

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

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE AROMA
DE FRUTAS POR *Pichia membranaefaciens*

Danielle Barbosa Marques

Bióloga

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore

Orientadora

PARECER

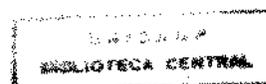
Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por DANIELLE BARBOSA MARQUES aprovada pela Comissão Julgadora em 27 de fevereiro de 1998.

Campinas, 27 de fevereiro de 1998.


Prof^a. Dr^a. GLÁUCIA MARIA
PASTORE
Presidente da Banca

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre em Ciências de Alimentos.

1998



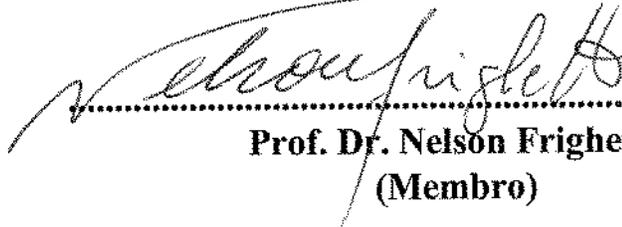
BANCA EXAMINADORA



.....
Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
(Orientadora)



.....
Profa. Dra. Hilary Castle Menezes
(Membro)



.....
Prof. Dr. Nelson Frighetto
(Membro)

.....
Prof. Dr. José Luiz Pereira
(Membro)

Campinas, de fevereiro de 1998.

Dedico este trabalho ao meu marido Aldo,
que trouxe tanto amor e alegria à minha
vida.

Aos meus pais pelo amor, estímulo e
valioso exemplo de vida.

À minha Vó Tita e Tia Zanza pelo amor e
carinho.

Aos meus irmãos e aos meus sogros pelo
incentivo, compreensão e carinho.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore pela amizade e orientação durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Nelson Frighetto e à Profa. Dra. Hilary pelas correções e sugestões oferecidas.

À Fabiana e Giselle, amigas além do convívio profissional.

Aos amigos Joaquim e Marcelo Thomazini pela valiosa colaboração para o desenvolvimento experimental deste trabalho.

À Tereza Cristina Samico Cavalcanti e Fernando Guimarães pela amizade e pelos incentivos recebidos.

Aos colegas da Engenharia de Alimentos, Lillian, Cristine, Cristina Roseli, Massaharu, Chico, Evelise, Rose, Contado, Egito e Paulo.

À Mônica, Cristina e Alexandre, da Fundação Tropical de Pesquisa "André Tosello", pela colaboração na identificação do microrganismo e na realização das fotos.

Aos professores dos cursos realizados durante o Mestrado, que forneceram subsídios para a estruturação desta tese.

Às funcionárias Beatriz e Dora pela convivência e auxílio prestado durante a realização experimental deste trabalhos.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos, da Secretaria do Departamento de Ciência de Alimentos, da Secretaria de Pós-Graduação e ao Centro de Informática, pela gentileza e atenção.

Finalmente, sem que sejam menos importantes, quero deixar aqui a minha gratidão aos que não tiveram os nomes citados, mas sempre me deram sua amizade. Algo que nos engrandece e incentiva.

ÍNDICE GERAL

	Página
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
RESUMO.....	ix
SUMMARY.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Considerações Gerais sobre Produção de Aromas.....	3
2.2 Microrganismos Produtores de Aromas.....	20
3. OBJETIVOS.....	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1 Isolamento e Seleção da Levedura LB-250.....	27
4.1.1 Estudo da Composição de Meios de Cultura na Produção de Compostos Voláteis de Aroma de Frutas.....	27
4.1.2 Efeito das Fontes de Carbono na Produção de Compostos Voláteis de Aroma de Frutas.....	27
4.1.3 Efeito das Fontes de Nitrogênio na Produção de Compostos Voláteis de Aroma de Frutas.....	28

4.3.6.4	Produção de Amônia a partir de Uréia.....	38
4.3.6.5	Teste de Osmotolerância.....	39
4.3.6.6	Teste de Crescimento à Temperatura a 37°C.....	40
4.3.6.7	Teste de Resistência a Ciclohexamida.....	40
4.3.6.8	Teste de Crescimento em Meio Livre de Vitaminas.....	41
4.3.6.9	Teste da Atividade da Arbutina.....	41
4.3.6.10	Teste da Produção de Ácidos.....	42
4.3.6.11	Teste de Formação de Compostos Amilóides Extra-celulares..	42
4.3.6.12	Teste de Diazonium Blue B (DBB).....	43
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1	Identificação da Linhagem de Levedura LB-250.....	44
5.1.1	Características da Reprodução Vegetativa.....	44
5.1.1.1	Morfologia das Células.....	44
5.1.2	Resultados dos Testes Fisiológicos e Bioquímicos.....	45
5.1.3	Determinação da Curva de Crescimento.....	52
5.2	Seleção das Fontes de Carbono e de Nitrogênio para Produção de Compostos Voláteis com Aroma de Frutas por <i>P. membranaefaciens</i> ...	53
5.3	Seleção dos Meios de Cultura para Produção de Compostos Voláteis com Aroma de Frutas por <i>P. membranaefaciens</i>	55
5.4	Efeito do pH Inicial na Produção de Massa Celular Seca da Linhagem de <i>P. membranaefaciens</i>	56
5.5	Efeito da Temperatura de Incubação na Produção de Compostos Voláteis com Aroma de Frutas por <i>P. membranaefaciens</i>	61
5.6	Relação entre o Tempo de Fermentação e a Produção de Compostos Voláteis com Aroma de Frutas por <i>P. membranaefaciens</i>	62

5.7 Resultados obtidos com o Meio Glicose/Autolisado de levedura....	62
5.8 Resultados obtidos com o Meio Glicose/Extrato de levedura.....	63
5.9 Resultados Obtidos com o Meio Frutose/Autolisado de levedura....	64
5.10 Resultados Obtidos com o Meio Frutose/Extrato de levedura.....	65
5.11 Resultados Obtidos com o Meio Manose/Autolisado de levedura..	66
5.12 Resultados Obtidos com o Meio Manose/Extrato de levedura.....	67
6. CONCLUSÕES.....	103
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105
ANEXOS.....	113
ANEXO-1.....	113
ANEXO-2.....	123
ANEXO-3.....	130

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1- Substâncias dos típicos compostos de aromas formados.....	5
TABELA 2- Exemplos de aromas produzidos por microrganismos e seus constituintes químicos.....	6
TABELA 3- Resultados dos testes de fermentação, assimilação de fontes de carbono e de nitrogênio da linhagem de levedura <i>P.</i> <i>membranaefaciens</i>	46
TABELA 4- Resultados da seleção das fontes de carbono na produção de aroma de frutas por <i>P. membranaefaciens</i>	54
TABELA 5- Resultados da seleção das fontes de nitrogênio na produção de aroma de frutas por <i>P. membranaefaciens</i>	55
TABELA 6- Teste do efeito do pH inicial na produção de massa celular seca de <i>P. membranaefaciens</i>	57

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1a- Células de <i>P. membranaefaciens</i> coradas por Gram.....	47
Figura 1b- Células de <i>P. membranaefaciens</i> coradas por Gram.....	47
Figura 2a- Colônias de <i>P. membranaefaciens</i>	48
Figura 2b- Colônias de <i>P. membranaefaciens</i> (em detalhe).....	48
Figura 3a- Células de <i>P. membranaefaciens</i>	49
Figura 3b- Células de <i>P. membranaefaciens</i>	49
Figura 4a- Células de <i>P. membranaefaciens</i>	50
Figura 4b- Células de <i>P. membranaefaciens</i>	50
Figura 5a- Células de <i>P. membranaefaciens</i>	51
Figura 5b- Células de <i>P. membranaefaciens</i>	51
Figura 6- Curva de crescimento de <i>P. membranaefaciens</i>	52
Figura 7a- Crescimento de <i>P. membranaefaciens</i> nos meios de cultura selecionados à temperatura de 20°C.....	58
Figura 7b- Variação do pH nos meios de cultura selecionados a 20°C.....	58
Figura 8a- Crescimento de <i>P. membranaefaciens</i> nos meios de cultura selecionados à temperatura de 25°C.....	59
Figura 8b- Variação do pH nos meios de cultura selecionados a 25°C.....	59
Figura 9a- Crescimento da linhagem de <i>P. membranaefaciens</i> nos meios de cultura selecionados à temperatura de 30°C.....	60
Figura 9b- Variação do pH nos meios de cultura selecionados a 30°C.....	60
Figura 10- Fermentação realizada em meio de cultura Glicose/Autolisado de levedura à 20°C, por <i>P. membranaefaciens</i>	69

