.*, *Geotrichum candidum* e *Bacterium linens*. foram utilizadas no sentido de se estudar a

bioconversão de metilcetonas em álcoois secundários. Todas as amostras de queijo apresentaram 2-heptanona como maior constituinte e houve uma variação muito grande na concentração das metilcetonas em todas as amostras. Os álcoois secundários sempre foram encontrados em quantidades menores que as metilcetonas na faixa de 0,3 a 10 mg / kg de queijo. Os microrganismos *P. roqueforti*, *Torulopsis sphaerica*, *Mycoderma sp.* são capazes de converter 2-pentanona em 2-pentanol.

LAWRENCE (1966) demonstrou que a habilidade de esporos de *P. roqueforti* em oxidar ácidos graxos diminui com a idade da célula. No entanto, essa habilidade foi restituída por adição de açúcares e de amino-ácidos . Somente ácidos com cadeia carbônica entre 6 e 12 átomos de carbono foram oxidados para suas respectivas metilcetonas. Foram utilizadas suspensões de esporos de *P. roqueforti* com várias idades (entre 4 e 8 dias), soluções contendo ácidos graxos marcados radiativamente e a produção das metilcetonas monitoradas por derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. Foi encontrado que um aumento na concentração de ácidos graxos aumenta a fase lag na produção de metilcetonas e que a diminuição da concentração de esporos também aumente essa fase. A temperatura ótima de produção de 2-heptanona foi de 27°C e o pH depende muito do ácido graxo livre utilizado e sua concentração. Alanina e D-Glicose, quando adicionadas ao meio de fermentação, favoreceram a formação de 2-heptanona a partir do ácido octanóico.

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

LAWRENCE & HAWKE (1968) relataram que baixas concentrações de ácidos graxos livres com até 14 átomos de carbono foram oxidados até metilcetonas sem fase lag por micélio de *P. roqueforti*. Os ácidos de 6 à 8 átomos de carbono produzem um alto rendimento na produção de metilcetonas de 5 e 7 átomos de carbono. Os ácidos de 9 á 12 átomos de carbono foram os que tiveram maior efeito inibidor na produção das metilcetonas. Micélios previamente tratados com concentrações tóxicas dos ácidos graxos foram menos susceptíveis à inibição por esses ácidos. Foi sugerido que a formação das metilcetonas envolveria a deacilação de β -oxo-aciltioesteres que vem de uma rota alternativa de reciclagem de CoA.

DOLEZALEK (1969) estudou a formação de metilcetonas por linhagens de *P. roqueforti* em meio de Czapek-Dox que continha 10% de gordura de leite. A maioria das linhagens produziu uma maior quantia de metilcetonas a 15°C. As metilcetonas foram encontradas em maior

quantidade depois de 40 e 57 dias e foram identificadas como 2-pentanona, 2-heptanona e propanona. Também foram formadas quantidades menores de 2-butanona e 2-nonanona. Só foi formada 2-undecanona a 8°C depois de 40 dias. Somente pequenas quantidades de formaldeído a acetaldeído foram encontradas.

LIEBICH et. Al. (1970) analisaram diferente tipos de queijos, inclusive queijos do tipo "Blue Cheese". O método de análise adotado foi o de centrifugar o queijo por 10 a 15 minutos a 4.000 rpm à temperatura ambiente. O óleo obtido foi analisado diretamente em cromatografia gasosa e possuiu o aroma característico do queijo. Foram encontrados em amostras de "Blue Cheese", metilcetonas com 3, 5, 7, 9 e 11 átomos de carbono. Alguns ésteres tais como butirato de etila, butirato de metila, hexanoato de etila, hexanoato de metila e octanoato de etila também foram encontrados. Os constituintes dos queijos Cheddar e Limburger foram também estudados e se mostraram bastante diferentes.

NELSON (1970) desenvolveu um processo de produção de aroma de "Blue Cheese" através de fermentação submersa utilizando inóculo rico em esporos de *P. roqueforti*. O meio utilizado foi de leite homogeneizado e autoclavado adicionando-se de 1 a 3% de sal. Após 3 a 4 dias de inoculado, 4 a 6 % de sal adicional foi introduzido e o meio incubado por mais 1 ou 2 dias. A temperatura utilizada foi de 21 a 25 °C e o pH ficou entre 4,5 e 5,5. O meio foi areado numa vazão nunca superior a 1 litro de ar por min. por litro de meio. Uma aeração muito

maior favorece a perda dos compostos voláteis formados. Após esse período os níveis de metilcetonas formadas foram de 7 a 15 vezes superiores aos encontrados nos queijos comerciais. No final do processo, o meio foi esterilizado por sistema de ultra alta temperatura (130°C por 4 segundos). O produto final possui teor de gordura de 4%, proteína 5%, sal 5% e umidade 78%.

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

KRIVENTSOVA (1971) Comparou o total de compostos carbonílicos presentes em queijo roqueforti e leite inoculado com *Torulopsis severinii* 304 ou *T. secundário* 642. Os principais componentes encontrados nas três preparações incluíram acetaldeído, acetona, butanona, pentanona

e heptanona, presentes no queijo normal em quantidades de 1.90, 2.10, 1.50, 1.70 e 1.19 mg/kg respectivamente. Os queijos preparados de leites inoculados com linhagens de *Torulopsis* contiveram as 5 substâncias citadas em 2-3 vezes quantidades mais altas e eram superiores ao queijo normal com relação ao aroma produzido.

DARTEY & KINSELLA (1973a) promoveram a oxidação de ácido láurico marcado radiativamente para compostos carbonílicos incluindo a série homóloga de metilcetonas por esporos de *P. roqueforti*. Foi utilizado uma concentração de $6,3 \times 10^3$ esporos/ml na presença de 2mM de D-Glicose a um pH de 6,5 e 30°C. Sob essas condições houve de 16 a 20% de rendimento em compostos carbonílicos totais. A utilização de glicose favorece a formação de metilcetonas e inibe a oxidação total do ácido graxo até CO₂. Uma série homóloga de metilcetonas de C₃ á C₁₁ foi encontrada, indicando haver possibilidade de interconversão das metilcetonas formadas.

DARTEY & KINSELLA (1973b) realizaram a oxidação de Palmitato de sódio, marcado radiativamente, por esporos de *P. roqueforti*. A utilização de L-prolina e D-glicose favoreceu a formação de metilcetonas e suprimiu a oxidação total de palmitato de sódio até CO₂. A concentração de esporos utilizada foi de $6,3 \times 10^8$ produzindo 32,4 % de compostos carbonílicos utilizando o ácido graxo na concentração de 5mM em presença de 20 mM de D-glicose a 30°C e pH 6,5. Uma série homóloga de metilcetonas foi encontrada sendo C₁₅ a mais abundante.

DWIVEDI & KINSELLA (1974a) desenvolveram um método para produção de aroma de "Blue Cheese" utilizando fermentação submersa de *P. roqueforti* em processo contínuo. O esporo do fungo foi inoculado em meio contendo 5% de extrato de malte , 2% de glicose e 0,5% de extrato de levedura. Após 5 dias a 25°C, uma pequena quantidade de esporos foi retirada da superfície do micélio formado e inoculado em um meio contendo 1,5 mg de água de maceração de milho e sacarose / 10 ml de meio. Após 3 dias de incubação a 25°C, o micélio formado foi colocado em meio contendo gordura de leite previamente lipolisada por lipase pancreática. A suspensão do micélio e a gordura foram constantemente bombeadas para o meio de fermentação. Uma aeração de 1 litro de ar por minuto por litro de meio foi utilizada. O efluente foi coletado e mantido sob 4°C e pode ser usado como aroma natural de "Blue Cheese".

DWIVEDI & KINSELLA (1974b) estudaram a relação da quantidade de ácidos graxos livres e a quantidade de metilcetonas produzidas por micélio de *P. roqueforti*. O micélio foi produzido por inoculação dos esporos em meio malte e incubado a 25°C por 4 dias. O micélio produzido cresce em água de maceração de milho e sacarose 1g/10 ml de meio a 25°C e pH 4-5,5 com aeração de 1 litro de ar por minuto por 1 litro de meio. Depois de 4 dias o micélio foi coletado e usado para produção dos compostos carbonílicos. Micélio jovem (24 horas) foi inoculado em gordura de leite, previamente lipolisada, à 25°C com agitação. Grandes quantidades de ácidos graxos livres (39 a 52 μ moles/ g de gordura) aumentam a fase lag , no entanto, produzem,

num tempo maior, uma quantidade maior de metilcetonas do que concentrações menores de ácidos graxos livres. As principais metilcetonas encontradas foram 2-pentanona, 2-heptanona, 2-nonanona e 2-undecanona.

JOLLY & KOSIKOWSKI (1975a) descreveram um método de produção de aroma de "Blue Cheese" com soro e gordura de leite ou gordura de coco através de esporos de *P. roqueforti*. O produto fermentado alcançou aroma típico com 48-72 horas de fermentação a 20°C. As concentrações de compostos carbonílicos, compostos monocarbonílicos e metilcetonas foram de 351, 322 e 299 $\mu\text{moles}/10\text{g}$ soro de leite ácido e 139, 133 e 93 $\mu\text{moles}/10\text{ g}$ de soro de leite doce respectivamente. 2-heptanona e 2-nonanona foram as metilcetonas principais numa concentração 4-5 vezes mais alta no substrato de soro de leite ácido manteiga ou gordura de coco quando comparado com soro de leite doce. O produto final teve aproximadamente 20% gordura e 9.0% proteína. A adição de lipases microbianas proporcionou a produção de ácidos graxos livres para a continua produção de compostos carbonílicos.

JOLLY & KOSIKOWSKI (1975b) produziram aroma natural de "Blue Cheese" a partir de adição de esporos de *P. roqueforti* e lipase microbiana (*Aspergillus oryzae*) à um meio contendo creme de leite pasteurizado. Foi possível adicionar ao meio gordura de coco e soro de leite. A mistura foi mantida a 20°C por 48 horas, a 200 rpm. Depois desse tempo o aroma produzido foi concentrado por atomização. O

produto final contém a textura e o sabor muito parecidos com o do queijo.

FAN et. al. (1976) estudaram a formação de metilcetonas durante o processo de germinação de esporos de *P. roqueforti*. Os esporos (10^7 /ml) foram incubados num meio contendo 2% de água de maceração de milho, 1,5% de sacarose e 0,4 mg/ml de Streptomicina para inibir o crescimento bacteriano. O meio foi mantido a 30°C com agitação de 110 rpm. Os frascos foram retirados e centrifugados em diferentes estágios de crescimento celular. As células foram então classificadas de acordo com seu estágio de desenvolvimento. A suspensão de células foi incubada na presença de ácido octanóico em tampão fosfato pH 6,5 a 30°C. Foi observado que, tanto esporos, quanto micélio, foram capazes de produzir metilcetonas a partir de ácidos graxos, no entanto, a eficiência de produzir metilcetonas foi maior durante o processo de germinação dos esporos.

KINDERLERER & KELLARD (1984) estudaram o tipo de decomposição que ocorreu com gordura de coco após inoculação de 4 espécies de fungos: *Eutrium amstelodami*, *E. chevalieri*, *E. herbariorum* e *P. citrinum*. Após 30 dias de incubação, foi observado o surgimento de uma série homóloga de metilcetonas alifáticas e os respectivos álcoois secundários. Os principais compostos encontrados foram: 2-heptanona, 2-nonanona e os álcoois 2-heptanol e 2-nonanol, o que representa a ocorrência de uma β -oxidação parcial dos ácidos graxos da gordura. Esse trabalho mostrou que a principal biodeterioração da gordura de

coco foi a lipólise que ocorreu com os triglicerídeos e a posterior oxidação desses ácidos graxos até metilcetonas. Esse tipo de degradação faz surgir a rancidez cetônica, que por vezes tem sido ignorada no controle de qualidade de certas gorduras. Esse tipo de decomposição ocorre, principalmente, quando ocorre a contaminação dessas gorduras com fungos.

OKUMURA & KINSELA (1985) incubaram micélio de *P. camemberti* em um sistema modelo contendo lipídeos de leite numa concentração de 45 mM, a uma temperatura de 27°C e pH 6,8. Houve a formação de ácidos graxos livres e principalmente de compostos carbonílicos, dos quais 60% eram constituídos de metilcetonas. Dessas metilcetonas formadas, 2-nonanona e 2-undecanona foram as que tiveram maior porcentagem relativa. A adição de lipase ao sistema de produção das metilcetonas favorece o aparecimento das mesmas aumentando sua concentração final, pois esse tipo de enzima disponibiliza os ácidos graxos para sofrerem posterior oxidação até metilcetonas. Observou-se também que, no sistema contendo lipase, houve um menor crescimento do micélio. A adição de ácidos graxos livres (láurico e oleico) tende a diminuir o nível de metilcetonas formadas.

KINDERLERER (1987) descreveu a conversão de óleo de coco à metilcetonas por duas espécies de fungos *Aspergillus ruber* e *A. repens*. Esses microrganismos metabolizam óleo de coco como única fonte de carbono até metilcetonas, e até pequenas concentrações de álcoois secundários. O produto da fermentação foi extraído com

solvente e analisado por GC/MS. A fermentação foi feita em erlenmeyers de 250 ml contendo óleo de coco, meio Czapek modificado e glicerol. Foram adicionadas suspensões dos esporos e mantidas por 5 dias, a 60 rpm e a 25°C. As principais metilcetonas encontradas foram: 2-pentanona, 2-heptanona, 2-nonanona 2-undecanona e 2-tridecanona. A maior concentração encontrada foi de 2-undecanona pois o ácido láurico foi o principal constituinte da gordura de coco, no entanto, a maior taxa de conversão foi a de 2-nonanona a partir de ácido cáprico.

LARROCHE et. al. (1989) promoveram a biossíntese de 2-heptanona a partir de ácido octanóico por esporos de *P. roqueforti* imobilizados em alginato de cálcio e eudragit RL. Um gel de alginato de cálcio incluso em um copolímero (eudragit RL) foi utilizado para imobilizar os esporos no intuito de se promover uma maior estabilidade na formação das metilcetonas. O meio de biotransformação foi constituído de 5µmol de octanoato de sódio, 167 µg/ml de cloranfenicol, 0,5 mg/ml de L-alanina e 1 g/150 ml de meio de biocatalisador (esporo imobilizado), na concentração de 2×10^7 esporos por ml de meio. Foi determinado que os géis de alginato possuem baixa estabilidade na presença de tampão fosfato entretanto a presença de uma mistura, alginato de cálcio e o copolímero eudragit RL, aumenta a resistência do gel formado, entretanto não foi suficiente para aumentar a resistência da imobilização frente a esse tipo de tampão. Foi desenvolvido então um sistema sem tamponamento utilizando octanoato de sódio para produção de metilcetonas.

LARROCHE & GROS (1989) desenvolveram uma metodologia para transformação de ácido octanóico à 2-heptanona por esporos de *P. roqueforti* imobilizados em alginato de cálcio e eudragite RL através de bateladas e processo contínuo. O meio de transformação consiste de ácido octanóico ou octanoato de sódio, 0,2ml/L de etanol (ativador) e 167 mg/L de cloranfenicol. O pH foi ajustado para 5,5-6,5 com HCl ou NaOH e 2,33 g do gel contendo 2×10^7 cels./ml de meio. O processo foi monitorado através da medida de volume de HCl gasto para manter o pH idêntico ao inicial devido à reação de equilíbrio ácido/base do ácido octanóico/octanoato de sódio.

YAGI, et. al. (1989) isolou de amostras de solo uma linhagem de *Trichoderma sp.* capaz de metabolizar ésteres de ácidos graxos até metilcetonas com um átomo de carbono a menos que o ácido original. O meio de cultivo foi composto de meio basal adicionado de tricaprina como única fonte de carbono. Depois de 5 dias de incubação a 28°C o meio foi centrifugado e um óleo foi separado e dissolvido em cloroformio. Utilizou-se cromatografia gasosa acoplada a detetor seletivo de massas para identificação dos compostos formados. A única metilcetona formada foi a 2-nonanona. Não houve formação quando tributirina foi utilizada como única fonte de carbono. Quando se utilizou tricaproina, tricaprilina, tricaprina, houve a formação de 2-pentanona (60 mg/100 ml de meio), 2-heptanona (100 mg/100 ml de meio) e 2-nonanona (208 mg/ 100 ml de meio) respectivamente. Quando óleo de babaçu foi utilizado como substrato houve formação de 2-heptanona (4 mg/100 ml de meio), 2-nonanona (5mg/100 ml de meio), 2-undecanona

(29 mg/100 ml de meio) e 2-tridecanona (1 mg/100 ml de meio). Não se observou produção de metilcetonas na presença de trilaurina, trimiristina, tripalmitina e ácido cáprico. No entanto caprilato de metila e de etila renderam a formação de 8 e 21 mg/100 ml de meio respectivamente.

LLANO et. al. (1990) estudaram a composição dos componentes voláteis de "Blue Cheese" artesanal denominado Gamonedo. Foi utilizada a técnica de extração/destilação simultâneas (SDE) do queijo obtendo-se um óleo que foi diretamente analisado através da técnica de cromatografia gasosa acoplada a detetor seletivo de massas. Foram identificados aproximadamente 40 compostos dos quais mais de 100 isolados. Os principais constituintes encontrados foram 2-nonanona, 2-heptanona, decanoato de metila, 2-tridecanona, entre outros. Foi estudada também a variação de alguns compostos, principalmente as metilcetonas, durante o processo de maturação desses queijos. Observou-se que em 60 dias houve o pico máximo de metilcetonas sendo 2-nonanona o maior constituinte (100 µg/ g de queijo). Os álcoois secundários derivados das metilcetonas aparecem em concentração máxima em aproximadamente 65 dias na concentração de 15 µg/g de queijo, no caso do 2-nonanol.

YAGI et. al. (1990) realizaram o isolamento e seleção de microrganismos produtores de metilcetonas em meio contendo tricaprina ou óleo de babaçu. Vinte e duas espécies foram selecionadas como produtoras dessas substâncias. Esses microrganismos foram

divididos em duas classes distintas: os produtores a partir de tricaprina e com baixa produção a partir de óleo de babaçu e a segunda com alta produção nos dois substratos. Espécies de *Fusarium* e *Trichoderma* são representantes do primeiro grupo enquanto *Penicillium*, *Aspergillus* e *Cladosporium* são representantes do segundo grupo. Quatro espécies de *Aspergillus* foram identificadas como produtoras de metilcetonas e são elas: *Aspergillus niger*, *A. wentii*, *A. terreus* e *A. oryzae*, produzindo preferencialmente 2-nonanona a partir de tricaprina.

FRUTOS et. al. (1991) realizaram estudos de caracterização dos compostos voláteis responsáveis pelo aroma de alguns tipos de queijo utilizando cromatografia gasosa acoplada a detetor seletivo de massas. Foi encontrada uma série de metilcetonas homólogas em algumas espécies de queijo artesanal produzidos pela adição de fungo à massa do queijo fresco. Foram identificados aproximadamente 46 compostos dentre os quais se destaca a presença de grandes quantidades de álcoois secundários e de ácidos graxos livres.

HATTON & KINDERLERER (1991) verificaram que o processo de transformação de ácidos graxos livres de cadeia média para metilcetonas por linhagem de *P. crustosum* se trata de um sistema de desintoxicação, já que esses ácidos graxos mostraram ter efeito inibidor no crescimento desse fungo. O índice de inibição varia com a mudança de pH, concentração e tamanho da cadeia carbônica desses ácidos. O pH ótimo de formação de metilcetonas foi de 6,4 sendo a concentração mínima inibitória de 32,5 mMol, 20,0 mMol e 10 mMol

para os ácidos hexanóico, octanóico e decanóico respectivamente. A ordem de toxicidade dos ácidos graxos encontrada foi $C^{11} > C^{10} > C^{12} > C^8 > C^6$.

KIM & LINDSAY (1991) relataram diferença na constituição dos ácidos graxos presentes em queijos produzidos por leite de vaca (Blue, Cheddar, ovelha (*roqueforti*) e cabra. Queijos produzidos com leite de cabra possuem uma grande quantidade de ácido hexanóico, octanóico e decanóico, o mesmo ocorrendo com queijos produzidos com leite de ovelhas. Alguns outros ácidos de cadeia média ramificados também foram encontrados.

PANNEL & OLSON (1991) desenvolveram um sistema para produção de metilcetonas baseado em utilização de gordura de leite, lipase pancreática e esporos de *P. roqueforti* microencapsulados. 10 g. dessas microcapsulas foram incubadas a 10°C para produção das metilcetonas, que foram analisadas por "headspace" acoplado a cromatografia gasosa. As principais metilcetonas produzidas foram 2-pentanona, 2-heptanona e 2-nonanona na concentração de 15 mg / g de capsulas.

CREULY et al. (1992) produziram metilcetonas a partir de ácidos graxos de cadeia média (de 6 à 10 átomos de carbono) através de bioconversão por esporos de *P. roqueforti* em um sistema bifásico água/solvente orgânico. A fase orgânica consiste de isoparafina industrial que possui como maior constituinte tetradecano. A reação foi iniciada com esporos dormentes que mostraram possuir uma alta

atividade biocatalítica. A concentração de esporos no meio foi de 2×10^8 esporos por ml de meio. A concentração de ácidos graxos utilizadas variou de 20 a 150 mM. Esse método obteve como melhores resultados a produção de 21 g/l de 2-pentanona, 73 g/l de 2-heptanona e 57 g/l de 2-nonanona.

KRANZ et. al. (1992) descreveram a conversão de ácidos graxos de cadeia curta até metilcetonas por *Monascus purpureus* em níveis próximos do conseguido com *P. roqueforti*. As mesmas regulações metabólicas foram encontradas. O tamanho da cadeia influencia a produção sendo o rendimento da transformação para o ácido hexanóico de aproximadamente 100% e já para o ácido láurico de aproximadamente 5%. A concentração influencia no tempo necessário para a transformação sendo que quanto maior a concentração maior a fase lag, porém uma maior concentração de metilcetona final será obtida.

van der SCHAFT, et. al. (1992) descreveram a produção de 2-heptanona a partir de ácido octanóico por *Fusarium poae* utilizando um meio contendo glicose, asparagina, tiamina e elementos traços. O meio foi mantido a 30°C e 200 rpm por 3 dias. O rendimento da fermentação poder ser aumentado se o produto formado for retirado do meio por arraste com gás e adsorvido em resina Amberlite XAD-4. Obteve-se 61 mg/100 ml de meio de 2-nonanona e outras metilcetonas em quantidades menores.

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

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

LARROCHE et. al. (1994) descreveram que esporos de *Penicillium roqueforti* podem converter ácidos graxos em metilcetonas para produzir aroma de "Blue Cheese" que pode ser usado em molhos de salada, sopas, bolachas, e bolos. Síntese de 2-heptanona a partir de ácido de octanóico por esporos de *Penicillium roqueforti* (ATCC 64383) foi

investigado em um sistema de pH controlado. Altas taxas de bioconversão (0.55 mMol 2-heptanona/l/h) foi alcançada nas primeiras 25-70 h; estas taxas diminuíram subsequentelemente devido a germinação e crescimento do biocatalisador. A duração deste período inicial altamente produtivo poderia ser aumentado limitando O₂ ou diminuindo o número de esporos no meio para menos de 10⁷ esporos/ml, mas ambas as condições resultaram em taxas de bioconversão diminuídas. Estudos bioenergéticos e metabólicos do período 25-70 h revelaram que etanol agiu como uma fonte de energia para as células, e que as células começaram a germinar quando o etanol havia terminado.

TAYLOR (1995) monitorou a formação de aroma de "Blue Cheese" por Cromatografia Gasosa "on-line" utilizando 8 culturas diferentes de *P. roqueforti*. O meio consiste de creme de leite, água e foi mantido com agitação de 400 rpm a 25°C por 8 a 29 dias. O monitoramento foi feito determinando-se os níveis de produção de 2-pentanona do fermentado "on-line". O máximo de 2-pentanona obtido foi de 100 ppm. O produto final foi então esterilizado sob pressão a altas temperaturas por curto tempo, no entanto mesmo nessas condições geralmente foi perdido metade da quantidade de 2-pentanona produzida no fermentador devido à sua grande volatilidade.

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

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

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Reagentes e Materiais Específicos

3.1.2. Reagentes químicos: ácidos, bases, solventes (Merck, Synth, ou equivalente).

Matéria prima : creme de leite de vaca e creme de leite de cabra produzidos no Departamento de Tecnologia de Alimentos da FEA Unicamp. Edenor EV 85 KR, substrato comercial marca Henkel composto de uma mistura de triglicerídeos de ácido capróico e caprílico

Meios de cultura: (PDA) Potato Dextrose Ágar (DIFCO), farelo de trigo (comercial).

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

Colunas Cromatográficas : Cpsil 5CB (Chrompack) , Shimadzu S5 (Shimadzu).

Adsorventes cromatográficos : Adsorvente para extração de Compostos lipofílicos Extrelut (Merck).

3.1.2. Equipamentos:

- Estufas bacteriológicas Fanen mod. 002 CB
- Centrífuga refrigerada Beckman mod. J2-21
- Balança Analítica Mettler mod. H-10
- Cromatógrafo Gasoso Chrompack modelo CP 900X
- Cromatógrafo Gasoso acoplado a Detetor Seletivo de Massas Shimadzu, modelo QP 5000
- Shaker refrigerado New Brunswick Scientific mod. G25
- Shaker com banho maria New Brunswick Scientific mod. G76
- Shaker refrigerado programável INNOVA 4335

3.2. Métodos

3.2.1. Produção de suspensão de esporos

Em tubos contendo o meio ágar batata dextrosado (PDA) inclinado a linhagem n° 1099 de *Aspergillus sp.* foi inoculada e os tubos mantidos durante 4 dias a 30°C. Foram então adicionados em cada tubo 10 ml de água estéril, a superfície do meio foi raspada e a suspensão de esporos foi homogeneizada em um Erlenmeyer também estéril e o número de células obtidos através de contagem em câmara de Neubauer.

3.2.2. Produção da Lipase

3.2.2.1. Produção da Suspensão Enzimática Bruta

Em frascos Erlenmeyer de 500 ml foram adicionados 20 g de um meio composto de farelo de trigo:água - 7:3 (p:p). Os frascos foram previamente esterilizados à 121 °C, a pressão de 1 atm., por 15 minutos. Adicionou-se então 1 ml de uma suspensão de esporos e agitou-se vigorosamente. Os frascos foram encubados por 72 horas a 30°C.

Após o período de incubação foram adicionados 100 ml de água destilada, o meio foi agitado lentamente por 15 minutos e então deixado em repouso por 1 hora. A mistura foi filtrada sobre papel de filtro Whatman n° 1 obtendo-se assim a suspensão enzimática bruta.

3.2.2.2. Produção da Suspensão Enzimática Bruta liofilizada

A suspensão bruta obtida anteriormente foi saturada com sulfato de amônio até 80%. A mistura foi deixada em repouso por doze horas a 4°C, e então centrifugada a 7000 rpm por 15 minutos, separando-se o precipitado. Este foi dialisado em membrana de acetato de celulose por 48 horas a 4°C e então liofilizado.

3.2.2.3. Produção de suspensão Enzimática Bruta livre de esporos

A suspensão enzimática bruta foi mantida sob leve agitação em banho de gelo por 15 min. com 20 % em peso de celite. Foi feita a filtração em funil de placa sinterizada mantendo-se o filtrado sob banho de gelo. Obteve-se assim uma suspensão enzimática bruta, livre de esporos.

3.2.3. Determinação da Atividade Lipolítica

A atividade da lipase foi determinada incubando-se uma mistura de reação composta de 1 ml da suspensão enzimática a ser testada, 4 ml de solução tampão acetato pH 5,6 0,05 M, 1 g de gordura de leite de cabra, obtida por centrifugação do leite de cabra a 40°C a 7000 rpm por 10 minutos.

A mistura foi incubada a 40°C, por 60 minutos em banho maria termostaticado com agitação de 130 oscilações por minutos. A reação

foi paralisada adicionando-se 15 ml de acetona/etanol 1:1 (v:v). Os ácidos graxos liberados foram titulados contra solução de KOH 0,05 N, utilizando-se fenolftaleína como indicador.

Uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido graxo por minuto de reação nas condições acima. O cálculo da atividade enzimática foi feito utilizando-se uma curva padrão de ácido caprílico versus o volume de KOH 0,05 N gasto.

3.2.4. Caracterização dos Principais Ácidos Graxos presentes nos substratos

Os cremes de leite de cabra e de vaca, assim como o substrato comercial Edenor EV 85 KR (aproximadamente 100 mg) foram transferidos para tubos de ensaio e adicionados 5 ml de KOH 0,5 M em metanol. O tubo foi fechado com tampa de rosca e deixado em banho maria fervente por 4 minutos.

Após esfriados sob água corrente foram adicionados 5 ml de solução de BF_3 eterato em metanol. Os tubos foram novamente colocados em banho maria fervente por mais 5 minutos. Após esse período adicionou-se ao meio 4 ml de solução saturada de NaCl e agitou-se por 30 segundos.

Adicionou-se então 5 ml de Hexano destilado agitando-se por 30 segundos. Depois de repousar por 15 minutos a fase orgânica foi

cuidadosamente transferida para frasco lacrado e guardado sob refrigeração.

A solução obtida anteriormente foi analisada em Cromatógrafo Gasoso acoplado a detetor seletivo de massas Shimadzu, modelo QP 5000, utilizando-se uma coluna capilar de sílica fundida (60 m X 0,25 mm X 0,25 μ m) Shimadzu S5. O detetor foi mantido em 280 °C e o injetor a 250°C. O forno foi aquecido a 60°C por 2 min. e elevado até 100°C numa razão de 4°C/min., permanecendo nessa temperatura por 5 min. e, então aquecido até 300°C numa segunda razão de 15°C/min. e mantido na temperatura final por 5 minutos. O potencial de ionização do detetor utilizado foi de 72 eV.

3.2.5. Produção das Metilcetonas

O meio para obtenção das metilcetonas de interesse foi composto de 1g de creme de leite de cabra ou de creme de leite de vaca ou Edenor EV 85 KR, (pesados com exatidão de 0,1%), 9 ml de tampão “adequado” e 1 ml da suspensão enzimática a ser testada. Transferido para frascos lacrados foram mantidos por 96 horas a 30°C sob agitação (100 rpm).

3.2.6. Extração das Metilcetonas

Os frascos foram contaminados com 1 µl de padrão interno (6-metil- 2-heptanona), deslacrados e imediatamente vertidos sobre uma coluna de 20 cm de comprimento e 5 cm de diâmetro, recheada com 10 g de Extrelut®. As amostras foram então eluídas duas vezes com um volume de 25 ml de diclorometano e por mais duas vezes com 5 ml do mesmo solvente e o eluato coletado diretamente em balão volumétrico. O volume foi então ajustado para 50 ml e as amostras guardadas em frascos hermeticamente fechados a -15 °C.

3.2.7. Identificação das Metilcetonas

3.2.7.1. Cromatografia Gasosa acoplada a Detetor Seletivo de Massas

A solução de metilcetonas foi injetada num cromatógrafo gasoso acoplado a detetor seletivo de massas Shimadzu, modelo QP 5000, utilizando-se uma coluna capilar de sílica fundida (60 m X 0,25 mm X 0,25 µm) Shimadzu S5. O detetor foi mantido em 280 °C e o injetor a 250°C. O forno foi aquecido a 60°C por 2 min. e elevado até 100°C numa razão de 4°C/min. permanecendo nessa temperatura por 5 min. e, então aquecido até 300°C numa segunda razão de 15°C/min. e mantido na temperatura final por 5 minutos. O potencial de ionização do detetor utilizado foi de 72 eV .

3.2.7.2. Índice de Retenção das Metilcetonas

As metilcetonas identificadas por cromatografia gasosa acoplada a detetor seletivo de massas tiveram sua identificação confirmada calculando-se o índice de retenção em cromatógrafo gasoso com detetor de ionização de chama (FID) relativo à uma mistura de hidrocarbonetos lineares dos picos da amostra e dos picos dos padrões autênticos.

O índice foi calculado tanto para a amostra quanto para os padrões usando-se a seguinte fórmula:

$$IR = \frac{(T_{rx} - T_{rcn-1}) \times (C_n - C_{n-1}) \times 100}{T_{rcn} - T_{rcn-1}} \times C_{n-1}$$

onde :

IR = Índice de Retenção

T_{rx} = Tempo de retenção da substância em questão

T_{r cn} = Tempo de retenção do hidrocarboneto que possui tempo de retenção após o **T_{rx}**

T_{r cn-1} = Tempo de retenção do hidrocarboneto que possui tempo de retenção anterior ao **T_{rx}**

C_n = Número de átomos de carbono do hidrocarboneto com **T_{r cn}**

C_{n-1} = Número de átomos de carbono do hidrocarboneto com **T_{r cn-1}**

3.2.8. Análise Quantitativa por Cromatografia Gasosa

A solução das Metilcetonas foi injetada num cromatógrafo Chrompack modelo CP 900X utilizando-se uma coluna capilar de sílica fundida CP Sil 5CB (60 m X 0,25 mm X 0,25 μ m). O detetor foi mantido em 280 °C e o injetor a 250°C. O forno foi aquecido a 60°C por 2 min. e elevado até 100°C numa razão de 4°C/min., permanecendo nessa temperatura por 5 min., e então aquecido até 300°C numa segunda razão de 15°C/min. e mantido na temperatura final por 5 minutos.