Figura 11- Fermentação realizada em meio de cultura Glicose/Autolisado de levedura à 25°C, por <i>P. membranaefaciens</i>	70
Figura 12- Fermentação realizada em meio de cultura Glicose/Autolisado à 30°C, por <i>P. membranaefaciens</i>	71
Figura 13- Fermentação realizada em meio de cultura Glicose/Extrato de levedura à 20°C, por <i>P. membranaefaciens</i>	72
Figura 14- Fermentação realizada em meio de cultura Glicose/Extrato de levedura à 25°C, por <i>P. membranaefaciens</i>	73
Figura 15- Fermentação realizada em meio de cultura Glicose/Extrato de levedura à 30°C, por <i>P. membranaefaciens</i>	74
Figura 16- Fermentação realizada em meio de cultura Frutose/Autolisado de levedura à 20°C, por <i>P. membranaefaciens</i>	75
Figura 17- Fermentação realizada em meio de cultura Frutose/Autolisado de levedura à 25°C, por <i>P. membranaefaciens</i>	76
Figura 18- Fermentação realizada em meio de cultura Frutose/Autolisado de levedura à 30°C, por <i>P. membranaefaciens</i>	77
Figura 19- Fermentação realizada em meio de cultura Frutose/Extrato de levedura à 20°C, por <i>P. membranaefaciens</i>	78
Figura 20- Fermentação realizada em meio de cultura Frutose/Extrato de levedura à 25°C, por <i>P. membranaefaciens</i>	79
Figura 21- Fermentação realizada em meio de cultura Frutose/Extrato de levedura à 30°C, por <i>P. membranaefaciens</i>	80
Figura 22- Fermentação realizada em meio de cultura Manose/Autolisado de levedura à 20°C, por <i>P. membranaefaciens</i>	81
Figura 23- Fermentação realizada em meio de cultura Manose/Autolisado de levedura à 25°C, por <i>P. membranaefaciens</i>	82

Figura 24- Fermentação realizada em meio de cultura Manose/Autolisado de levedura à 30°C, por <i>P. membranaefaciens</i>	84
Figura 25- Fermentação realizada em meio de cultura Manose/Extrato de levedura à 20°C, por <i>P. membranaefaciens</i>	85
Figura 26- Fermentação realizada em meio de cultura Manose/Extrato de levedura à 25°C, por <i>P. membranaefaciens</i>	86
Figura 27- Fermentação realizada em meio de cultura Manose/Extrato de levedura à 30°C, por <i>P. membranaefaciens</i>	87
Figura 28- Vias metabólicas para a formação de ácidos fenólicos e ésteres em banana.....	94
Figura 29- Conversão de aminoácidos em compostos de aroma de banana a partir de leucina.....	95
Figura 30- Via metabólica de utilização de teanol na formação de acetato de etila por <i>Candida utilis</i> (modelo).....	98

RESUMO

Uma linhagem de levedura previamente isolada e selecionada pelo Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Unicamp, foi identificada através de suas características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas como sendo *Pichia membranaefaciens*.

Esta levedura foi testada em diversas condições de cultivo, tais como variação da composição do meio de cultura, pH do meio, temperatura e tempo de incubação, visando a obtenção de aromas de frutas.

Foram selecionadas as fontes de carbono: glicose, frutose e manose, bem como autolisado de levedura e extrato de levedura como fontes de nitrogênio, para o estudo dos parâmetros para a produção de aromas de frutas.

Os principais compostos voláteis produzidos por *Pichia membranaefaciens* nos meios de cultura selecionados foram: acetato de etila, isobutanol, 1-butanol, propanoato de etila, álcool isoamílico, álcool n-amílico, acetato de isoamila, acetato de n-butila, caproato de etila e álcool feniletílico. Estes compostos foram analisados por cromatografia gasosa e identificados através de cromatografia gasosa e espectrometria de massa.

A produção dos compostos voláteis por *Pichia membranaefaciens*, foi influenciada principalmente pela composição dos meios de cultura, pelo tempo e temperatura de incubação. Os rendimentos máximos de cada

composto foram registrados em várias condições de fermentação. Entretanto, para a maioria dos compostos voláteis formados, o período que apresentou maior rendimento foi após 72 horas de incubação, à 30°C.

A síntese de acetato de etila, principal composto produzido por *P. membranaefaciens*, já começa na fase ativa de crescimento. Os diferentes compostos apresentam rendimentos máximos em momentos diferentes. Os resultados mostraram que a composição de meio de cultura, as condições de fermentação e a escolha da linhagem determinam a natureza e quantidade de cada composto volátil produzido.

Pode-se concluir que existem possibilidades interessantes utilizando-se *P. membranaefaciens* na síntese de acetato de etila. Os altos rendimentos e a especificidade dos compostos voláteis dependem das fontes de carbono e de nitrogênio e das condições de fermentação. Portanto, é essencial entender o mecanismo e os vias bioquímicas que estão envolvidas na formação dos compostos voláteis de aroma de frutas, produzidos por *P. membranaefaciens*.

SUMMARY

A yeast strain, previously isolated and selected in the Food Biochemistry Laboratory of the University of Campinas, was identified from its morphological, biochemical and physiological features as being *Pichia membranaefaciens*.

This yeast was tested under several growth conditions, such as variation of culture medium composition, pH, temperature and incubation time, with the objective of producing fruit flavors.

For this purpose, the following carbon sources were selected for testing: glucose, fructose and mannose, and autolysed yeast and yeast extract as nitrogen sources.

The main volatile compounds produced by *Pichia membranaefaciens* on the selected media were: ethyl acetate, isobutanol, 1-butanol, ethyl propanoate, iso-amyl alcohol, n-amyl alcohol, iso-amyl acetate, n-butyl acetate, ethyl caproate, phenylethyl alcohol. These compounds were analysed by gas chromatography and identified by gas chromatography-mass spectrometry.

The production of volatile compounds by *Pichia membranaefaciens*, was influenced mainly by the culture medium composition and incubation time and temperature. The maximum yields of each compound were registered under several fermentation conditions. However, for most of the volatile compounds formed, the incubation

time presenting the greatest yield of the volatile compounds was 72 hours of incubation at 30°C.

The synthesis of ethyl acetate begins already in the active phase. The different compounds reach an optimum each at a distinct moment. The results showed that the culture medium composition, the fermentation conditions and the choice of the strain determine the nature and the proportion of each volatile compound.

It may be concluded that there are interesting possibilities in using *P. membranaefaciens* for the bio-synthesis of ethyl acetate. High yields and specificity of the produced flavor compounds depend on the type of carbon and nitrogen sources and the fermentation conditions. In this respect, it is essential to understand the mechanism and the biochemical background of flavor compounds formation in *P. membranaefaciens*.

I - INTRODUÇÃO

Aroma é um dos mais importantes atributos dos alimentos e bebidas. Atualmente, os consumidores estão dando preferência aos alimentos que apresentem ingredientes naturais, que cada vez mais estão substituindo os aditivos químicos. Para atender a esta crescente demanda do mercado consumidor, os processos biotecnológicos estão sendo usados para produzir diversos aditivos para a indústria de alimentos.

A produção de aromas por via biotecnológica para alimentos tem sido empregada há anos. O uso de microrganismos tem ocupado um papel importante na história de alimentos tradicionais. Os diferentes tipos de aromas de queijo dependem do tipo de microrganismo usado na inoculação. Bebidas alcoólicas, pães, iogurtes e algumas carnes curadas possuem aromas característicos devido à ação microbiana. Fungos e leveduras são conhecidos pela propriedade de fornecer vários aromas de frutas em meios apropriados.

A produção biotecnológica de aromas naturais tem crescido muito nestes últimos anos na Indústria de alimentos. Isto é devido aos avanços científicos nos processos biotecnológicos, utilizando microrganismos ou enzimas como alternativas à síntese química e à extração vegetal. Além disso, os recentes desenvolvimentos de técnicas de análise, tais como cromatografia gasosa-espectrometria de massas, cromatografia líquida de alta eficiência, utilização do infra-vermelho, têm colaborado para este desenvolvimento.

O processo biotecnológico é de grande interesse para a indústria de aromas, pois pode permitir a produção, em grande escala, de importantes insumos flavorizantes a custo relativamente baixo. Os compostos gerados são

denominados naturais, sendo portanto mais valorizados no mercado que aditivos químicos artificiais, além de outras vantagens relacionadas ao uso de microrganismos na produção de aromas.

O aroma em alimentos é formado de compostos voláteis derivados de precursores mais complexos, tais como proteínas, gorduras, vitaminas e óleos essenciais. As enzimas presentes nos alimentos ou introduzidas neles através do metabolismo de microrganismos, também desempenham um papel importante no desenvolvimento de aromas em alimentos.