A quantificação das metilcetonas foi feita contra o padrão interno, monitorando-as relativamente à curva de calibração dos padrões autênticos de 2-pentanona, 2-heptanona, 2-nonanona e 2-undecanona.

3.2.9. Efeito do substrato na produção de Metilcetonas

Foram testadas três diferentes fontes de ácidos graxos para a produção de metilcetonas: creme de leite de vaca, creme de leite de cabra e Edenor EV 85 KR (triglicerídeos de ácido capróico e caprílico).

Foram adicionados 1g da gordura a ser testada, 1 ml da suspensão enzimática e 9 ml de tampão acetato 0,05 M pH 4,5. Os frascos foram incubados por 96 horas a 30°C.

3.2.10. Efeito da concentração do substrato Creme de Leite de Cabra na produção de Metilcetonas

Foram adicionados 1, 2, 5, 10 e 15 g de creme de leite de cabra , 1 ml da suspensão enzimática bruta e 9 ml de tampão acetato 0,05 M pH 4,5. Os frascos foram incubados por 96 horas a 30°C.

3.2.11. Efeito do pH na produção de Metilcetonas

Foram adicionados em frascos (20 ml), 1 g de creme de leite de cabra, 1 ml de suspensão enzimática bruta, e 9 ml de diferentes soluções tampão, tais como: tampão acetato 0,05M pH 4.0 , 4.5, 5.0 e tampão fosfato 0,05M pH 6.0 .

A mistura foi mantida por 96 horas a 30°C com agitação de 100 rpm. Após esse período foi feita extração e quantificação das metilcetonas, como descrito anteriormente.

3.2.12. Efeito da Temperatura na produção de Metilcetonas

O efeito da temperatura na produção de metilcetonas foi determinado utilizando-se as temperaturas de 25, 30, 35 e 40°C, sendo amostras retiradas a cada 24 horas. O sistema de reação foi preparado pela adição de 1g da creme de leite de cabra , 1 ml da suspensão enzimática

bruta e 9 ml de tampão acetato 0,05 M pH 4,5. Os frascos foram incubados por 96 horas nas temperaturas citadas anteriormente.

3.2.13. Efeito do Tempo de Reação na produção de Metilcetonas

Um mililitro da suspensão enzimática bruta ou da suspensão de esporos foram incubados com 9 ml de tampão acetato 0,05 M pH 4,5 e 1 g de creme de leite de cabra ou creme de leite de vaca.

A temperatura foi mantida em 30°C durante o processo de incubação com agitação de 100 rpm por 120 horas. As amostras foram retiradas a cada 24 horas.

3.2.14 Importância da presença de esporos na produção de metilcetonas

Foi testada a produção de metilcetonas por uma suspensão livre de esporos.

Em frascos Erlenmeyer foram adicionados 1 g de creme de leite de cabra ou de vaca, 9 ml de tampão acetato 0,05 M, pH 4,5 e 1 ml da suspensão enzimática livre de esporos. Os frascos foram incubados por 96 horas sob agitação de 100 rpm, permanecendo durante esse tempo à 30°C.

3.2.15. Efeito da concentração de esporos na produção de metilcetonas

Foram incubados em frascos 1 g de creme de leite de cabra, 9 ml de tampão acetato 0,05M pH 4,5 e 1 ml de uma suspensão de esporos com uma concentração de $6,8 \times 10^6$, $6,8 \times 10^7$ e $6,8 \times 10^8$.

Os frascos foram mantidos por 144 horas à 30°C sob agitação de 100 rpm, sendo retiradas amostras a cada 24 horas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma nova linhagem de fungo foi isolada e selecionada por COSTA (1996) como boa produtora potencial de lipase extracelular, que apresentou como característica bioquímica, especificidade para ácidos graxos de cadeia média (C_6 , C_8 , C_{10}).

O microrganismo apresentou crescimento moderado em meio PDA (Potato-Dextrose-Ágar), quando incubado a 30°C, e pigmentação verde. De acordo com as características morfológicas e taxonômicas descritas, trata-se de fungo pertencente ao gênero *Aspergillus*, COSTA (1996).

4.1. Determinação da atividade lipolítica de suspensões enzimáticas em relação a diferentes substratos.

Por ser necessária a presença de ácidos graxos livres no sistema para a produção de metilcetonas pelos esporos, uma boa atividade lipolítica se torna indispensável a um sistema de biocatálise dessas substâncias, principalmente porque o substrato é formado de triglicerídeos, por exemplo, creme de leite de cabra e vaca, que necessitam ser hidrolisados.

Assim nos diferentes sistemas testados para produção de metilcetonas foi realizado o monitoramento da atividade lipolítica.

A Tabela 1 ilustra os dados obtidos.

TABELA 1 - Atividade lipolítica das suspensões enzimáticas de *Aspergillus sp.* n° 1099

Tipo de suspensão	creme de leite de cabra μmoles ácido caprílico/min./ml	Substrato creme de leite de vaca μmoles ácido caprílico/min./ml	Edenor EV 85 KR μmoles ácido caprílico/min./ml	óleo de oliva μmoles ácido oleico/min./ml
de esporos	-	-	-	-
enzimática bruta	2,12	1,1	2,4	0,07
enzimática bruta liofilizada	2,8	1,4	3,2	0.12
enzimática bruta livre de esporos	2,13	1,15	2,5	0,09

Nota-se que a suspensão de esporos não apresentou atividade lipolítica frente a nenhum substrato testado e que as outras suspensões utilizadas possuem atividades próximas.

Foi verificado especificidade da atividade da lipase desta linhagem para ácidos graxos de cadeia média (capróico, caprílico e cáprico) assim como descrito por COSTA (1996) .

Com relação ao tipo de suspensão a ser utilizada é importante lembrar que a suspensão bruta liofilizada pode apresentar maior estabilidade e

facilidade de manuseio, em comparação com suspensão enzimática bruta.

LAWRENCE (1966) demonstrou que suspensões de esporos de *P. roqueforti* são capazes de transformar ácidos graxos de cadeia média em suas respectivas metilcetonas.

DWIVEDI & KINSELLA (1974a) utilizaram gordura previamente lipolisada na obtenção de aroma de "Blue Cheese" através de fermentação submersa de esporos de *P. roqueforti*.

JOLLY & KOSIKOWSKI (1975) produziram aroma natural de "Blue Cheese" através da utilização de esporos de *P. roqueforti* e lipase de *Aspergillus oryzae* em meio contendo creme de leite pasteurizado.

4.2. Identificação por cromatografia gasosa acoplada a detetor seletivo de massas, dos principais ácidos graxos presentes nos substratos utilizados na produção de metilcetonas.

4.2.1.Creme de Leite de Cabra

A Tabela 2 mostra a composição do creme de leite de cabra com relação aos seus ácidos graxos, identificados por cromatografia gasosa acoplada a detetor seletivo de massas.

TABELA 2: Principais ácidos graxos presentes em creme de leite de cabra

Ácido Graxo	tempo de retenção (min.)	Porcentagem relativa %
Ácido Capróico	10,3	6,9
Ácido Caprílico	17,6	5,8
Ácido Cáprico	32,4	7,9
Ácido Láurico	38,7	2,5
Ácido Mirístico	43,8	3,7
Ácido Palmítico	45,8	16,8
Ácido Esteárico	47,5	14,6
Ácido Oleico	48,7	30,5
Outros		11,3

4.2.2. Creme de Leite de Vaca

Os principais ácidos graxos do creme de leite de vaca foram identificados por cromatografia gasosa/espectrometria de massas e os resultados estão descritos na Tabela 3.

TABELA 3: Principais ácidos graxos encontrados em creme de leite de vaca.

Ácido Graxo	tempo de retenção (min.)	Porcentagem relativa
Ácido Capróico	10,3	2,1
Ácido Caprílico	17,6	1,2
Ácido Cáprico	32,4	2,2
Ácido Láurico	38,7	2,1
Ácido Mirístico	43,8	6,4
Ácido Palmítico	45,8	23,5
Ácido Esteárico	47,5	14,4
Ácido Oleico	48,7	29,5
Outros		18,6

Como pode se observar, existe uma grande diferença entre os dois substratos pois o creme de leite de cabra possui uma maior concentração dos ácidos graxos de cadeia média (capróico, caprílico e cáprico) em relação ao creme de leite de vaca.

A linhagem nº 1099 de *Aspergillus sp.* selecionada para este trabalho apresentou produção de lipase com especificidade para ácidos graxos de cadeia média (COSTA 1996), que são os principais precursores das metilcetonas 2-pentanona, 2-heptanona e 2-nonanona as mais abundantes no aroma típico de "Blue Cheese" (PATTON 1950).

4.3. Extração das Metilcetonas

Na literatura é relatada a utilização de métodos clássicos de extração líquido/líquido usando diversos solventes ou misturas deles com a finalidade de separar as metilcetonas das mais diversas matrizes, tais como : queijos, meios de fermentação, entre outros (FRUTOS et. al. 1991)

Também são relatados métodos que utilizam a derivatização dos compostos carbonílicos presentes no aroma com o reagente 2,4 dinitrofenilhidrazina formando as respectivas hidrazonas que são então separadas dos outros constituintes e, em meio ácido, regeneram os compostos originais (SCHUWARTZ & PARKS 1963).

Mais recentemente foi descrita a metodologia que utiliza o “headspace” do meio de cultura e posterior análise por cromatografia gasosa. Esse método, dentre todos, parece ser o mais eficiente e prático para esse tipo de análise.

Todos esses métodos são quantitativos, no entanto, requerem uma laboriosa metodologia que muitas vezes tende a ser demorada e de custo elevado.

A metodologia desenvolvida neste trabalho utiliza a partição sólido/líquido aproveitando o adsorvente para substâncias lipofílicas, Extrelut (Merck) em colunas na proporção de 10 g do adsorvente para

cada 10 ml de solução aquosa. Depois de eluídos com solvente imiscível com água, no caso diclorometano, as soluções orgânicas podem ser diretamente injetadas em cromatógrafo gasoso.

A Tabela 4 ilustra o coeficiente de recuperação das principais metilcetonas estudadas utilizando a metodologia descrita.

TABELA 4 : Eficiência de recuperação das metilcetonas estudadas por extração sólido/líquido

Composto	Massa real adicionada (mg)	Massa recuperada (mg)	Porcentagem de recuperação (%)
2-Pentanona	100	98	98
2-Heptanona	100	97	97
2-Nonanona	100	99	99
2-Undecanona	100	98	98
6-metil-2-heptanona*	100	99	99

* padrão interno

O método proposto para extração das metilcetonas tem as vantagens de ser um método praticamente “quantitativo”, os índices de recuperação dos compostos em questão foram todos acima de 97%.

No entanto para maior segurança optamos por utilizar a correlação dos compostos estudados com um padrão interno adicionado intencionalmente durante o processo de extração das metilcetonas com a finalidade de garantir uma segura quantificação.

4.4. Identificação das principais Metilcetonas produzidas

4.4.1. Identificação por cromatografia gasosa acoplada a detetor seletivo de massas

As metilcetonas produzidas foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada a detetor seletivo de massas e os espectros obtidos para cada componente da amostra foi comparado com os de biblioteca de espectros de massas (espectroteca) de referência do equipamento (NIST). A margem de semelhança obtida para os compostos em questão foram sempre superiores a 90%.

Foram identificadas 4 principais metilcetonas, e podemos observar na figura 1 o cromatograma de uma amostra extraída do meio contendo creme de leite de cabra e os espectros de massas dos compostos encontrados.

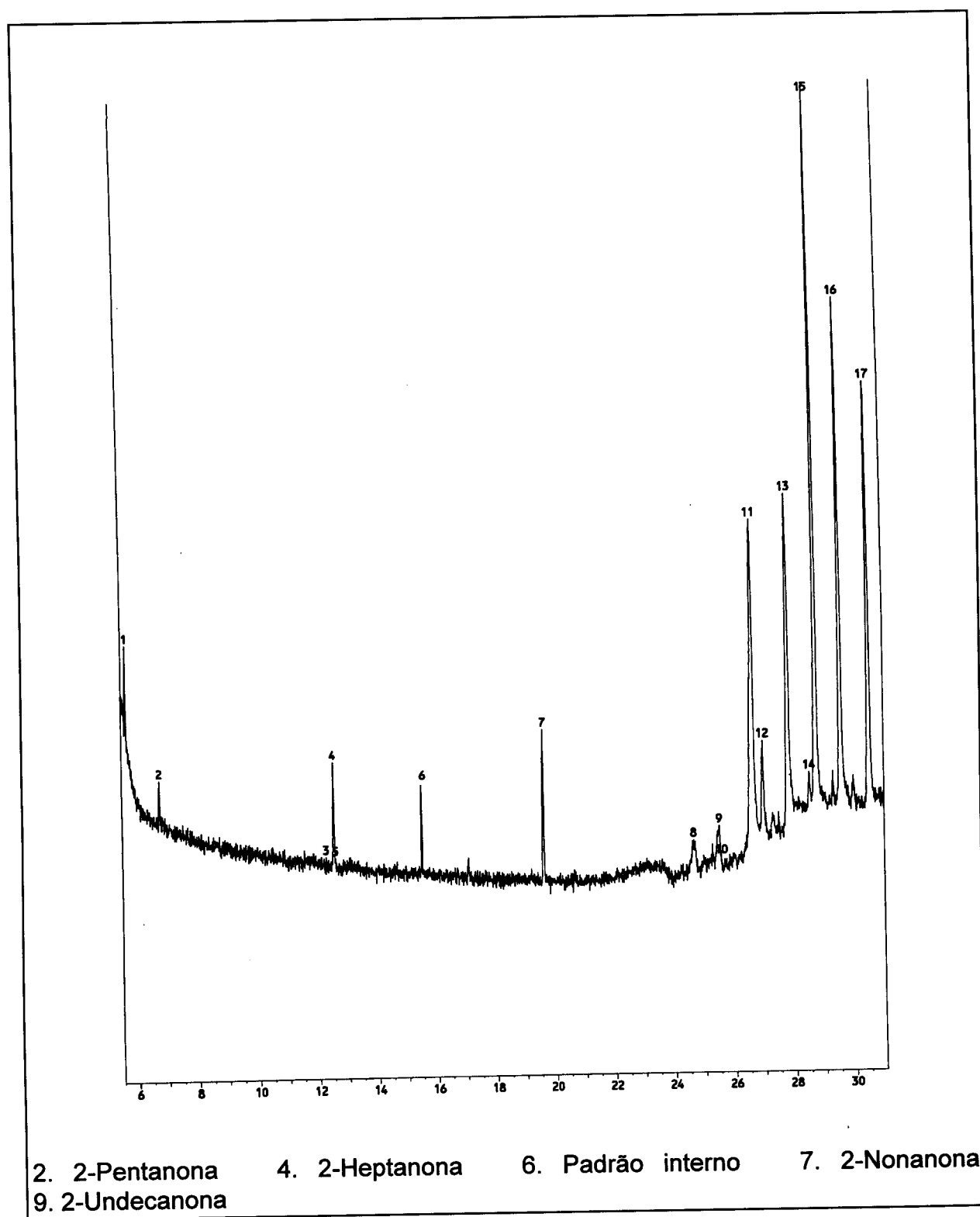


Figura 1 Cromatograma de creme de leite de cabra após incubação por 96 h. com suspensão enzimática bruta a 30°C e pH 4,5. (coluna capilar Shimadzu S5 60 m X 0,25 mm X 0,25 µm 60°C/2' elevado 4°C/min até 100°C/5' elevado 15°C/min até 300°C/5 'Injetor 250°C, Detetor 280°C, com potencial de ionização 72 eV .)

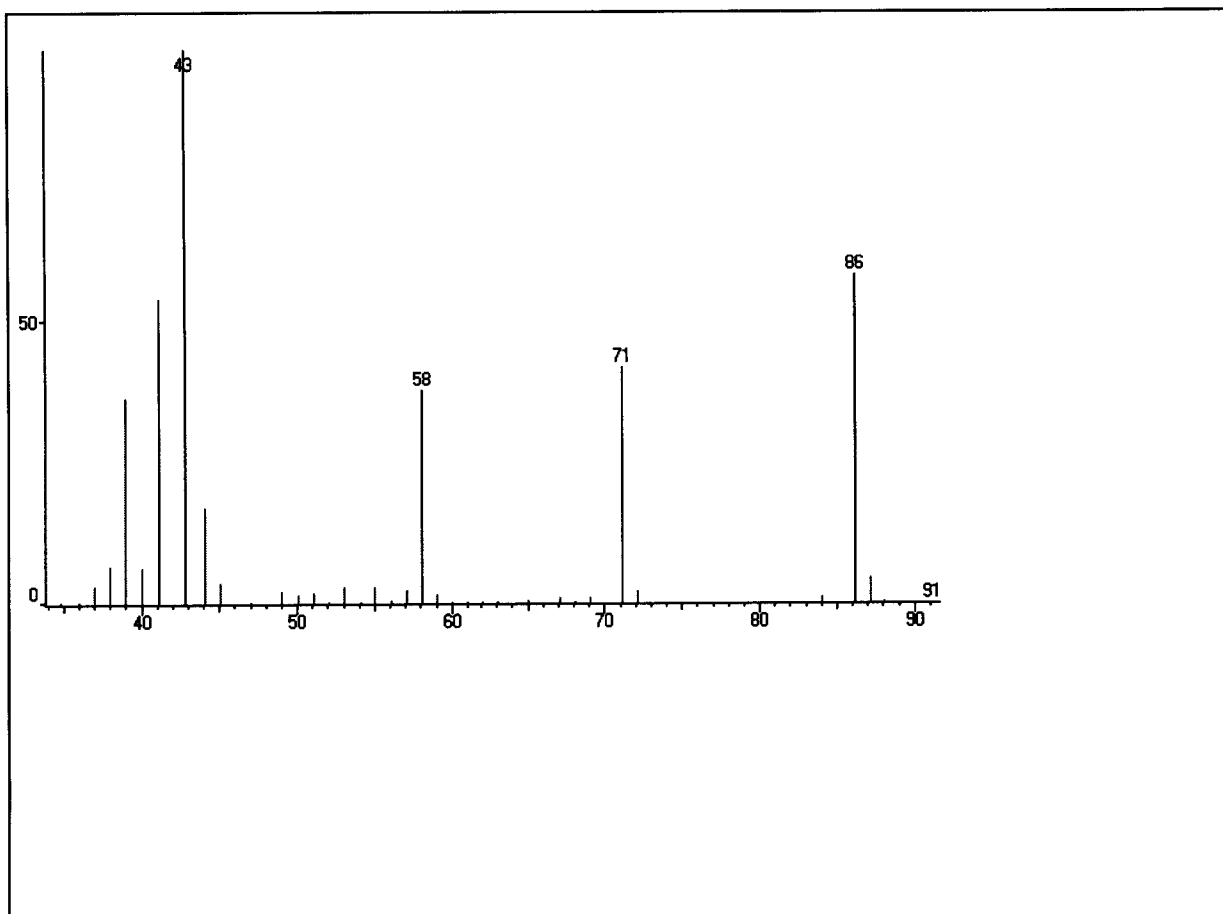


Figura 2 - Espectro de massas de 2-Pentanona encontrada em amostra produzida com creme de leite de cabra, pH 4,5, 30°C e suspensão enzimática bruta (coluna capilar Shimadzu S5 60 m X 0,25 mm X 0,25 μ m 60°C/2' elevado 4°C/min até 100°C/5' elevado 15°C/min até 300°C/5 'Injetor 250°C, Detetor 280°C, com potencial de ionização 72 eV .)

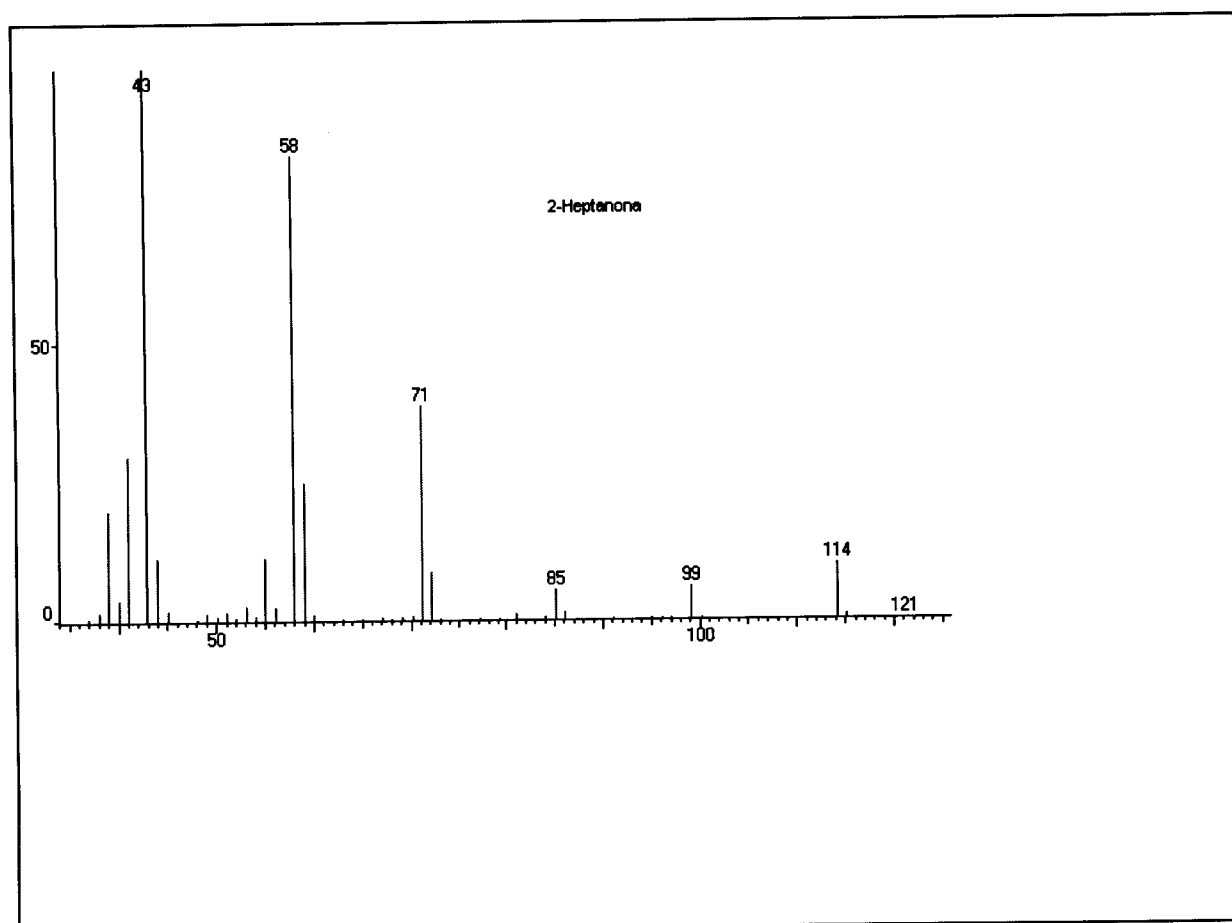


Figura 3 - Espectro de Massas de 2-Heptanona encontrada em amostra produzida com creme de leite de cabra, pH 4,5, 30°C e suspensão enzimática bruta (coluna capilar Shimadzu S5 60 m X 0,25 mm X 0,25 μ m 60°C/2' elevado 4°C/min até 100°C/5' elevado 15°C/min até 300°C/5 'Injetor 250°C, Detetor 280°C, com potencial de ionização 72 eV .)

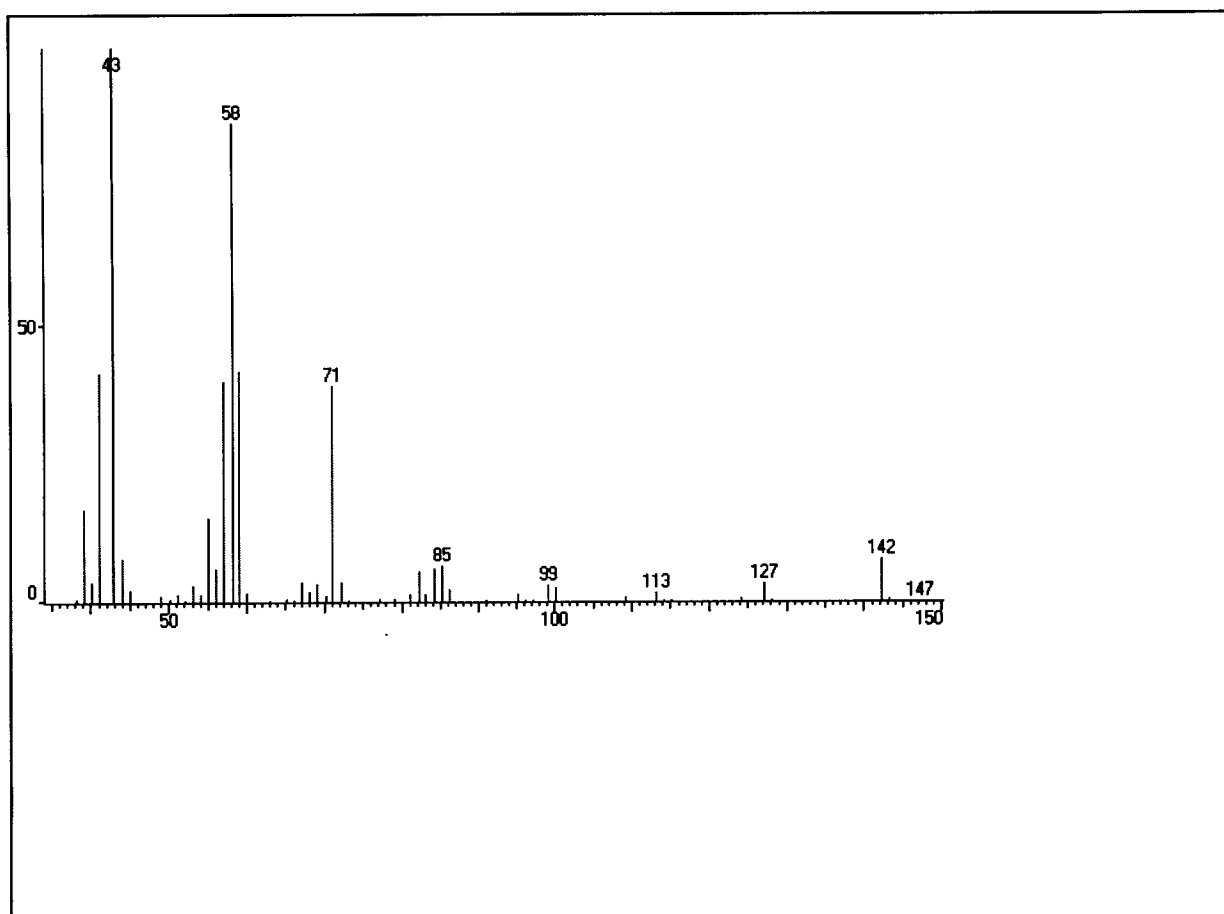


Figura 4 - Espectro de Massas de 2-Nonanona encontrada em amostra produzida com creme de leite de cabra, pH 4,5, 30°C e suspensão enzimática bruta (coluna capilar Shimadzu S5 60 m X 0,25 mm X 0,25 μ m 60°C/2' elevado 4°C/min até 100°C/5' elevado 15°C/min até 300°C/5 'Injetor 250°C, Detetor 280°C, com potencial de ionização 72 eV .)

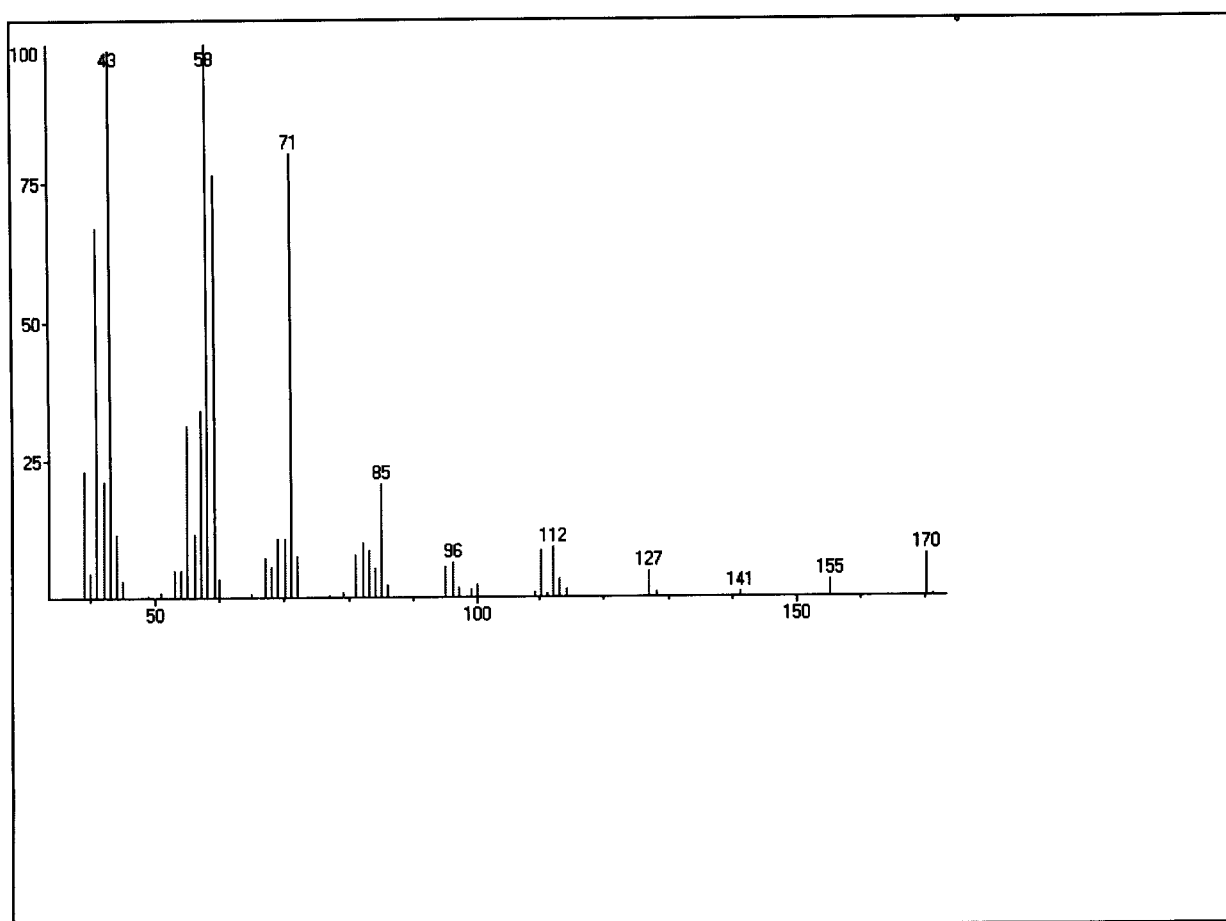


Figura 5 - Espectro de Massas de 2-Undecanona encontrada em amostra produzida com creme de leite de cabra, pH 4,5, 30°C e suspensão enzimática bruta (coluna capilar Shimadzu S5 60 m X 0,25 mm X 0,25 μ m 60°C/2' elevado 4°C/min até 100°C/5' elevado 15°C/min até 300°C/5 'Injetor 250°C, Detetor 280°C, com potencial de ionização 72 eV .)