A maioria dos aromas naturais é o resultado de misturas de compostos químicos, encontrados em baixas concentrações. As substâncias encontradas incluem ésteres, aldeídos, cetonas, lactonas, álcoois e outras moléculas complexas resultantes do metabolismo secundário de plantas ou de algumas fontes naturais.

Nos últimos dez anos, os processos microbianos são os mais promissores na produção de compostos aromatizantes puros ou de misturas complexas, pois suprem as exigências de pureza e estereoespecificidade, eliminando a formação de misturas racêmicas. Desta forma, é possível obter-se aromas com perfis típicos, com alto rendimento, além de serem considerados naturais.

O objetivo deste trabalho foi estudar o processo de formação de aromas de frutas através de levedura previamente selecionada, em diferentes condições de fermentação. A identificação e a quantificação dos compostos voláteis foram realizadas neste trabalho, assim como a identificação da levedura.

II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Considerações Gerais sobre Produção de Aromas

A utilização de microrganismos em alimentos, com o propósito de produzir aromas, já existe há centenas de anos. Primeiramente, seu uso era devido ao aumento de vida de prateleira, ocasionado pelos processos fermentativos (a conversão do leite em iogurte, por exemplo). Entretanto, em alimentos e bebidas fermentados, a ação microbiana não apenas aumenta a vida de prateleira, mas também auxilia a produção de aromas característicos, e que por este motivo persistem até hoje em dia (GATFIELD, 1986, 1995).

A maioria dos aromas naturais são o resultado de misturas de compostos químicos, biologicamente ativos, e a maioria apresenta estruturas complexas possuindo vários grupos funcionais, encontrados em baixas concentrações (SARIASLANI & ROSAZZA, 1984). Em frutas frescas estão abaixo de 30ppm. Em maçãs já foram identificados 60 álcoois, 43 ácidos e 125 ésteres; em banana foram encontrados 56 álcoois, 39 ácidos e 84 ésteres e em morango, 42 álcoois, 34 ácidos e 117 ésteres (WELSH, 1994; BOELENIS et al., 1995).

Os compostos químicos responsáveis pelos aromas característicos são: álcoois, ácidos, ésteres, cetonas, lactonas, aldeídos (GATFIELD, 1995), e outras moléculas complexas que resultam do metabolismo secundário de plantas (HAMILTON-KEMP et al., 1996) ou podem ser obtidas de fontes animais. Certos fungos, leveduras e bactérias também possuem potencial para o metabolismo secundário e podem produzir aromas e fragrâncias (ARMSTRONG & BROWN, 1986; WELSH, 1994; KOGAN & FREEMAN, 1994; MANLEY, 1995).

Bactérias, fungos e leveduras podem servir como biocatalisadores na produção de produtos naturais. Tais microrganismos, através de seus sistemas enzimáticos, alteram metabolicamente as estruturas de uma ampla faixa de compostos orgânicos. As enzimas microbianas são capazes de realizar reações de biossíntese ou de degradação; podem também fazer biotransformações, que podem conferir benefícios aos microrganismos (SARIASLANI & ROSAZZA, 1984).

A Organização Internacional da Indústria de Aromas separa em quatro classes as substâncias aromatizantes: A primeira classe é a de materiais naturais obtidos de plantas ou de animais, ou estes materiais processados para o consumo humano. A segunda refere-se aos concentrados de aromas naturais ou de substâncias puras obtidas por métodos físicos. A terceira são substâncias aromatizantes “idênticas às naturais”, obtidas por síntese química ou através de reações químicas desde a matéria-prima. E a última são substâncias aromatizantes artificiais que são substâncias químicas sintéticas, as quais não foram identificadas como componente natural de um alimento (HERRÁIZ, 1990; HEATH & REINECCIUS, 1986; NATZ, 1986).

Os compostos voláteis podem ser formados a partir de diferentes vias metabólicas de lipídios. Estas vias incluem a β -oxidação, clivagem de hidroxiácidos (lactonas) e oxidação por enzimas lipoxigenases. Enquanto os produtos primários são aldeídos e cetonas, várias oxidações, reduções e esterificações também fornecem quantidades substanciais de ácidos, álcoois, lactonas e ésteres (HEATH & REINECCIUS, 1986, TRESSL & ALBRECHT, 1986).

Tabela 1: Substâncias dos típicos compostos de aromas formados:

Nutrientes	Compostos de Aroma
Carboidratos	
Glicose	Ácidos Orgânicos: Ácido pirúvico, ácido acético, ácido butírico, ácido hexanóico, ácido octanóico, etc. Ésteres: Piruvatos, acetatos, propionatos, butiratos, etc. Álcoois: Etanol, propanol, butanol, hexanol, octanol. Aldeídos: Acetaldeído, propanal, butanal, hexanal, octanal. Terpenos: Monoterpenos, linalool, limoneno, α -pineno, citronelal, citral, geranial.
Frutose	
Sacarose	
Aminoácidos	
Alanina	Ácido pirúvico, acetaldeído, etanol.
Valina	Isopropanal, isopropanol, α -cetoácido-isobutírico.
Leucina	3-metilbutanal, 3-metilbutanol.
Isoleucina	2-metilbutanal, 2-metilbutanol
Fenilalanina	Benzaldeído, fenilacetaldeído
Serina	} Ácido pirúvico, tiazoles, glioxal
Treonina	
Glicina	
Cisteína/cistina	
Ácidos Graxos	
Ácido linoléico	<i>trans</i> -2- <i>trans</i> -4-decadienal, hexanal, propanal, <i>cis</i> -3-hexanol, <i>trans</i> -2-pentanal
Ácidos Orgânicos	
Ácido cítrico	} Ácido glioxílico, glioxal, ácido pirúvico, etanol acetaldeído, }
Ácido oxaloacético	
Ácido málico	
Ácido láctico	
Vitaminas	
Carotenóides	β -ionona
β -Caroteno	

Fonte: HEATH & REINECCIUS, 1986.

As vias biossintéticas dos microrganismos podem ser manipuladas para produzir certas moléculas que são, normalmente, limitadas a pequenas quantidades pelos mecanismos regulatórios celulares. Pesquisadores têm desenvolvido técnicas para selecionar linhagens mutantes, nas quais o processo regulatório é alterado para que o metabólito possa ser produzido em maiores quantidades (ARMSTRONG & BROWN, 1986; SCHARPF et al., 1986; JANSSENS et al., 1992; WELSH, 1994).

Tabela 2: Exemplos de aromas produzidos por microrganismos e seus constituintes químicos:

Microrganismos	Descrição Sensorial	Voláteis Produzidos
Bactérias		
<i>Streptococcus</i> sp.	ácido, manteiga	acetaldeído, diacetil, acetoína
<i>Lactobacillus</i> sp.	ácido, manteiga	acetaldeído, diacetil, ácido láctico
<i>Propionibacterium</i> sp.	azedo, ácido	acetoína, aldeídos
Leveduras		
<i>Saccharomyces</i> sp.	pão, fermentação alcoólica	lactonas, álcoois, tiocompostos
<i>Geotrichum</i> sp.	melão	etil ésteres, álcoois
<i>Sporobolomyces</i> sp.	pêssego	lactonas
<i>Hansenula</i> sp.	floral, odor de solo	etil ésteres
<i>Kluyveromyces</i> sp.	frutas, rosas	feniletanol, ésteres, terpenos
Fungos		
<i>Aspergillus</i> sp.	cogumelo	álcoois insaturados
<i>Penicillium</i> sp.	cogumelo	2-fenil-etanol, metilcetonas
<i>Ceratocystis</i> sp.	banana, pêsego, ameixa, pera	álcoois, lactonas, ésteres

Fonte: WELSH, 1994.

Em geral, compostos voláteis são metabólitos secundários, isto é, são substâncias produzidas pelo microrganismo, mas que não são essenciais para o seu metabolismo (ABRAHAM, 1993; JIANG, 1995). Os ésteres formados por fungos e leveduras são exemplos de metabólitos secundários. A produção de ésteres seria o mecanismo responsável pela remoção de ácidos e álcoois da célula e do meio, pois, se houvesse um acúmulo destes compostos, poderia ser tóxico para a célula (SCHARPF et al., 1986; LATRASSE & DAMERON, 1988). Metabólitos secundários contribuem para a sobrevivência do microrganismo, podendo inibir competitivamente espécies que poderiam ocupar o mesmo nicho. Sugeriu-se que, com fungos, a liberação de voláteis no ambiente ajudaria a regular seus competidores, estimularia a germinação de esporos, além de servir como atrativos (SCHARPF et al., 1986). Em maçãs, um dos compostos, o 2-metilbutanoato ésteres, além de contribuir no aroma, serve como atrativo de insetos (ROWAN et al., 1996).

Microrganismos que produzem metabólitos secundários geralmente sofrem um período de crescimento logarítmico, onde a síntese de metabólitos secundários é desprezível. Quando a cultura está na fase estacionária, normalmente a produção destes metabólitos é aumentada (SCHARPF et al., 1986).

A maioria dos aromas são produzidos por síntese química ou por extração vegetal. Os compostos sintetizados quimicamente apresentam algumas desvantagens. Uma delas é que não podem ser considerados substâncias naturais e não têm o mesmo valor econômico que aromas naturais. A estrutura complexa de certos aromas dificulta a síntese química e há formação de misturas racêmicas indesejáveis, além da crescente aversão dos consumidores a aditivos químicos (WELSH, 1994; JANSSENS et al., 1992).

Durante muito tempo, as plantas foram a única fonte de compostos de aroma e a maioria destes aromas foram isolados de óleos essenciais (KEMPLER, 1983, JANSSENS et al., 1992). Entretanto, os componentes ativos sensorialmente estão frequentemente presentes em pequenas quantidades ou então ligados à outras substâncias. o que acarreta uma redução no suprimento de matéria-prima, gastos com isolamento. Outra desvantagem da extração de plantas, é a forte dependência de fatores que dificultam o controle do produto, tais como a influência do tempo, o risco de doenças. Todos estes fatores influem diretamente na variabilidade, na quantidade e na qualidade do produto final (SCHINDLER & SCHIMD, 1982; KEMPLER, 1983; LUGAY, 1986; JANSSENS et al., 1992; ABRAHAM & BERGER, 1994; WELSH, 1994; CHRISTEN & MUNGUÍA, 1994 e KRINGS et al., 1995).

A produção de aromas a partir de microrganismos, plantas ou de tecido animal requer o entendimento do processo bioquímico da formação destes compostos voláteis, a sua natureza química, além das reações não-enzimáticas que poderiam alterar ou destruir aromas desejáveis. A identificação das substâncias precursoras destes compostos aromatizantes possibilita aplicações, onde o aroma poderia ser gerado na preparação do alimento, o que resultaria num forte impacto com perda mínima durante o armazenamento e estocagem. Com todas estas informações e com o auxílio da Engenharia Genética, microrganismos sintetizariam aromas em quantidades comerciais a um custo razoável (LUGAY, 1986).

Proteases, lipases e carboidrases são enzimas que podem produzir precursores de aromas. Microrganismos manipulados geneticamente seriam feitos para produzir enzimas mais eficientes, promovendo alta especificidade ao substrato e com atividade ótima. Tais microrganismos podem produzir enzimas

que são eficientes sob condições de processamento de alimentos, como por exemplo, produção de enzimas estáveis à altas temperaturas (LUGAY, 1986).

O uso de microrganismos pode oferecer um método alternativo para a produção de aromas e fragâncias naturais (SCHARPF et al., 1986), pois apresentam novas possibilidades para produção rápida e controlada dos compostos, além de apresentarem um sistema simples de estudo das vias biossintéticas, que estão envolvidas na formação de compostos voláteis (KEMPLER, 1983). Utilizam matéria-prima de baixo custo e de fácil aquisição para produção de substâncias que podem ser aplicadas em diversas indústrias, principalmente na indústria alimentícia.

Os microrganismos representam uma fonte econômica de enzimas, que podem ser aplicadas para aumentar ou alterar o aroma de alimentos. As enzimas podem ser utilizadas diretamente no alimento, como aditivo, liberando ou produzindo precursores de aroma, ou também como corretivas de "off-flavor" causados pela presença de compostos específicos (KEMPLER, 1983; GATFIELD, 1988).

Microrganismos também podem ser usados na produção de compostos que não estão disponíveis através de outras fontes biológicas ou químicas. A estereoespecificidade do sistema enzimático elimina a formação de misturas racêmicas, particularmente nos casos de isômeros ópticos com propriedades sensoriais distintas, podendo obter-se aromas com perfis típicos (KEMPLER, 1983; GATFIELD, 1988; HERRAÍZ, 1990), aumentando o rendimento e atendendo às características complexas de aromas que não podem ser criadas pela mistura de componentes químicos conhecidos. Além disso, os compostos produzidos através de processos biossintéticos são considerados naturais,

contanto que as matérias-primas sejam naturais, um fato que vem ganhando importância atualmente (KEMPLER, 1983; SCHREIER, 1986; BERGER et al., 1988; WELSH, 1994; CHRISTEN & MUNGUÍA, 1994.).

Uma outra vantagem é a transformação de compostos precursores em produtos de alto valor devido à alta seletividade, ou compostos químicos somente disponíveis em baixos rendimentos por métodos químicos (MANLEY, 1995). Os microrganismos são capazes de transformar compostos químicos individuais por hidroxilação, oxidação, ruptura, rearranjo ou redução, difícil de ocorrer por reações convencionais (KEMPLER, 1983; SCHINDLER & SCHMID, 1983; DRAWERT, 1988; CHRISTEN & LOPEZ-MUNGUÍA, 1994).

Em geral, reações microbianas oferecem suplementos à síntese química. As enzimas dos microrganismos atacam em posições moleculares não afetadas por métodos químicos, porque as posições não podem ser suficientemente ativadas ou requerem um número de etapas intermediárias. Há uma combinação de múltiplas reações na fermentação, que pode ser programada para ocorrer em uma sequência específica com microrganismos adequados. As reações microbianas são realizadas sob condições suaves (BERGER et al, 1988). O grande número de células e altas taxas de crescimento podem permitir que certos microrganismos sejam forçados a realizar reações únicas. Baixas velocidades de reação podem ser superadas pelo grande número de células, alta taxa de crescimento e também pela facilidade de manipulação das vias metabólicas através das condições ambientais (SCHARPF et al., 1986).

Alternativas possíveis para produção de compostos aromatizantes são realizadas através de métodos biotecnológicos e o uso de biocatalisadores para

suas sínteses: células de plantas e cultura de tecido, microrganismos e enzimas. Até o momento, os processos microbianos parecem ser a maior promessa de produção de compostos flavorizantes puros ou misturas complexas. Muitos microrganismos são capazes de produzir aromas, através da fermentação de nutrientes simples, tais como: açúcares e aminoácidos. O entendimento das vias bioquímicas dos microrganismos pode ser muito informativo para aumentar a produção de óleos essenciais pelas plantas. Microrganismos também podem catalisar conversões específicas de precursores adicionados ou intermediários, um processo chamado de bioconversão. A possibilidade de bioconversão regio-específicas, com ou sem síntese química complementar, é importante para a resolução de isômeros ópticos (JANSSENS et al., 1992).

Há grupos de compostos de aromas, de importância industrial, tais como: terpenos, lactonas, pirazinas, ésteres, ácidos, álcoois, etc.

Terpenos são frequentemente os mais importantes componentes responsáveis pelo aroma característico dos óleos essenciais. A grande maioria dos terpenos é produzida por fungos, os quais podem ser encontrados em pinheiros podres e pertencem aos Ascomycetos e Basidiomycetos. Estes fungos são adequados aos processos biotecnológicos devido ao seu comportamento nos meios de cultura: crescendo tanto em meios sólidos como em meios líquidos, ambos de composição simples e apresentam estabilidade ao atrito. Assim, representam uma alternativa às tradicionais fontes vegetais, alguns exemplos seriam os gêneros: *Ceratocystis*, *Bjerkandera*, *Ishnoderma* (JANSSENS et al., 1992).

Os terpenos são excelentes substratos para bioconversões estereoespecíficas. Um exemplo é a bioconversão da mistura racêmica DL-mentol, que

é sintetizado quimicamente. Os isômeros são esterificados, principalmente a acetatos, formiatos, propionatos ou succinatos. Microrganismos ou esterases isoladas, são então usadas para hidrolizar os ésteres do L-mentil para L-mentol. No Japão, vários trabalhos estão sendo realizados nesta área, uma vez que a demanda de L-mentol no Japão é de 500t/ano (JANSSENS et al., 1992).

A degradação de lipídios (β -oxidação) para a produção de compostos flavorizantes tem sido explorada há muitos anos, principalmente na maturação de queijos. Na produção destes compostos a partir da hidrólise de triglicerídeos por enzimas lipolíticas, há liberação de ácidos graxos livres. Estes ácidos graxos livres podem ser tóxicos para o microrganismo e por isso, são convertidos a ésteres de coenzima A (CoA) antes de serem catabolizados (FERON et al., 1996).