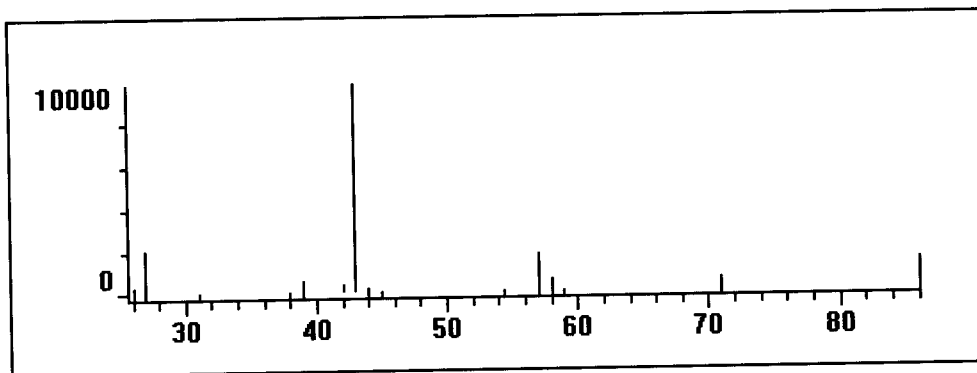


Figura 6 - Espectro de Massas de 2-Pentanona padrão

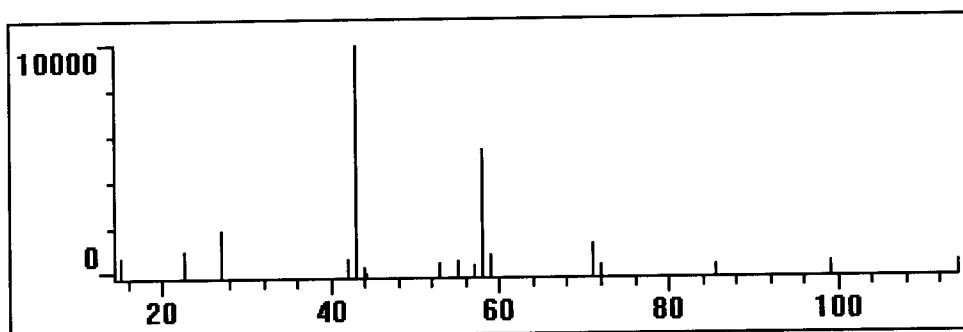


Figura 7 - Espectro de Massas de 2-Heptanona padrão

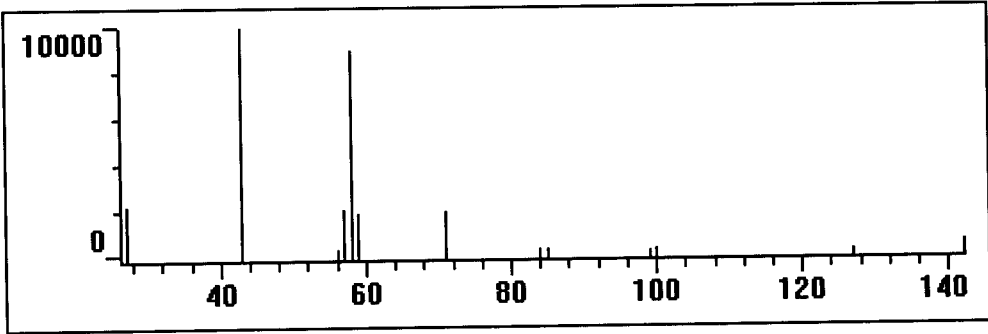


Figura 8 - Espectro de Massas de 2-Nonanona padrão

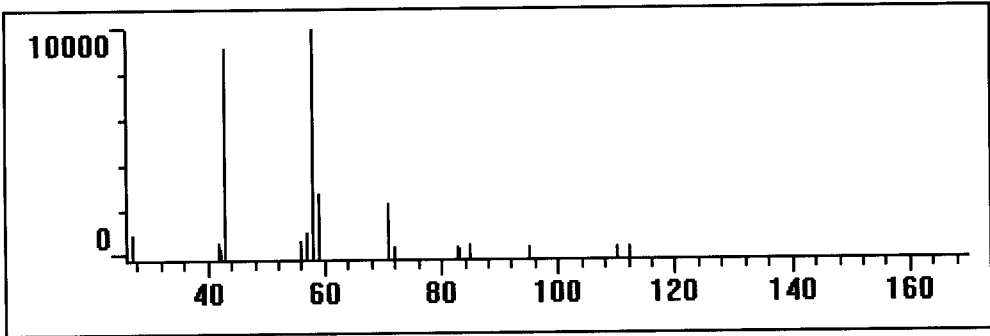


Figura 9 - Espectro de Massas de 2-Undecanona padrão

4.4.2. Identificação das Metilcetonas por comparação do Índice de Retenção

Metilcetonas foram eluídas juntamente com uma mistura de hidrocarbonetos lineares o que permitiu conhecer os índices de retenção dos padrões autênticos e assim com a eluição da amostra produzida foi possível obter os índices de retenção dos compostos indicados pela cromatografia gasosa acoplada a detetor seletivo de massas, como sendo as metilcetonas em questão.

A Tabela abaixo descreve dos dados obtidos

TABELA 5: Índice de retenção das metilcetonas estudadas

Composto	Índice de Retenção do Padrão	Índice de Retenção da amostra*
2-pentanona	678	676
2-heptanona	890	891
2-nonanona	1099	1097
2-undecanona	1274	1270

* amostra produzida com creme de leite de cabra, pH 4,5 por 96 horas a 30°C.

4.5. Efeito do tipo de substrato na produção de metilcetonas

Os ácidos graxos são os precursores das metilcetonas, principais constituintes do aroma de "Blue Cheese" . Assim buscou-se determinar qual seria o melhor substrato para a produção destas metilcetonas, escolhendo os substratos creme de leite de vaca, creme de leite de cabra e o produto comercial Edenor EV 85 KR (Henkel).

A gordura do leite de cabra é rica nos ácidos graxos de cadeia média, os precursores das principais metilcetonas encontradas no aroma do queijo, No entanto, o creme de leite de vaca é um produto de custo inferior ao creme de leite de cabra e pode ser encontrado com mais abundância.

O substrato Edenor EV 85 KR é uma mistura de triglicerídeos de ácido capróico e caprílico e testamos sua capacidade com relação a produção das metilcetonas 2-pentanona e 2-heptanona.

4.5.1. Utilização do substrato Creme de Leite de Cabra

A Figura 10 ilustra a produção das metilcetonas quando se utiliza como substrato creme de leite de cabra.

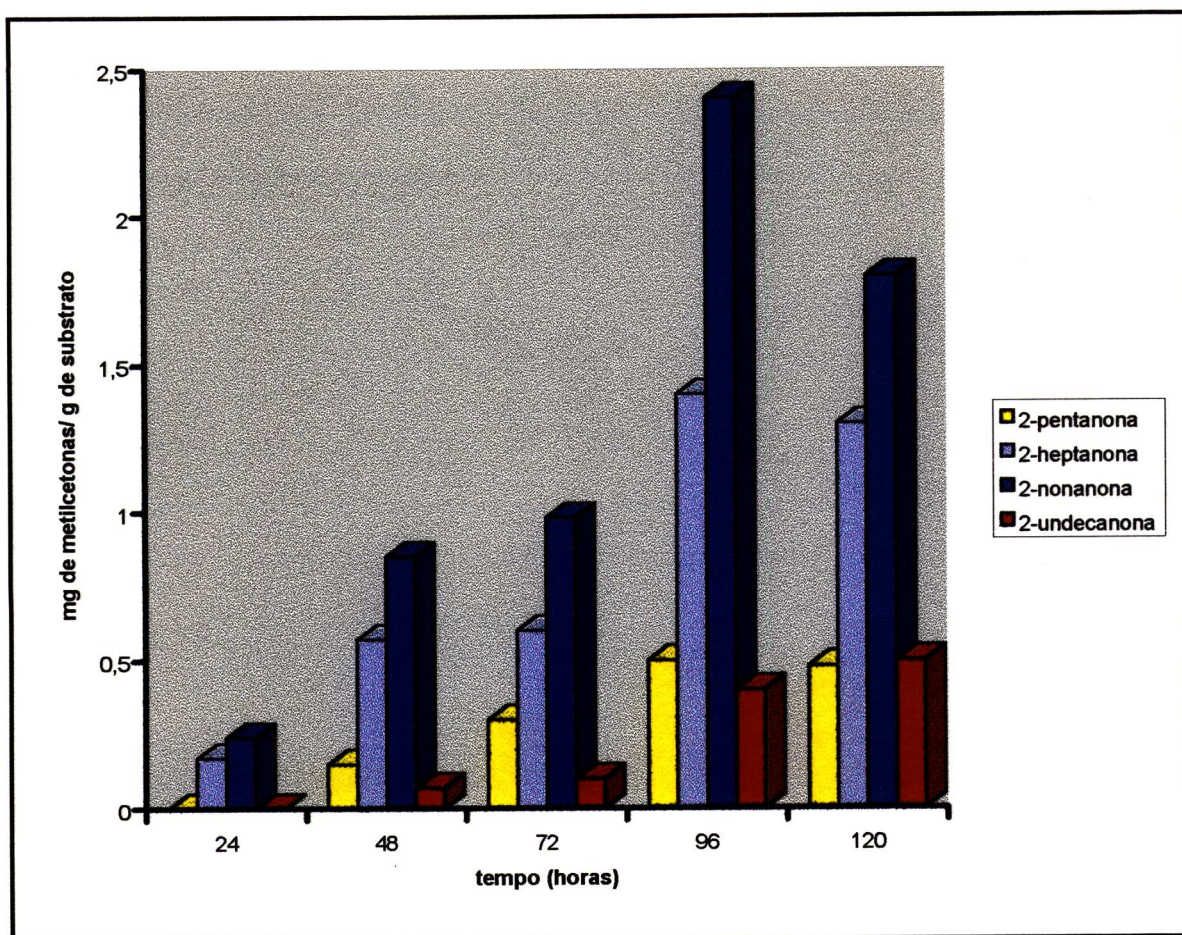


FIGURA 10- Principais metilcetonas produzidas utilizando-se creme de leite de cabra, 30°C e pH 4,5 (tampão acetato 0,05M)

4.5.2. Utilização do substrato Creme de Leite de Vaca

A figura 11 mostra a produção de metilcetonas utilizando-se como substrato creme de leite de vaca.

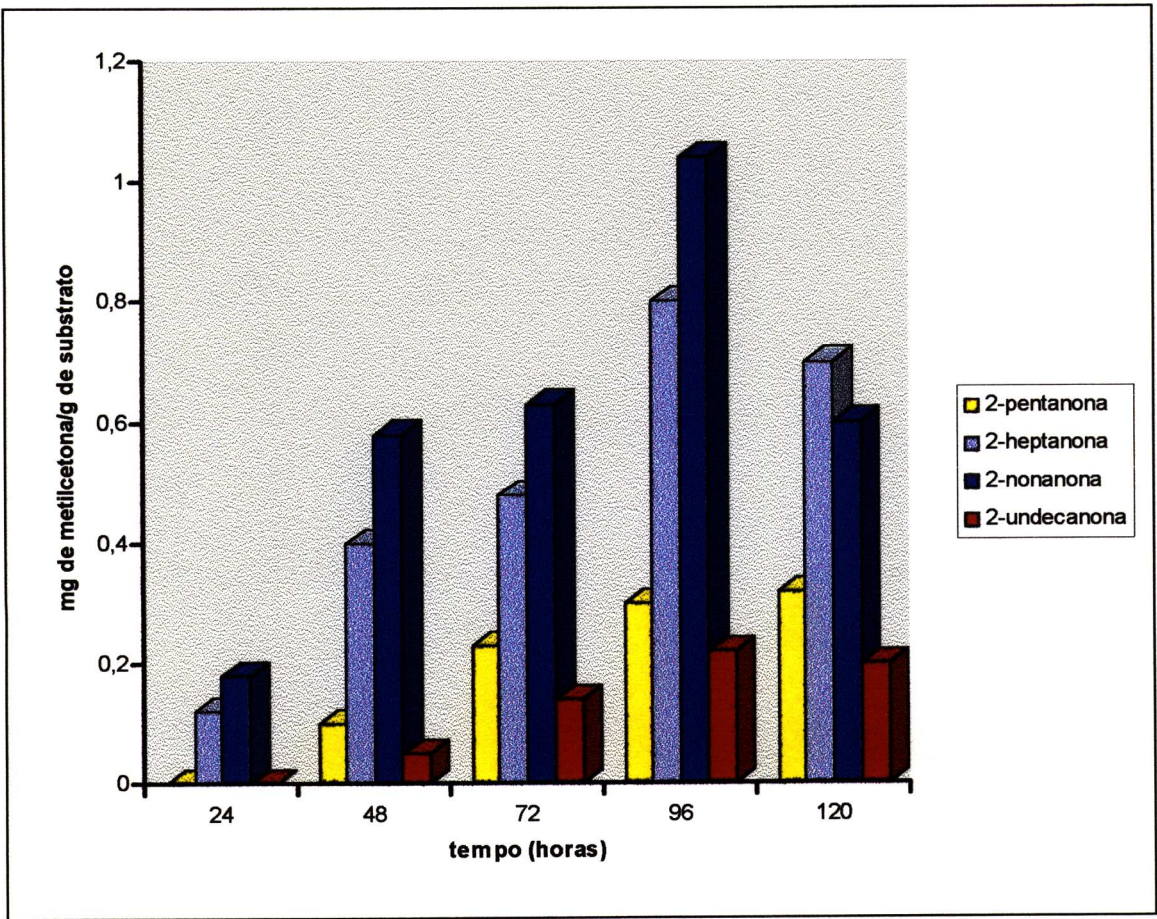


FIGURA 11- Principais metilcetonas produzidas utilizando-se creme de leite de vaca, 30°C e pH 4,5 (tampão acetato 0,05M)

O mesmo perfil de produção de metilcetonas foi encontrado utilizando-se os substratos creme de leite de cabra ou vaca, no entanto com

creme de leite de cabra houve um nível de formação muito superior ao de vaca.

Isso talvez pela presença de uma maior quantidade de ácidos graxos de cadeia média (capróico, caprílico e cáprico) no substrato creme de leite de cabra. Isso tornaria a concentração desses ácidos maior após a atuação da lipase sobre os triglicerídeos promovendo uma maior produção de metilcetonas.

Utilizando-se somente como substrato uma mistura de triglicerídeos de ácido capróico e caprílico do qual é formado o produto comercial Edenor EV 85 KR (HENKEL) não houve formação de qualquer metilcetona nas condições testadas, como também não se observou nenhum crescimento do microrganismo quando nos experimentos estavam presentes os esporos.

Os creme de leite de cabra e de vaca apresentam, além dos triglicerídeos do leite, uma quantidade considerável de proteínas do leite (aproximadamente 10%) e também de lactose (aproximadamente 3%) o que favorece o crescimento microbiano, compostos estes que não se encontravam presentes no meio quando se utilizou Edenor EV 85 KR, o que provavelmente não permitiu a germinação dos esporos e conseqüente produção de metilcetonas.

FAN et. al. (1976) utilizaram água de maceração de milho e sacarose (1,5%) para o crescimento de esporos de *P. roqueforti* e utilizaram ácido octanóico como substrato precursor para 2-heptanona.

LAWRENCE (1967) observou que a adição de alguns aminoácidos estimulam a formação de metilcetonas por esporos de *P. roqueforti*.

Galactose, Glicose e Xilose, entre outros, quando adicionados ao meio, também aumentam a taxa de conversão dos ácidos graxos até as respectivas metilcetonas.

DARTEY & KINSELLA (1973a) utilizaram esporos de *P. roqueforti* para biocenvensão de palmitato de sódio em metilcetonas. A adição de Glicose e Prolina favoreceram a produção dos compostos carbonílicos.

4.6. Efeito da concentração do substrato (Creme de Leite de Cabra) na produção de 2-nonanona

Tentando-se otimizar a relação sistema enzimático e substrato para a produção de metilcetonas estudaram-se várias concentrações de creme de leite de cabra e monitorou-se a concentração de 2-nonanona (a metilcetonas mais abundante).

A Figura seguinte mostra os resultados desse estudo.

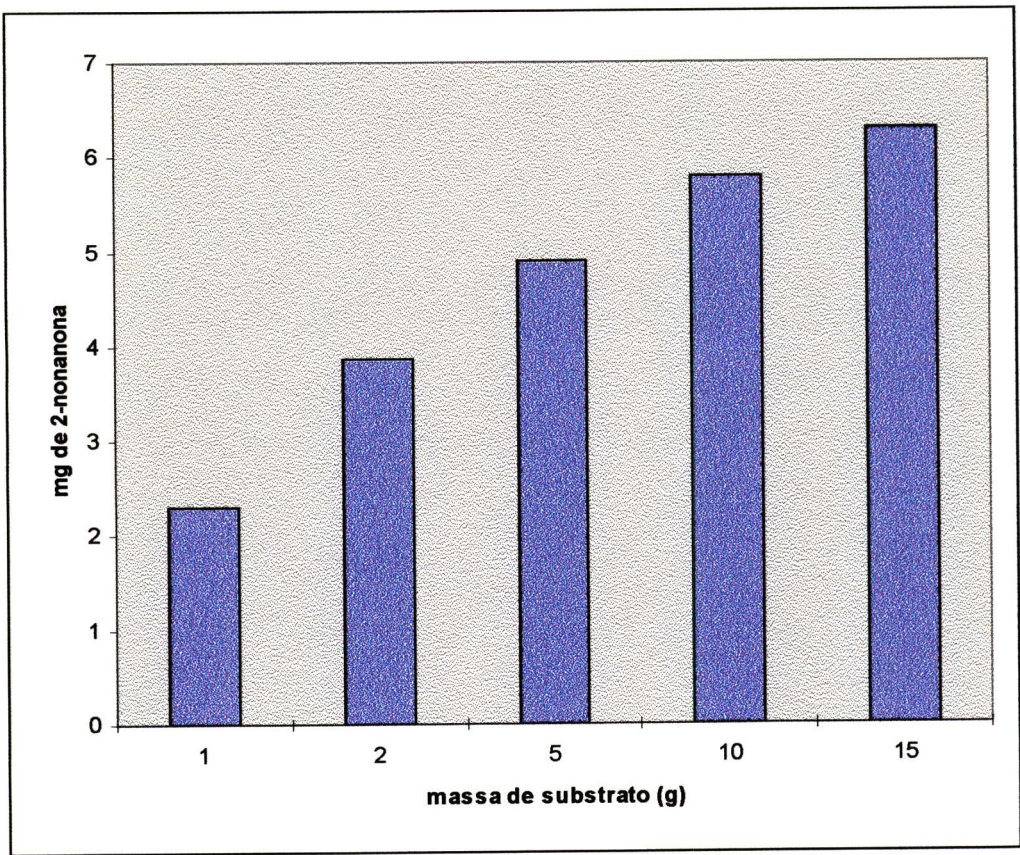


FIGURA 12 - Efeito da concentração de creme de leite de cabra na produção de metilcetonas por suspensão enzimática bruta (30°C , tampão acetato 0,05M pH 4,5 durante 96 horas).