Em 1975, STANLEY & TUBBS detectaram o acúmulo de intermediários durante a β -oxidação do palmitato, na mitocôndria intacta. Esta descoberta indicou que seria possível explorar a Via da β -oxidação para se obter um importante grupo de compostos naturais (lactonas). O precursor usado para a produção de lactona é um ácido graxo hidroxilado. Dependendo da posição do grupo hidroxila na cadeia alifática, este ácido poderia levar à formação de γ ou de δ -lactona (citado por FERON et al., 1996).

As lactonas estão associadas aos aromas de frutas, manteiga, doce ou de nozes (LABOWS et al., 1979; TRESSL & ALBRECHT, 1986). A maioria das lactonas é produzida quimicamente, mas o uso de microrganismos pode ter grandes vantagens quando comparado à síntese química, especialmente para a produção de lactonas opticamente ativas (GATFIELD, 1995). O *Trichoderma viride* é um fungo do solo que, quando inoculado em um meio simples de

crescimento, gera um aroma característico de coco. Isto se deve à presença de 6-pentil 2-pirona, cuja concentração é de 170mg/l. Já a levedura *Sporobolomyces odorus* produz 1-6 mg/l de 4-decalactona, resultando num aroma intenso de pêssego. *Tyromyces sambuceus* também produz 4-decalactona (TAHARA & MIZUTANI, 1975; JANSSENS et al., 1992).

Pirazinas são compostos heterocíclicos contendo nitrogênio. Conferem aromas típicos de alimentos aquecidos, tostados, normalmente formados na reação de Maillard (LU et al. 1997). Poucos microrganismos são capazes de sintetizar estes compostos (JANSSENS et al., 1992). Um mutante de *Corynebacterium glutamicum* é capaz de converter certos aminoácidos, incluindo leucina, isoleucina e valina, em quantidades importantes de tetrametilpirazina (3 g/l em 5 dias de fermentação) (GATFIELD, 1988).

Entre os compostos mais importantes na indústria de aromas de alimentos destacam-se os ésteres, que conferem diversos aromas de flores e frutas e conferem aroma a alimentos fermentados. Podem ser obtidos industrialmente recorrendo a microrganismos específicos ou mediante a lipases por esterificação direta ou transesterificação (HEATH & REINECCIUS, 1986; HERRÁIZ, 1990).

Ésteres são produzidos em pequenas quantidades por alguns microrganismos, poucos são capazes de formar quantidades significativas de ésteres. Várias leveduras do gênero *Saccharomyces* e *Hansenula* produzem acetato de etila a partir de glicose ou de etanol. *Saccharomyces* sp. produz baixas concentrações de acetato de etila, enquanto *Hansenula* produz quantidades significantes de éster. *Candida utilis* também produz quantidades

consideráveis de acetato de etila a partir de glicose. (ARMSTRONG et al. 1984; ARMSTRONG, 1986).

Os ésteres são compostos importantes de aromas de frutas e nelas estão presentes em baixas concentrações, em torno de 1 a 100 ppm. O metabolismo de lipídios fornece um grande número de ácidos e álcoois, que podem sofrer esterificação, formando uma variedade de ésteres. Em leveduras, a esterificação é controlada por enzimas intracelulares (TRESSL & DRAWERT, 1973; HEATH & REINECCIUS, 1986). Alguns microrganismos são capazes de sintetizar 3-metilbutil 3-metilbutirato, que resulta num aroma de maçã. Já a formação de “off-flavors” em leites pasteurizados e queijos, é devido à produção de etil butirato e etil hexanoato por certas bactérias ácido lácticas e espécies de *Pseudomonas* (JANSSENS et al., 1992).

Ésteres de cadeia curta também podem ser produzidos através da bioconversão de precursores apropriados. Os álcoois são convertidos pela levedura *Hansenula mrakii* em seus acetatos correspondentes, com um alto rendimento (mais do que 90% para 3-metil butil acetato). Os ésteres produzidos volatilizam-se durante o processo aeróbico e são adsorvidos em carvão ativado. O concentrado resultante, obtido da desorção do carvão ativado, pode ser usado como aroma natural de banana.(GATFIELD, 1988; WELSH, 1994)

A produção de ácidos via microrganismos é importante para o aroma de muitos alimentos fermentados. Um ácido produzido por microrganismos merece destaque, o ácido láctico. Ácido láctico é opticamente ativo, podem existir na forma L, D ou numa mistura racêmica (opticamente inativa) dependendo apenas do microrganismo envolvido na sua síntese (HEATH & REINECCIUS, 1986; ALBERTAZZI et al., 1994).

Outros ácidos também podem ser formados durante a fermentação. A maioria dos microrganismos possuem lipases que atacam os triglicerídeos, formando glicerol, monoglicerídeos, diglicerídeos e ácidos graxos livres. Ácidos também podem ser derivados da desaminação de aminoácidos. Os produtos são ácidos de cadeia alifática e ácidos aromáticos (HEATH & DRAWET, 1986).

Os álcoois têm a menor contribuição no aroma, a menos que estejam presentes em concentrações relativamente altas (ppm) ou sejam insaturados (por exemplo, o 1-octen-3-ol). Álcoois podem surgir da via metabólica primária de um microrganismo ou pela redução de um composto carbonila em seu álcool correspondente (HEATH & REINECCIUS, 1986).

A produção de álcoois a partir de aminoácidos pode ocorrer pela transaminação, descarboxilação e redução ou pela desaminação oxidativa seguida de descarboxilação e redução. Em qualquer que seja a via metabólica, o produto será sempre o aminoácido com um carbono a menos e sem o grupo amino (HEATH & REINECCIUS, 1986).

As cetonas são compostos importantes no aroma de "blue-cheese", nos quais as C₅-C₁₁, as cetonas do tipo 2-alcanonas são responsáveis pelo aroma e sabor típicos do queijo Roqueforti. 2-alcanonas podem ser formadas via bioconversão de gorduras, óleos ou ácidos graxos específicos por *Penicillium roquefortii* e alguns outros microrganismos. As lipases do *Penicillium* liberam primeiramente os ácidos graxos, que sofrem β-oxidação e descarboxilação, chegando a uma 2-alcanona com um átomo de carbono a menos que o ácido graxo original. Os concentrados resultantes podem ser usados, por exemplo, em

produtos de queijos, nos quais o aroma foi perdido durante o processamento térmico. Outras aplicações são em biscoitos, sopas e caldos.

A produção destes voláteis varia em função de fatores químicos, físicos e biológicos. O pH do meio de cultura deve ser monitorado e, em muitos casos, permanecer constante. Temperaturas devem ser rigorosamente controladas durante a fermentação, para maximizar rendimentos. A natureza das fontes de carbono e de nitrogênio determina diretamente a qualidade e a variação dos compostos voláteis produzidos. A otimização da produção de voláteis também deve levar em conta o estado fisiológico do microrganismo (SCHINDLER & SCHMID, 1982; SCHARPF et al, 1986).

As condições de cultivo, tais como composição do meio (fonte de carbono, nitrogênio, e outros elementos), pH, tempo de fermentação, temperatura de incubação, agitação e aeração, foram identificados como fatores determinantes do tipo e quantidade dos compostos de aromas produzidos, além da linhagem do microrganismo (SARIASLANI & ROSAZZA, 1984; ARMSTRONG & BROWN, 1986; GATFIELD, 1988; SCHARPF et al., 1992; JANSSENS et al., 1992; WELSH, 1994). Estas variáveis podem estar envolvidas nos mecanismos fisiológicos que influenciam nos tipos e quantidades dos produtos formados pelos microrganismos (SARIASLANI & ROSAZZA, 1984). Por exemplo, o *Ceratocystis moniliformis* pode produzir aroma de banana, citrus e pêssego. O aroma produzido depende das fontes de carbono e nitrogênio usadas na composição do meio de cultura e é produzido apenas após a depleção da fonte de nitrogênio. Após 5 dias de fermentação obtiveram-se 50µg de monoterpenos por miligrama de cultura. O rendimento foi aumentado com a elevação da temperatura e usando altas concentrações de asparagina como fonte de nitrogênio. A produção destes compostos químicos

após o desaparecimento de um dado nutriente do meio, é típico do processo de metabolismo secundário.(WELSH, 1994)

Muitos óleos de plantas e aromas naturais, estão atualmente disponíveis somente a preços acima de 5000\$/Kg. Por exemplo, 4-decalactona sintética, que oferece aroma de pêssego, custa 150\$/Kg, enquanto a mesma substância obtida de uma fonte natural custa 6.000\$/Kg. Isto justifica o crescente interesse na produção de aromas naturais por via biotecnológica, uma vez que esta se apresenta como uma alternativa promissora.

Embora muitos processos microbianos sejam capazes de produzir aromas interessantes, o número de aplicações industriais são limitadas. Dentre as principais razões, estão os baixos rendimentos (PARLIMENT, 1986; BERGER et al., 1988; HERRÁIZ, 1990; WELSH, 1994), pois a maioria dos voláteis são produzidos somente em quantidades “traços” (KOGAN & FREEMAN, 1994), devido às reações energeticamente desfavoráveis. Para substratos específicos, a produção é em torno de ml/l, e em alguns casos, o substrato pode ser completamente convertido a gás carbônico e biomassa, sem nenhum acúmulo do produto (SCHARPF et al. 1992; WELSH, 1994).

A produção de voláteis por fermentação resulta em uma baixa concentração do produto hidrossolúvel em uma grande quantidade de água. Os voláteis presentes nos meios de fermentação, na maioria das vezes apresentam problemas na extração e na recuperação, o que acarreta em altos custos nos processos de produção. Isto é compensado pelo alto valor de mercado de aromas naturais, de 10 a 100 vezes maior do que aromas sintéticos (HERRÁIZ, 1990; JANSSENS et al, 1992). Além disso, devido à sua volatilidade, alguns produtos podem ser perdidos no fermentador (SCHARPF et al. 1992).

Normalmente é necessário manter a concentração do produto final no meio de fermentação abaixo de determinados níveis, devido a efeitos toxicológicos ou inibitórios nos microrganismos (FERON et al., 1996). Os terpenóides são bons exemplos, pois são substâncias tóxicas para microrganismos (JANSSENS et al., 1992; SCHARPF et al. 1992; WELSH, 1994). No entanto, este tipo de problema pode ser superado com a retirada contínua destes produtos finais do meio de cultura. Uma patente alemã descreve o uso de uma resina apolar - Amberlite XAD, na recuperação de terpenos produzidos por *Ceratocystis* sp, tornando possível rendimento de 2 gramas por litro de terpenos (JANSSENS et al., 1992).

Muitos voláteis produzidos por microrganismos necessitam de longos períodos de fermentação, aumentando os custos e como consequência, aumentando também a possibilidade de contaminação por microrganismos indesejados (SCHARPF et al. 1992).

Alguns microrganismos, tais como os fungos filamentosos, podem afetar propriedades reológicas e a transferência de oxigênio do meio de cultura. Meios de cultura altamente viscosos podem requerer mais energia para agitação e aeração para a manutenção do crescimento das células e da produção de produtos. Isto encarece o produto (SCHARPF et al. 1992).

Voláteis recuperados podem ser misturas de voláteis, alguns dos quais podem ter efeitos deletérios nas propriedades sensoriais do produto final e devem ser removidos (SCHARPF et al., 1986).

Embora GC-MS seja a técnica mais eficiente para identificação de componentes voláteis de aromas, algumas limitações são impostas pela natureza

das amostras. A complexidade da mistura de compostos voláteis obtidos de alimentos e as pequenas quantidades nas quais estes compostos são obtidos, necessitam de uma separação extremamente eficiente e técnicas de identificação sensíveis e específicas. A espectrometria de massas fornece informação baseada no modo de fragmentação dos compostos orgânicos, que são ionizados, usualmente por bombardeamento de elétrons. Os perfis de fragmentação que são fragmentações e/ou rearranjos específicos de íons moleculares podem ser usados na identificação da estrutura molecular dos compostos de aroma (MORTON & MACLEOD, 1982).

Na maioria das vezes, os compostos aromatizantes estão presentes apenas em “traço”, em sistemas heterogêneos, dificultando o seu isolamento e a sua identificação. Os aromas gerados biologicamente são frequentemente complexos e incluem uma larga faixa de polaridade, desde hidrocarbonetos apolares até compostos carbonílicos altamente polares. As técnicas apropriadas para a análise de componentes de baixo peso molecular devem ser diferentes daqueles para constituintes de alto ponto de ebulição. Deve-se levar em consideração que muitos compostos de aroma gerados biologicamente, são instáveis (MORTON & MACLEOD, 1982; PARLIMENT, 1986).

Apesar das dificuldades apresentadas, alguns compostos flavorizantes já estão sendo produzidos em larga escala. Recentemente, a BASF (Alemanha) começou a produção de 4-decalactona, que confere aroma de pêssego. O processo envolve a bioconversão por *Yarrowia lipolytica* de óleo de mamona. O óleo é extraído por prensagem das sementes de *Ricinus communis* que é composto por 80% de um triglicerídeo de 12-hidroxi-9-octadecaenóico (ácido ricinoléico). As leveduras hidrolizam o triglicerídeo e depois os ácidos graxos

são metabolizados na β -oxidação, resultando na formação de 4-decalactona. O rendimento é em torno de 6g/l (JANSSENS et al., 1992).

2.2 Microrganismos Produtores de Aromas

TAHARA et al. (1973) descreveram a caracterização química de constituintes voláteis neutros em meio de cultura cultivado com *Sporobolomyces odorus*. Os constituintes voláteis foram extraídos com éter etílico e analisados por cromatografia gasosa e espectrometria de massa. Os compostos identificados foram: álcool metílico, álcool etílico, álcool isobutílico, álcool n-butílico, álcool isoamílico, álcool n-amílico, álcool benzílico e álcool feniletílico. Os aldeídos: formaldeído, acetaldeído, além de benzaldeído, fenil-acetaldeído, acetona e metil etil cetona, formiato de etila, acetato de etila e di-n-butil ftalato, γ -decalactona e ácido 4-hidroxi-*cis*-6-dodecaenóico e γ -lactona.

LANZA et al. (1976) relataram a produção de aroma por cultura de *Ceratocystis moniliformis*. A avaliação sensorial demonstrou que a qualidade e intensidade do aroma variavam de acordo com a composição do meio de cultura e com a idade das culturas. Para a identificação dos constituintes voláteis em culturas que apresentaram aroma de fruta: banana, pêssego-pera e citrus, foi utilizada a combinação de cromatografia e espectrometria de massas. O acompanhamento da produção dos compostos voláteis foi realizado através de cromatografia gasosa. Os compostos identificados por cromatografia gasosa e espectrometria de massas foram: etanol, acetato de etila, acetato de n-propila, acetato de isobutila e acetato de isoamila. Os resultados indicaram o microrganismo *Ceratocystis moniliformis* como uma fonte potencial de aromas de frutas.

DRAWERT & BARTON (1978) descreveram o processo de biossíntese de monoterpenos a partir de glicose, pela levedura *Kluyveromyces lactis*. Os monoterpenos: citronelol, linalol e geraniol, foram produzidos em cultura aeróbica submersa. Sua biossíntese não necessitou de precursores especiais. Citronelol e linalol foram produzidos em torno de 50µg/l, enquanto geraniol foi detectado somente em traços. Quando foram alteradas as condições de fermentação do meio de cultura, foi possível influenciar a obtenção de monoterpenos. Para o citronelol, com o aumento da temperatura e com o uso de concentrações elevadas de asparagina como fonte de nitrogênio, este composto foi formado em alta taxa.

ARMSTRONG et al. (1984) estudaram a conversão de etanol para acetato de etila utilizando *Candida utilis*. Em condições de aeração apropriada, verificou-se grandes rendimentos de acetato de etila. Esta conversão foi inibida pela suplementação com Fe^{+3} e o pH ótimo para conversão foi relatado ser entre 5,0 a 7,0.

SARRIS & LATRASSE (1985) cultivaram o fungo *Fusarium poae* em caldo de malte e identificaram a presença de um forte odor de frutas. O aroma predominante de pêsego em calda, foi identificado como sendo *cis*-6-dodecen-4-olide, que foi a mais abundante lactona presente no meio, com uma quantidade de 2,0 mg/L. Para a identificação foi utilizada cromatografia gasosa e espectrometria de massas, comparando-se com os dados dos tempos de retenção de padrões autênticos. Os voláteis foram extraídos com diclorometano destilado, utilizando-se 3 extrações, que foram posteriormente concentradas. Os concentrados foram fracionados em coluna de sílica reidratada a 25%. As frações isentas de aroma foram descartadas. O forte aroma de frutas foi devido

às seguintes lactonas: penta, hexa, hepta, octa, nona, deca, undeca, dodeca, *cis*-6-dodecen-4-olide e decalactonas.