Com os dados obtidos anteriormente relacionou-se a produção de 2-nonanona com a massa de substrato utilizada, conseguindo-se dessa maneira, o rendimento por grama de 2-nonanona. A Figura 13 mostra essa relação.

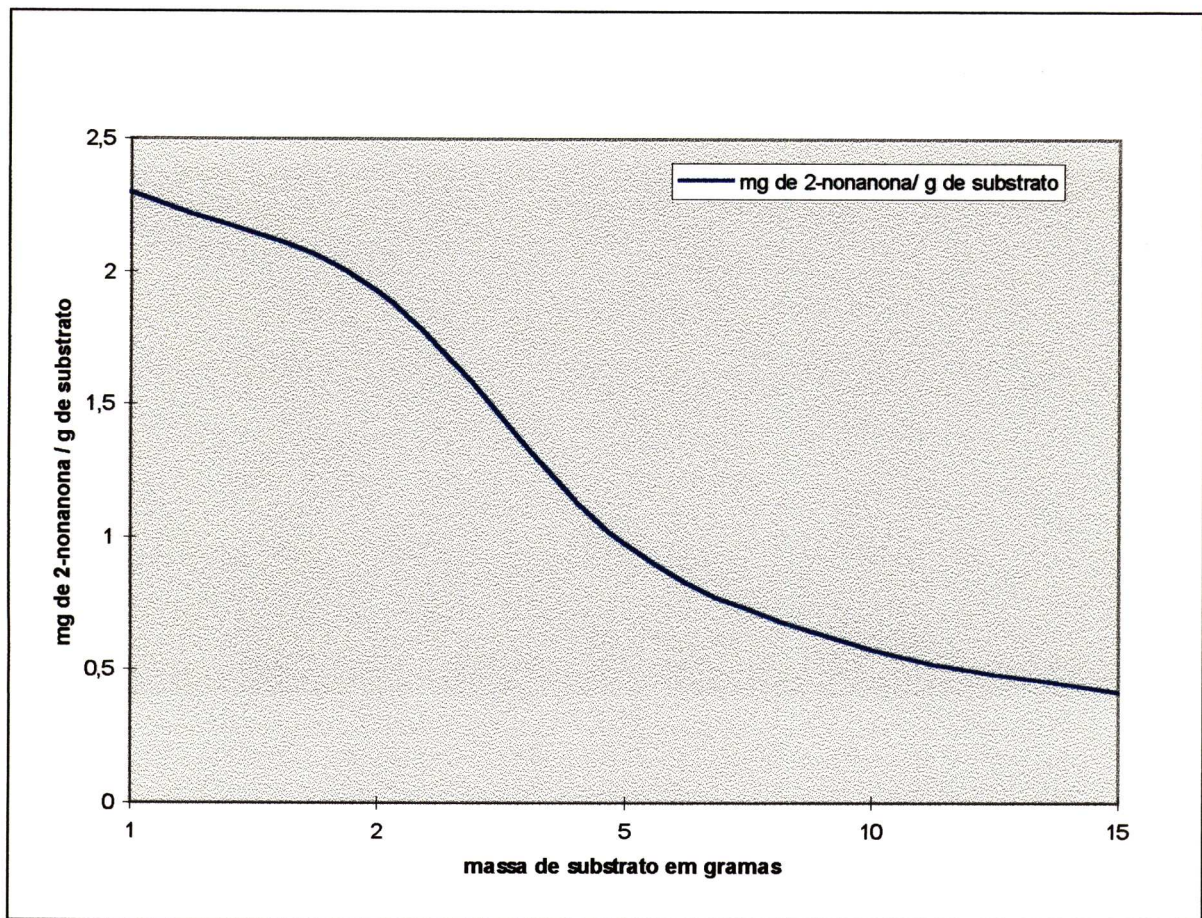


Figura 13 - Rendimento de 2-nonanona por grama de creme de leite de cabra (creme de leite de cabra, 30°C, pH 4,5 , 96 horas)

Como pode ser observado, a maior quantidade de 2-nonanona encontrada foi quando se trabalhou com 15 g de substrato, no entanto a

taxa de bioc conversão foi maior no experimento que utilizou 1 g de creme de leite de cabra.

4.7. Efeito do pH na produção de 2-nonanona

Com o intuito de se verificar o efeito do pH inicial do meio na produção de metilcetonas foram analisados os substratos creme de leite de vaca e de cabra nos seguintes valores de pH 4.0, 4.5, 5.0, 6.0 .

4.7.1. Substrato Creme de Leite de Vaca

A figura 14 mostra os resultados obtidos utilizando-se creme de leite de vaca, suspensão enzimática bruta e 30°C por 96 horas de reação.

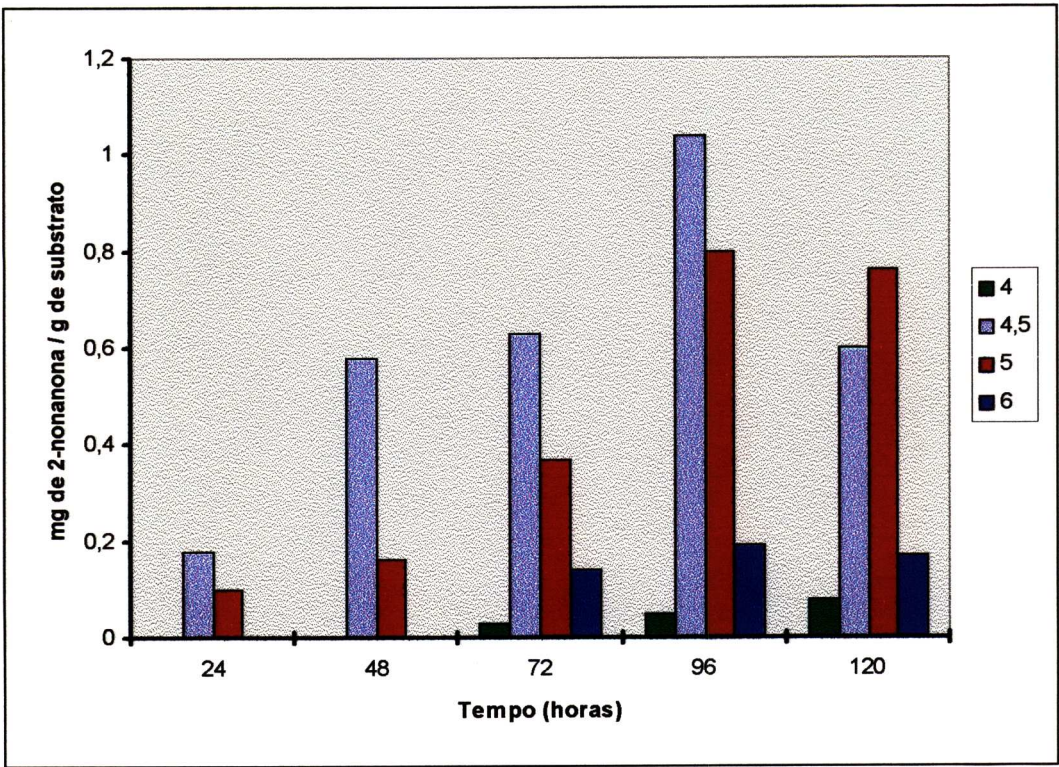


FIGURA 14 - Efeito do pH na produção de metilcetonas por suspensão enzimática bruta (30°C) e creme de leite de vaca.

4.7.2. Substrato Creme de Leite de Cabra

A figura 15 mostra os resultados obtidos utilizando-se creme de leite de cabra, suspensão enzimática bruta e 30°C por 96 horas de reação.

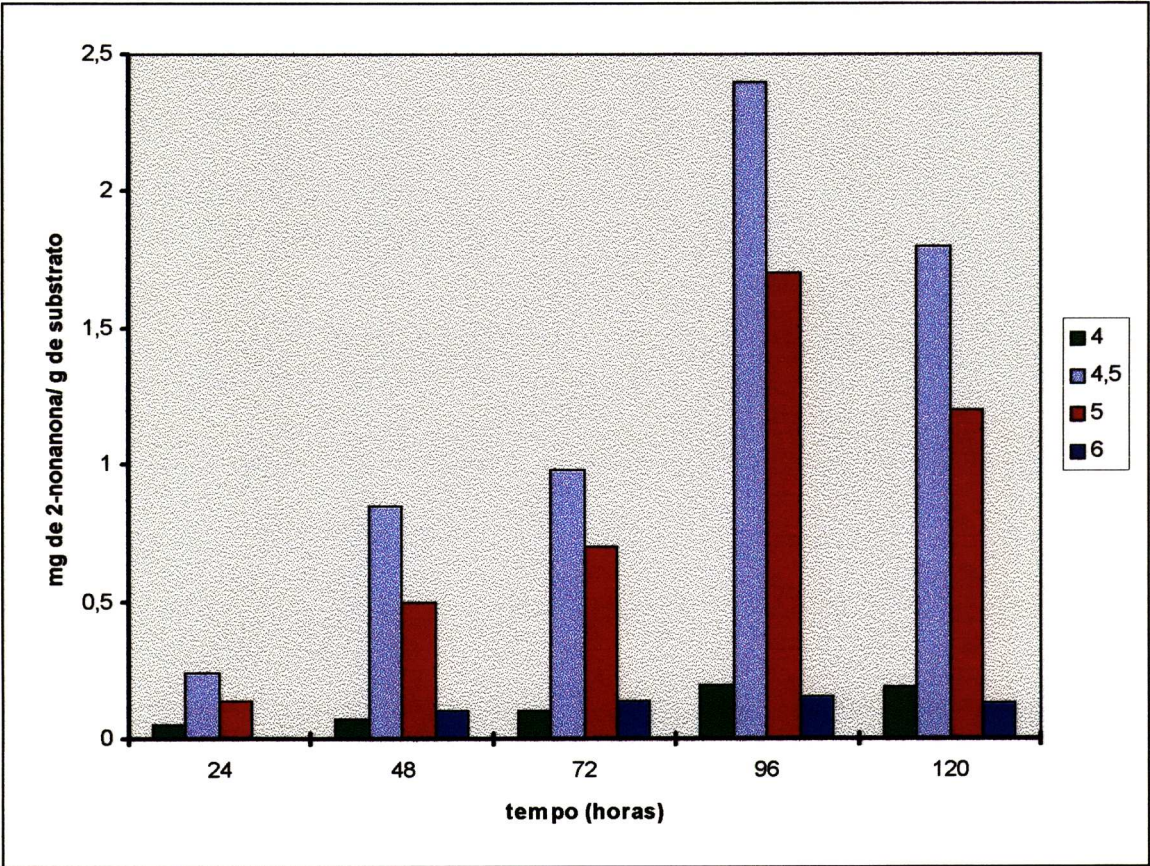


FIGURA 15 - Efeito do pH na produção de metilcetonas por suspensão enzimática bruta (30°C) e creme de leite de cabra.

O pH ótimo da lipase da linhagem de *Aspergillus sp.* estudada por COSTA (1996), foi de 6,0. No entanto, percebe-se pelas figuras 14 e 15

que o pH inicial do sistema de reação mais indicado para ambos os substratos testados foi de 4,5.

Isso nos leva a deduzir que o complexo enzimático oxidativo dos ácidos graxos até metilcetonas atua numa faixa de pH diferente da faixa de atividade da lipase extracelular.

DARTEY & KINSELLA (1973b) obtiveram os melhores resultados trabalhando com esporos de *P. roqueforti* na presença de Glicose e pH 6,5. Foi estudada a bioc conversão de palmitato de sódio à uma série de metilcetonas.

NELSON (1970) desenvolveu uma metodologia de produção de aroma concentrado de "Blue Cheese" e utilizou pH na faixa de 4,5 a 5,5.

DWIDEDI & KINSELLA (1974a) incubaram micélio de *P. roqueforti* em pH 4,5 - 5 e obtiveram várias metilcetonas quando o substrato foi gordura de leite previamente lipolisada.

4.8. Efeito da Temperatura na produção de Metilcetonas

Para se verificar o efeito da temperatura na produção de metilcetonas realizaram-se experimentos nas temperaturas de 25, 30, 35 e 40°C utilizando-se os substratos creme de leite de vaca e de cabra.

4.8.1. Substrato Creme de Leite de Vaca

Os dados obtidos nos experimentos visando a identificação da temperatura ótima para produção de metilcetonas utilizando-se creme de leite de vaca como substrato estão demonstrados na Figura 16.

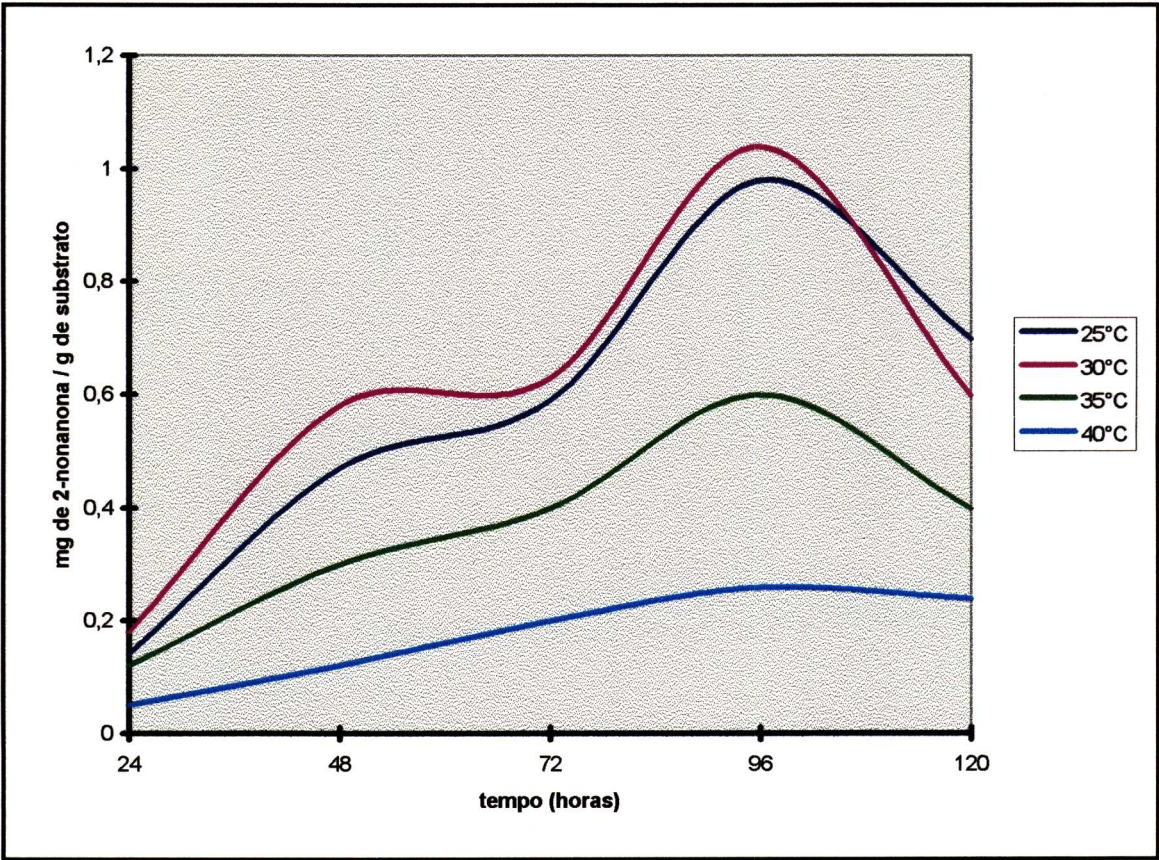


FIGURA 16 - Efeito da temperatura na produção de metilcetonas (tampão acetato 0,05M pH 4,5) e creme de leite de vaca.

4.8.2. Substrato Creme de Leite de Cabra

Os dados obtidos nos experimentos, visando identificar a temperatura ótima para produção de metilcetonas, utilizando creme de leite de cabra como substrato, estão descritos na Figura 17.