JANSSENS et al. (1988) estudaram a produção de ésteres por *Geotrichum penicillatum*. A composição da fração volátil foi analisada por cromatografia gasosa e espectrometria de massas. Foram identificados os seguintes componentes: acetato de propila, crotoato de etila, propionato de isobutila, valerato de etila, butirato de isobutila, iso-hexanoato de etila, propionato de isopentila, hexanoato de etila e β -fenil etil acetato. A produção dos diferentes ésteres ocorreu em momentos diferentes do crescimento do microrganismo. Os acetatos foram formados após 57 horas de fermentação, propionato e butirato após 75 horas, isobutirato após 87 horas e posteriormente a síntese de isovalerato. A alta produtividade e especificidade dos ésteres produzidos dependeram do tipo de fonte de nitrogênio e da adição de precursores.

Em 1988, LATRASSE & DAMERON estudaram a produção de ésteres pelo microrganismo *Geotrichum candidum* mutante (Staron). Quando este microrganismo cresceu em meio de cultura contendo glicerol, uréia, L-asparagina, ácido úrico ou alantoína foi produzido um forte aroma de frutas, semelhante ao aroma de marmelo. A análise de voláteis feita por cromatografia gasosa - espectrometria de massas (GC-MS) revelou a presença de duas classes principais de voláteis: álcoois e ésteres. Os ésteres foram de dois tipos: ésteres etílicos e ésteres isobutílicos. Os ésteres responsáveis pelo aroma de frutas predominante na cultura foram derivados de ácidos graxos de cadeia pequena, como propanóico, butanóico e 2-metilbutanóico. Através de análise sensorial pelo "sniffing", no cromatógrafo gasoso, foi verificado que o aroma de marmelo foi sentido durante a eluição de isobutanoato de etila, enquanto que o

aroma de levedura foi percebido durante a eluição do 2-fenil etanol. As concentrações da maioria dos voláteis foram inferiores a 1 ppm. Os ésteres produzidos desapareciam no quarto dia de fermentação, enquanto o pH do meio aumentava. Além dos ésteres foram identificados os álcoois isobutanol, 2-metil butanol e 2-fenil etanol. Tais álcoois são relatados como sendo originados dos aminoácidos: valina, leucina e fenilalanina.

YOSHIZAWA et al. (1988) inocularam *Neurospora* sp ATCC 46892 em três diferentes meios de cultura líquidos, à temperatura de 30°C, e verificaram a produção de aroma agradável de frutas. Os componentes voláteis foram identificados através de cromatografia gasosa. Nos resultados obtidos houve predominância do composto hexanoato de etila, e também a presença de 3-metil 1-butanol e acetoína. Na análise quantitativa, foi encontrado mais do que 30 ppm de hexanoato de etila, durante 3-4 dias de fermentação. Estes resultados sugeriram que o hexanoato de etila produzido pelo fungo *Neurospora*, é o responsável pelo forte aroma de fruta (pêssego, pera ou maçã). E, quando comparou-se a quantidade produzida do composto pelos meios de cultura, constatou-se que o meio mais adequado à produção de hexanoato de etila foi o meio contendo extrato de malte.

YAMAUCHI et al. (1991) estudaram a produção de aroma por várias linhagens de *Neurospora*. Foram examinadas doze linhagens de *Neurospora* ATCC 46892. As linhagens foram inoculadas em caldo de malte 5% e desenvolvidas aerobicamente a 30°C de 3 a 5 dias. Os voláteis foram extraídos e analisados, sendo o meio previamente saturado com cloreto de sódio. A extração foi feita com acetato de etila e a análise foi realizada por cromatografia gasosa e espectrometria de massa. Todas as linhagens estudadas tiveram um bom crescimento em caldo de malte. As linhagens de *Neurospora* sp. e

Neurospora sitophila IFO 4596 produziram aroma característico de frutas e de cogumelo, porém as outras não produziram nenhum aroma nestas condições. As linhagens de *Neurospora* ATCC 46892 produziram cerca de 39 ppm de caproato de etila (responsável pelo aroma de frutas) enquanto que a linhagem de *Neurospora* sp. produziu 15 ppm de referido éster. As linhagens produziram quantidade significativa de álcool isoamílico e acetoína. *Neurospora* sp. e *Neurospora sitophila* IFO 4596 apresentaram 1,65 e 20,1 ppm respectivamente de 1-octen-3-ol, substância responsável pelo aroma de cogumelo dentre outros compostos.

PASTORE et al. (1994), através de isolamento de linhagens de leveduras obtidas de pólen de flor, frutas maduras e plantas, isolaram uma linhagem de *Geotrichum* sp. de mamão. A linhagem selecionada foi cultivada em três diferentes meios de cultura: Meio G - 5% de glicose e 40 ml de extrato de levedura aquoso por 100 ml de meio; Meio F - 5% de frutose e 40 ml de extrato de levedura aquoso por 100 ml de meio e o terceiro meio usado foi YM sem ágar. Os compostos produzidos foram identificados através de "Dynamic Headspace" e por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Após dois dias de incubação, a 30°C, foi verificada a presença de aroma que se assemelha ao de maçã e morango através de testes sensoriais. O total de compostos encontrados foi de 22, sendo que os de maior concentração foram identificados como: acetato de etila, 2-propanol, propionato de etila, butirato de etila, isovalerato de etila, 2-metil 1-propanol, 3-metil 1-butanol e hexanoato de etila.

FABRE et al. (1995) cultivaram *Kluyveromyces marxianus* em um meio definido e verificaram a formação de um forte aroma de banana, que provavelmente seja devido a produção de acetato de isoamila. Foram analisados

os álcoois, aldeídos, ácidos e ésteres através da cromatografia gasosa combinada com espectrometria de massa. Os resultados revelaram que os ácidos foram produzidos após 63 horas, em diferentes níveis, enquanto a biossíntese de ésteres começou após 70 horas de fermentação. As mudanças cinéticas em cada um dos compostos durante 120 horas de fermentação foram diferentes, porque são usados vários caminhos metabólicos. Além disso, tais variações na concentração de cada componente foram dependentes da sua própria volatilidade. A produção destes compostos veio, em alguns casos, através do metabolismo de carboidratos e em outros casos, do metabolismo de aminoácidos presentes no extrato de levedura. Em outras culturas de *K. lactis*, houve grandes diferenças nos resultados qualitativos e quantitativos dependendo apenas das condições de cultivo, a composição do meio e a linhagem de levedura. Os compostos predominantes foram: álcool isoamílico, álcool 2-feniletílico e ácido isobutírico, com 180 mg/l, 400mg/l e 290 mg/l respectivamente. A morfologia celular de *Kluyveromyces marxianus* foi alterada durante a fermentação, as células da levedura tornaram-se irregulares e alongadas. Isto seria devido ao fato dos produtos secundários serem tóxicos e, portanto, sendo os responsáveis pelas modificações morfológicas.

III - OBJETIVOS

1) Estudar as condições de cultivo tais como: composição do meio de cultura, pH do meio, temperatura de incubação, visando a obtenção de parâmetros para produção de aromas naturais de frutas, através da levedura *Pichia membranaefaciens*.

2) Identificar os compostos de aroma de frutas produzidos por levedura, nos meios de cultivo selecionados, de forma qualitativa e quantitativa.

3) Identificar a levedura utilizada neste trabalho, quanto ao gênero e espécie.

IV -MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ISOLAMENTO E SELEÇÃO DA LEVEDURA

A seleção desta linhagem de levedura foi realizada pelo Laboratório de Bioquímica de Alimentos da FEA - UNICAMP, através do isolamento de 753 linhagens de leveduras, obtidas de amostras de frutas e vegetais de várias regiões do Brasil.

4.1.1. Estudo da Composição de Meios de Cultura na Produção de Aromas de Frutas

A levedura previamente selecionada, foi testada em diferentes meios de cultura, quanto às fontes de carbono e nitrogênio, com o objetivo de se determinar, de forma qualitativa e quantitativa, a melhor composição do meio de cultura para a produção de aromas de frutas.

4.1.2. Efeito das Fontes de Carbono na Produção de Aroma de Frutas

Frascos Erlenmeyer de 250 ml contendo 30 ml do meio composto por: 20 ml de autolisado de levedura, 10 ml de água destilada e 5% das seguintes fontes de carbono: glicose, sacarose, frutose, maltose, lactose, amido, galactose e manose, previamente esterilizados por 15 minutos a 121°C com 1 atm de pressão, foram inoculados com 10^8 células de suspensão de inóculo da levedura.