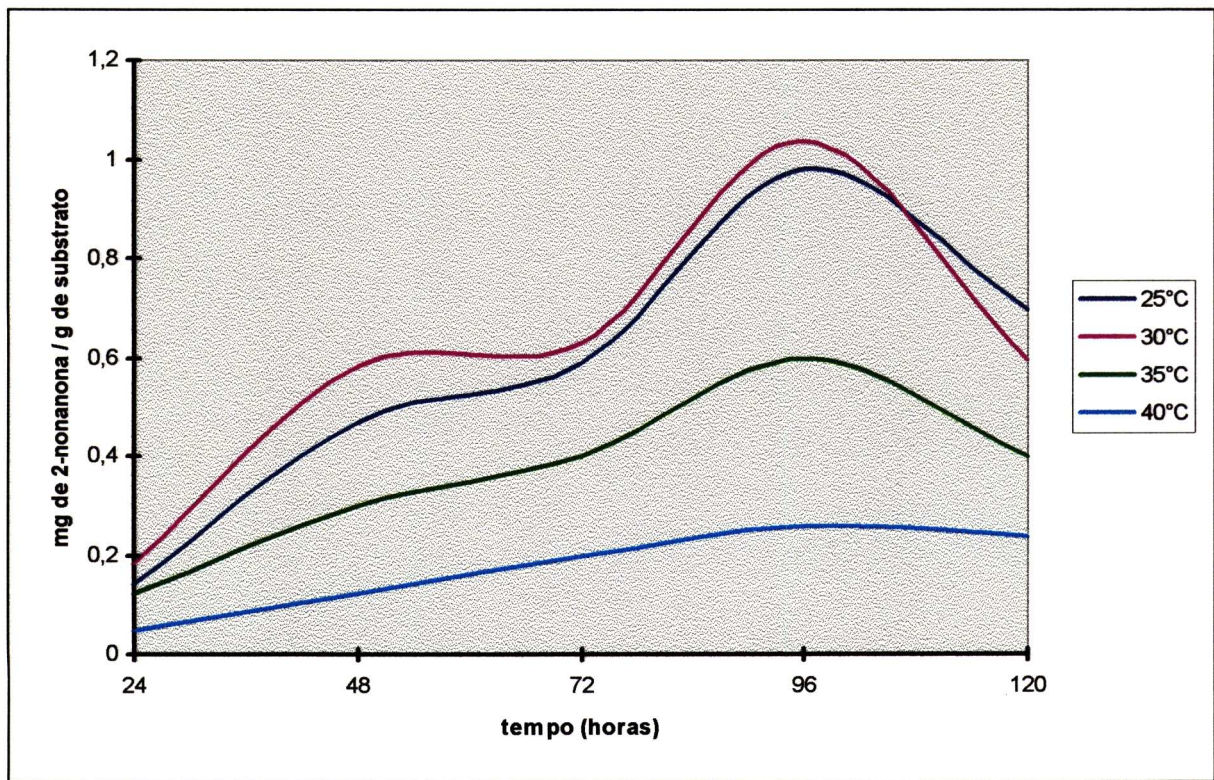


FIGURA 17 - Efeito da temperatura na produção de metilcetonas (tampão acetato 0,05M pH 4,5) e creme de leite de cabra.

Da mesma maneira que ocorreram diferenças na faixa de pH ótimo, entre a atividade lipolítica e a produção de metilcetonas, a faixa de temperatura ótima para produção das metilcetonas, também foi diferente da faixa ótima da atividade lipolítica.

DWIDEDI & KINSELLA (1974b) estudaram a produção de metilcetonas por micélio de *P. roqueforti* a partir de um meio composto de água de maceração de milho, sacarose e gordura de leite lipolisada numa temperatura de 25°C obtendo-se um preparado com características sensoriais próximas ao do queijo comercial.

DOLEZALEK (1969) estudou a formação de metilcetonas por *P. roqueforti* em meio Czapek-Dox adicionado de gordura de leite utilizando a temperatura de 15°C durante um período médio de 40 dias, onde o produto final obtido poderia ser substituto do aroma natural do queijo.

4.9. Efeito do Tempo de incubação na produção de metilcetonas

Todos os experimentos foram feitos retirando-se amostras a cada 24 horas de incubação, do sistema de reação, durante um período total de 120 horas.

Foi verificado que o tempo de incubação mais adequado para a produção das metilcetonas foi de 96 horas, onde se pode observar uma maior concentração de todas as metilcetonas estudadas nesse trabalho.

A Tabela 6 mostra os dados obtidos com relação ao tempo de incubação para creme de leite de cabra, a 30°C e pH 4,5.

Tabela 6 - Efeito do tempo de incubação na produção de metilcetonas (creme de leite de cabra, 30°C, tampão acetato 0,05M pH 4,5).

Metilcetonas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
mg de 2-nonanona/g de substrato					
Pentanona	0	0,2	0,5	0,7	0,6
Heptanona	0,5	0,7	1,3	1,9	1,5
Nonanona	0,7	1,2	1,6	2,2	1,7
Undecanona	0	0	0,2	0,5	0,5

4.10. Efeito da Presença de Esporos na produção de Metilcetonas

A literatura cita a produção de metilcetonas por fungos filamentosos, tanto na forma de micélio, quanto de esporo.

De acordo com EATON (1994) o micélio tem a vantagem de produzir lipase em grande quantidade o que favorece a utilização dos ácidos graxos presentes nos substratos, geralmente gordura de leite. O esporo, apesar de não ser capaz de produzir lipase, produz um aroma mais fiel ao natural que o micélio. No entanto se faz necessária a adição de uma lipase comercial em paralelo à adição do esporo ou então a adição de uma gordura previamente lipolisada. Ambos os processos tem desvantagens, sendo que o primeiro encarece o produto final e o segundo, num primeiro instante, a concentração de ácidos graxos livres é muito grande o que tende a inibir o crescimento do microrganismo.

Visando otimizar um sistema para produção de metilcetonas estudaram-se várias preparações para aproveitar a grande habilidade do esporo em produzir metilcetonas e também da capacidade dessa linhagem produzir uma lipase com atividade bastante elevada frente a ácidos graxos de cadeia média (capróico, caprílico e cáprico).

4.10.1. Produção de Metilcetonas por Suspensão Enzimática Bruta livre de Esporos

Foi utilizado, neste estudo, o mesmo sistema de reação para as duas suspensões descritas anteriormente e foi adicionada uma suspensão

enzimática bruta livre de esporos. Foi observada a formação de uma série de ácidos graxos livres, sem, no entanto, se observar a produção de qualquer metilcetona.

Esse resultado nos leva a considerar que a presença dos esporos é de fundamental importância no sistema de produção de metilcetonas.

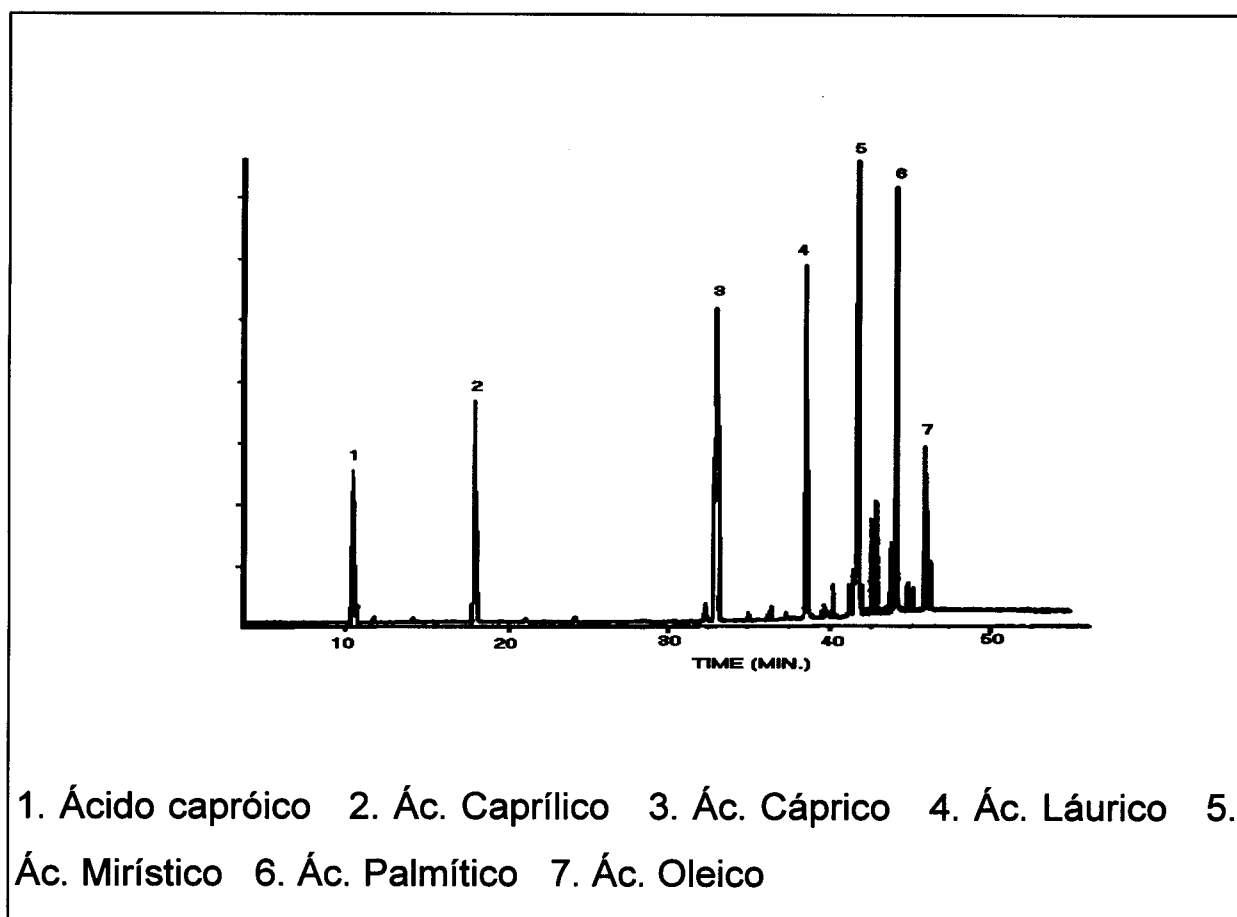


Figura 18 - Produto de biocatálise de creme de leite de cabra com suspensão enzimática livre de esporos (30°C, pH 4,5 , 96 horas).

4.10.2. Efeito da concentração de esporos na produção de 2-nonanona

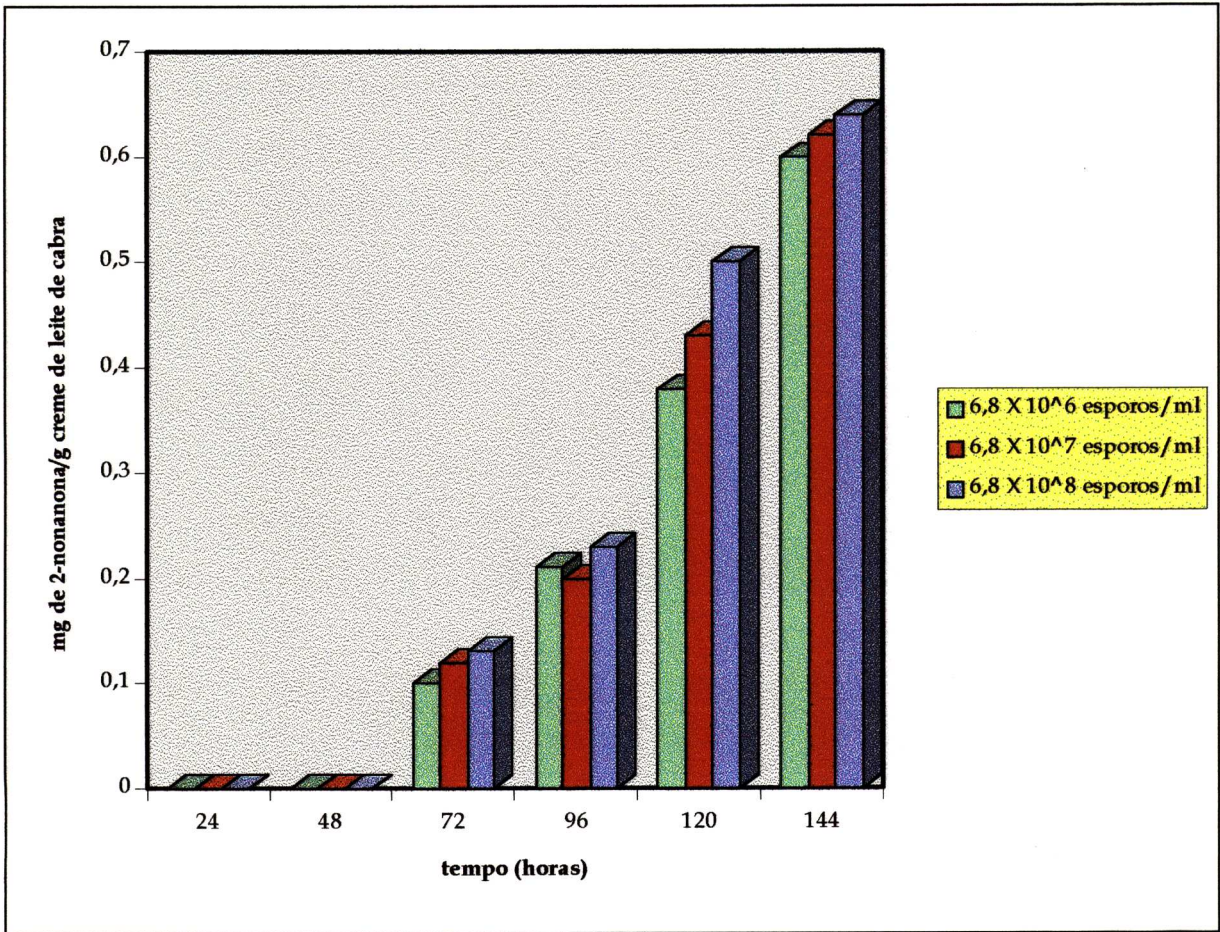


FIGURA 19 - Efeito da concentração dos esporos na produção de metilcetonas (creme de leite de cabra, 30°C e tampão acetato pH 4,5 0,05M)

Pode-se observar que, na ausência dos esporos, não ocorre a produção de metilcetonas, utilizando-se como substrato creme de leite de cabra.

No entanto, quando se utiliza uma suspensão de esporos, sem adição de nenhuma lipase, observa-se a formação de metilcetonas em níveis inferiores aos produzidos pela mistura enzima/esporo.

Pode-se verificar também que o tempo para início de produção de metilcetonas é maior usando-se somente os esporos.

Assim, um sistema de reação que contenha esporos da linhagem selecionada e lipase torna-se fundamental para uma produção rápida e eficiente de metilcetonas.

4.11. Comparação entre Suspensão Enzimática Bruta versus Suspensão Enzimática Liofilizada quanto a produção de metilcetonas

No sentido de se verificar a eficiência dos diferentes sistemas de reação para produção de metilcetonas, foi estudado o rendimento de produção de 2-nonanona pelas suspensões enzimáticas bruta e bruta liofilizada nos substratos creme de leite de cabra e de vaca.

4.11.1. Substrato Creme de Leite de Cabra

Utilizando-se o substrato creme de leite de cabra quantificou-se a produção de 2-nonanona pelas suspensões enzimáticas bruta e bruta liofilizada e os resultados estão descritos na Figura 20.

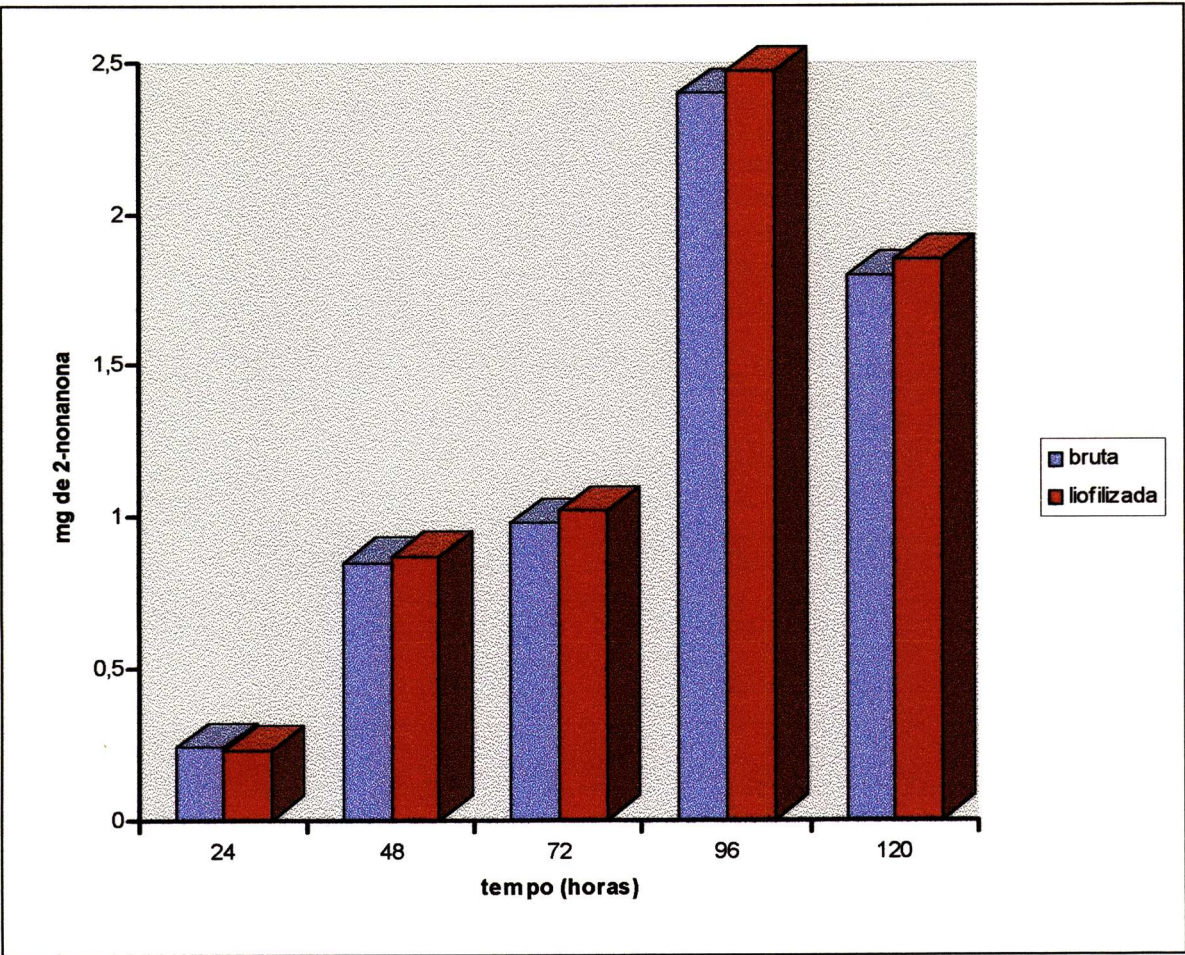


FIGURA 20 - Comparação entre suspensão enzimática bruta e suspensão enzimática bruta liofilizada na produção de metilcetonas (creme de leite de cabra, 30°C e tampão acetato 4,5 0,05M)

4.11.2. Substrato Creme de Leite de Vaca

Utilizando-se o substrato creme de leite de vaca quantificou-se a produção de 2-nonanona pelas suspensões enzimáticas bruta e bruta liofilizada e os resultados estão descritos na Figura 21.

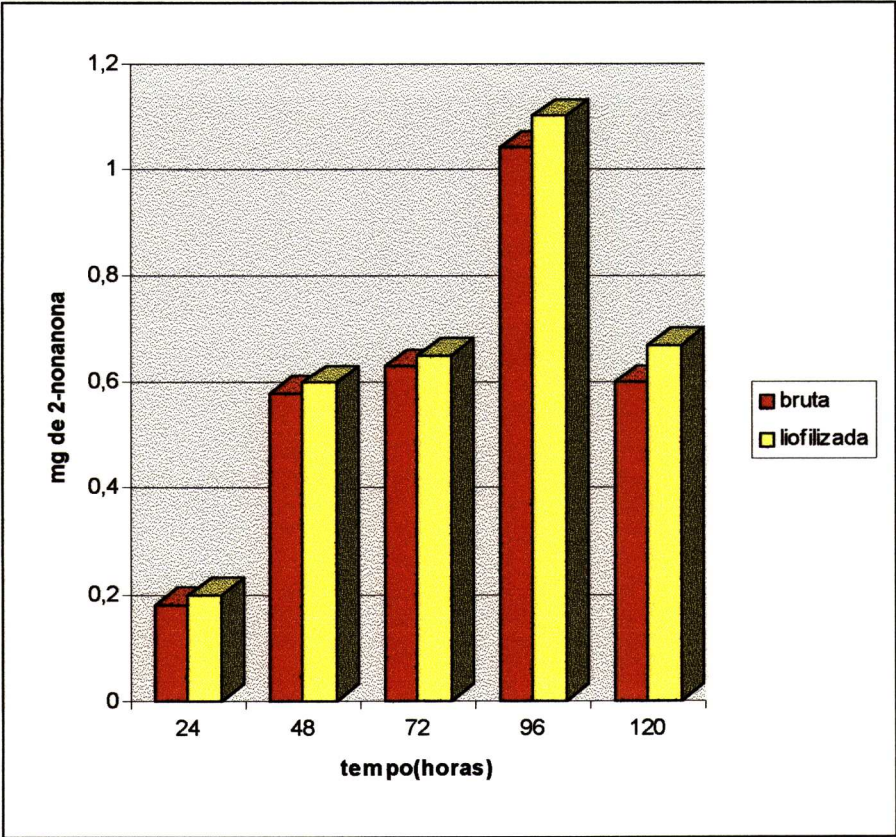


FIGURA 21 - Comparação entre suspensão enzimática bruta e suspensão enzimática bruta liofilizada na produção de metilcetonas (creme de leite de vaca, 30°C e tampão acetato 4,5 0,05M)

Os melhores sistemas para produção de metilcetonas a partir de substrato a base de triglicerídeos são aqueles que conjugam a ação hidrolítica de lipase extracelular e da excelente habilidade dos esporos em transformar os ácidos graxos livres, produtos da hidrólise da lipase, em metilcetonas.

Os sistemas que apresentam estas características são suspensão enzimática bruta e suspensão enzimática bruta liofilizada.

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi realizado o estudo de uma nova linhagem de *Aspergillus sp.* n° 1099 ainda não relatada na literatura , visando a produção de aroma natural concentrado de "Blue Cheese" sendo estudados alguns parâmetros fundamentais para a produção desse aroma, tais como, melhor substrato, tempo, temperatura e pH.

Foram identificadas quatro metilcetonas (2-pentanona, 2-heptanona, 2-nonanona e 2-undecanona) produzidas por esse microrganismo, utilizando-se como substrato creme de leite de cabra e de vaca. Utilizou-se a técnica de cromatografia gasosa acoplada a detetor seletivo de massas em conjunto com o índice de retenção dos compostos em análise, confirmando-se assim a identidade dessas substâncias.

As maiores concentrações de 2-pentanona, 2-heptanona, 2-nonanona e de 2-undecanona foram 0.5, 1.4, 2.4 e 0.4 mg/g de creme de leite de cabra respectivamente, numa temperatura de 30°C durante 96 horas.

O substrato creme de leite de cabra apresentou uma concentração de ácidos graxos de cadeia média (capróico, caprílico e cáprico) maior que a de creme de leite de vaca, 2,3 e 1,2 mg de 2-nonanona/g de substrato respectivamente, apresentando-se como um substrato mais eficiente para a produção de metilcetonas.

Observou-se que mudanças no pH inicial do meio interferiram na produção das metilcetonas sendo pH 4,5 o que apresentou maior concentração de metilcetonas.

A temperatura ótima de produção das metilcetonas foi de 30°C, embora na temperatura de 25°C tenha se encontrado concentrações de metilcetonas muito semelhantes às de 30°C e também o perfil das metilcetonas formadas foi muito semelhante.

A maior concentração de metilcetonas foi encontrada em aproximadamente 96 horas de incubação.

Constatamos que uma associação de esporos e lipase é fundamental para uma rápida e eficiente produção de metilcetonas a partir de triglicerídeos. O esporo sozinho é capaz de produzir metilcetonas, no entanto, em concentrações inferiores à mistura esporo/enzima. Uma suspensão da lipase bruta livre de esporos é incapaz de produzir metilcetonas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, D. F. ; DAY, E. A.; Gas chromatographic and Mass spectral identification of Natural Components of the Aroma Fraction of Blue Cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 13, n° 1, p. 2-4 1965
- ANDERSON, D. F. ; DAY, E. A.; Quantitative analysis of the major free fatty acids in Blue Cheese. *Journal of Dairy Science*, v. 48, n° 2, p. 248-249 1965
- ANDERSON, D. F. ; DAY, E. A.; Quantitation, Evaluation, and effect of certain Microorganisms on Flavor Components of Blue Cheese. *J. Agr. Food Chemistry* v. 14, n° 3 ,p. 241, 1966
- CHALIER P.; CROUZET J.; Production of volatile components by *Penicillium roqueforti* cultivated in the presence of soy bean oil. *Flavour-and-Fragrance-Journal*; v. 8 n° 1, p. 43-49,1993
- COSTA, M. C.; Produção e caracterização de Lipase de *Aspergillus sp* , Campinas, 1996,107p Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas
- CREULY, C.; LARROCHE, C.; GROS, J.; Bioconversion of fatty acids into methyl ketones by spores of *Penicillium roqueforti* in a water-organic solvent, two-phase system. *Enzyme Microb. Technol.* v. 14, p. 669, 1992
- DARTEY, C. K., KINSELLA, J. E.; Metabolism of [U-¹⁴C]lauric acid to methyl ketones by spores of *Penicillium roqueforti*. *J. Agr. Food Chem.* V. 21, n° 6, p. 933 , 1973

- DARTEY, C. K., KINSELLA, J. E.; Oxidation of Sodium [U-¹⁴C] palmitate into carbonyl compounds by *Penicillium roqueforti*. *J. Agr. Food Chem.* v. 21, n° 4, p. 721, 1973
- DARTEY, C. K., KINSELLA, J. E.; Rate of formation of Methyl Ketones during Blue Cheese Ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 19, n° 4, p. 771-774 1971
- DOLEZALEK, J.; HOZA, I.; Effect of *Penicillium roqueforti* on milk fat. II. Effect of strains of *Penicillium roqueforti* on the formation of aldehydes and 2-ketones in the Czapek-Dox liquid medium with fat. *Sbornik-Vysoke-Skoly-Chemicko-Technologicke-v-Praze,-E-Potraviny* ; v. 26, p. 45-50, 1969
- DWIVEDI, B. K.; KINSELLA, J. E. ; Continuous production of Blue-Type Cheese flavor by submerged fermentation of *Penicillium roqueforti*. *J. Food Science* , v. 39,p. 620-622 , 1974
- FRUTOS, M.; SANZ, J.; MARTINEZ-CASTRO, I.; Characterization of Artisanal Cheeses by GC and GC/MS analysis of Their Medium Volatility (SDE) Fraction, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 39, p. 524-530, 1991
- EATON, D. C.; Dairy Flavors, In: GABELMAN, A.; *Bioprocess Production of Flavor, Fragrance, and Color Ingredients*, New York, John Wiley & Sons, Inc., 1994, cap. 6, p. 169-203
- GATFIELD, I. L.; Enzymatic and Microbial Generation of Flavor, *Perfumer & Flavorist* ,v. 20, n° 5 , p. 110-169, 1995
- HATTON, P. V.; KINDERLERER, J. L.; Toxicity of medium chain fatty acids to *Penicillium crustosum* Thom and their detoxification to

- methyl ketones. Journal of Applied Bacteriology, v. 70, p. 401-407, 1991
- JACKSON, H. W. ; HUSSONG, R. V. ; Secondary alcohols in Blue Cheese and their relation to methyl ketones. J. Dairy Science, v. 41, n° 7, p. 920 , 1958
- JOLLIVET, N.; BELIN, J. M.; Comparison of volatile flavor compounds produced by ten strains of *Penicillium camemberti* Thom. Journal of Dairy Science, v. 76, p. 1837-1844, 1993
- JOLLY, R.; KOSIKOWSKI, F. V.; Blue Cheese flavor by microbial lipases and mold spores utilising whey powder, butter and coconut fats. J. Food Science , v. 40, p. 285 , 1975
- JOLLY, R.; KOSIKOWSKI, F. V.; A new blue cheese food material from ultrafiltrated skim milk and microbial enzyme-mold spore reacted fat. Journal of Dairy-Science; v. 58 , n° 9,p. 1272-1275,1975
- KIM, J.; LINDSAY, R. C.; Contributions of cow, sheep, and goat milks to characterizing branched-chain fatty acids and phenolic flavors in varietal cheeses. Journal of Dairy Science, v. 74, p. 3267-3274, 1991
- KINDERLERER, J. L. ; Conversion of coconut oil to methyl ketones by two *Aspergillus* species. Phytochemistry , v. 26, n° 5 ,p. 1417, 1987
- KINDERLERER, J. L. ; KELLARD, B. ; Ketonic rancidity in coconut due to xerophilic fungi. Phytochemistry-; v. 23 n°12, p. 2847-2849, 1984
- KRANZ, C.; PANITZ, C.; KUNS, B.; Biotransformation of free fatty acids in mixtures to methyl ketones by *Monascus purpureus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. v. 36, p. 436 , 1992

- KRIVENTSOVA-VF; Carbonyl compounds in Roquefort cheese. *Izvestiya-Vyssshikh-Uchebnykh-Zavedenii, Pishchevaya Tekhnologiya*; v. 3, p. 27-29, 1971
- LLANO, D. G.; RAMOS, M.; POLO, C.; SANZ, J.; MARTINEZ-CASTRO, I.; Evolution of the volatile components of na artisanal Blue Cheese during ripening. *Journal of Dairy Science*, v. 73, p. 1676-1683, 1990
- LARROCHE, C.; BESSON, I.; GROS, J. B.; Behavior of spores of *Penicillium roquefortii* during fed-batch bioconversion of octanoic acid into 2-heptanone. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 44, p. 699-709, 1994
- LARROCHE, C.; MUHAMMAD, A.; GROS, J. B.; Methyl-ketone production by Ca-alginate/Eudragit RL entrapped of *Penicillium roqueforti*. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 11, p. 106-112, 1989
- LARROCHE, C.; GROS, J. B.; batch and Continuous 2-Heptanone Production by Ca-Alginate/Eudragit RL entrapped spores of *Penicillium roquefortii*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 34, p. 30-38, 1989
- LAWRENCE, R. C. ; HAWKE, J. C.; The oxidation of fatty acids by mycelium of *Penicillium roqueforti*. *J. Gen. Microbiol.* v. 51, p. 289 , 1968
- LAWRENCE, R. C. ; The metabolism of triglycerides by spores of *Penicillium roqueforti* . *J. Gen. Microbiol.* v. 46, p. 65 , 1967
- LAWRENCE, R. C. ; The oxidation of fatty acids by spores of *Penicillium roqueforti*. *J. Gen. Microbiol.* , v. 44, p. 393 , 1966
- LIEBICH, H. M.; DOUGAS, D.R.; BAYER, E.; ZLATKIS, A.; Comparative Characterization of Different Types of Cheese by Gas-Liquid

- Chromatography. Journal of Chromatographic Science, v. 8, p. 351-354, 1970
- NELSON, J. H.; Production of Blue Cheese flavor via submerged fermentation by *Penicillium roqueforti*. J. Agr. Food Chem. v. 18, n° 4 , p. 567 , 1970
- OKUMURA, J.; KINSELLA, J. E. ; Methyl Ketones formation by *Penicillium camemberti* in Model System. Journal of Dairy Science, v. 68, p. 11-15, 1984
- PANNEL, L. K.; OLSON, N. F.; Methyl ketone production in milk-fat-coated microcapsules. Variation of Lipase and spore concentrations. Journal of Dairy Science, v. 74, p. 2048-2053, 1991
- PATTON, STUART ; The methyl ketones of Blue Cheese and their relation to its flavor. J. Dairy Science, v. 33, n° 9 , p. 680 , 1950
- SCHWARTZ, D. P. ; PARKS, O. W.; Quantitative analysis of methyl ketones in Blue Cheese fat. Journal of Dairy Science , v. 46, n°9, p. 989-990, 1963
- TAYLOR, F.; Bleu Cheese flavor production by submerged fermentation with on-line monitoring by gas chromatography. Journal of Industrial Microbiology , v. 15, p. 71 , 1995
- van der SCHAFT, P.; BURG, N. van der BOSCH, S. COHEN, A.; Fed-batch production of 2-heptanone by *Fusarium poae*. Appl. Microbiol. Biotechnol.v. 36, p. 709 , 1992
- YAGI, T.; KAWAGUCHI, M.; HATANO, T.; FUKUI, F.; FUKUI, S.; Production of ketoalkanes from fatty acid esters by fungus, *Trichoderma*. Journal of Fermentation and Bioengineering, v. 68, n° 3, p. 188-192, 1989

YAGI, T.; KAWAGUCHI, M.; HATANO, T.; FUKUI, F.; FUKUI,
S.; Screening of Methylketone-Accumulating Fungi from Type Culture
Strains, Journal of Fermentation and Bioengineering, v. 70, n° 2, p.
94-99, 1990