Os frascos Erlenmeyer foram incubados por períodos de 24, 48, 72 e 96 horas à temperaturas de 20°C, 25°C e 30°C com agitação de 100 rpm. Após os períodos de fermentação, os meios de cultura foram centrifugados a 10.000 rpm

por 10 minutos, o sobrenadante foi recolhido e seu pH foi determinado. A massa celular foi lavada duas vezes para a remoção de resíduos do meio. A matéria seca foi quantitativamente determinada, secando-se as células a 100°C por 24 horas, até peso constante. A formação de aroma de fruta foi acompanhada sensorialmente após cada 24 horas de incubação.

Preparação do autolisado de levedura:

O autolisado de levedura foi preparado aquecendo-se, a 80-85°C, 150 g de fermento biológico em 2 litros de água destilada por 1 hora e 30 minutos. Após o resfriamento, a mistura é centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos a 0°C, o sobrenadante foi denominado de autolisado de levedura.

4.1.3. Efeito das Fontes de Nitrogênio na Produção de Aromas de Frutas

Em frascos Erlenmeyer de 250 ml contendo 30 ml do meio composto por: 30 ml de água destilada, 5% das fontes de carbono selecionadas e 0,5% das seguintes fontes de nitrogênio: extrato de levedura, extrato de malte, peptona, uréia, NaNO₃, (NH₄)₂SO₄ e (NH₄)Cl, foi inoculada uma suspensão de células em uma concentração de 10⁸ células/ml.

Os frascos Erlenmeyer foram incubados a 25°C por períodos de 24, 48, 72 e 96 horas com agitação de 100 rpm. A formação de aroma de fruta foi acompanhada sensorialmente após cada 24 horas de fermentação.

4.1.4. Efeito da Temperatura de Incubação na Produção dos Compostos Voláteis pela Levedura LB-250

Frascos Erlenmeyer de 250 ml contendo 30 ml dos meios glicose/autolisado de levedura, glicose/extrato de levedura, frutose/autolisado de levedura, frutose/ extrato de levedura, manose/autolisado de levedura e manose/extrato de levedura foram inoculados com uma suspensão de 10^8 células/ml e incubados em agitador rotatório nas temperaturas 20°C, 25°C, 30°C e 40°C, com agitação de 100 rpm durante 96 horas.

4.1.5. Efeito do pH Inicial do Meio de Cultura na Produção de Massa Celular Seca da Levedura LB-250

Os meios de cultura selecionados (glicose/autolisado de levedura, glicose/extrato de levedura, frutose/autolisado de levedura, frutose/extrato de levedura, manose/autolisado de levedura e manose/extrato de levedura) tiveram seus pHs iniciais corrigidos para 4,0, 5,0, 6,0 e 7,0 pela adição de NaOH 0,1M ou HCl 0,1M.

Os frascos contendo os meios de cultura selecionados foram esterilizados por 15 minutos a 121°C com 1 atm de pressão, e inoculados com uma suspensão de 10^8 células/ml, sendo incubados em agitador rotatório a 25°C com agitação de 100 rpm por 96 horas.

4.1.6. Determinação da Curva de Crescimento da Levedura LB-250

Frascos Erlenmeyer de 50 ml contendo 30 ml de meio de cultura composto por 20 ml de autolisado de levedura, 10 ml de água destilada e 5% de

glicose, previamente esterilizados por 15 minutos, a 121°C, com 1 atm de pressão, foram inoculados com uma suspensão de 10^8 células/ml. O pH inicial do meio foi de 4,2. Os frascos foram incubados em agitador rotatório, à temperatura de 25°C, com agitação de 100 rpm. Após os tempos pré-determinados de incubação, os frascos foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos, a 0°C. O sobrenadante foi recolhido e seu pH foi medido. A massa celular foi lavada duas vezes para remoção de resíduos do meio, e colocada em vidros de relógio previamente secos, em estufas, por 24 horas, a 100°C e pesados. Os vidros de relógio contendo as massas celulares foram colocados em estufas a 100°C por 24 horas e após este período, foram pesados. A quantidade de massa celular seca foi determinada pela diferença de peso.

4.2. ANÁLISE E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS POR CROMATOGRAFIA GASOSA- FID

4.2.1 Condições de Análise por Cromatografia Gasosa

4.2.1.1 Preparo das amostra para análise no CG

Os compostos voláteis presentes nos sobrenadantes dos meios de cultura centrifugados, foram extraídos com o solvente orgânico diclorometano. Sessenta mililitros de cada sobrenadante dos meios de cultura foram colocados em funil de separação, e os voláteis foram extraídos com 90 ml de diclorometano em porções sucessivas de 30 ml de diclorometano. As fases orgânicas foram secas com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e acondicionadas em frascos de vidro, lacrados com septo de borracha e tampa de alumínio. Os

frascos contendo as amostras foram armazenados em freezer a -10°C até análise cromatográfica.

4.2.1.2 Condições Cromatográficas

Foi utilizado um cromatógrafo gasoso Chrompack CP 9001 com detector de ionização de chama (FID) e uma coluna capilar de sílica fundida CP Sil 5CB (60 m x 0,25 mm x 0,25 μm). As análises foram realizadas utilizando a temperatura inicial da coluna de 40°C por 4 minutos, aumentando-se gradativamente de 10°C por minuto até 150°C , onde permaneceu por 5 minutos. A temperatura do detector foi fixada em 280°C , a temperatura do injetor a 250°C , empregando como gás de arraste o hidrogênio na vazão de 1,0 ml por minuto em sistema de injeção splitless.

4.2.2 Condições de Análise por CG-MS

Foram realizadas algumas análises, utilizando um cromatógrafo gasoso acoplado a um detector seletivo de massa Shimadzu, modelo QP 5000. A coluna de separação foi de sílica fundida (60 m x 0,25 mm x 0,25 μm) Shimadzu S5, utilizando-se as mesmas condições cromatográficas referidas no item 4.2.1.2.

Os espectros de massas de cada um dos constituintes das amostras foram comparados com dados da biblioteca compatível com as classes químicas dos compostos em estudo. Também foram identificados através do tempo de retenção relativo ao dos padrões autênticos. As áreas dos picos foram calculadas para se determinar a concentração destes voláteis presentes no meio. Foi utilizado um potencial de ionização no detector no valor equivalente a 72 eV.

4.3 IDENTIFICAÇÃO E TAXONOMIA DA LEVEDURA LB-250

4.3.1. Considerações gerais:

O estudo taxonômico da levedura LB-250 foi efetuado utilizando-se a metodologia recomendada por KREGER-VAN RIJ (1984) e BARNETT et al. (1990), que consiste na classificação baseada em características de morfologia, de reprodução vegetativa, reprodução sexuada e testes fisiológicos e bioquímicos.

4.3.2. Características da Reprodução Vegetativa

4.3.2.1. Crescimento em meio líquido

Características morfológicas como: arranjo, forma das células e o tipo de divisão celular, foram analisadas através da análise microscópica após o crescimento da linhagem em tubos de ensaio contendo 6 ml de meio GYP caldo (2,0% de glicose, 0,5% de extrato de levedura, 1,0% de peptona) a 27°C por 48 horas. Características como: formação de sedimento, película e anel também foram observadas periodicamente neste meio (7, 14 e 21 dias).

4.3.2.2. Crescimento em meio sólido

Para estudo das características morfológicas em meio sólido, a cultura foi inoculada em placas de Petri contendo GYP ágar (2,0% de glicose, 0,5% de extrato de levedura, 1,0% de peptona e 2,0% de ágar), a 27°C, por 48 horas. Foram observadas a forma e o modo de reprodução da levedura. As características das colônias em meio de cultura sólido, como: textura, cor,

superfície, elevação e aspecto de margens, foram observadas com auxílio de estereoscópio.

4.3.3. Microcultivo

Algumas leveduras apresentam a característica de formar pseudomicélio e micélios verdadeiros em determinados meios de cultura. A cultura da levedura foi inoculada na forma de um risco em placas de Petri contendo meio CMA (Corn Meal Agar - Difco) e recobertas com lamínulas estéreis para observação destas características. As placas foram incubadas a 27°C e observadas em microscópio óptico após 5 a 7 dias de incubação.

4.3.4. Formação de Balistosporos

Para observar a formação de balistosporos, foi utilizada a técnica de duas placas de Petri unidas por uma fita adesiva, onde uma placa contém meio pobre em nutrientes (CMA) e a outra contendo meio rico (GYP ágar). A cultura foi inoculada formando um "X" na placa contendo o meio CMA ágar. Depois, foi sobreposto o fundo da placa de CMA ao fundo da placa contendo GYP ágar. Sobre o meio GYP ágar foi colocada uma lamínula estéril, na mesma direção do inóculo. As duas bases das placas de Petri foram unidas assepticamente com fita adesiva. O conjunto das placas foi incubado a 27°C durante 30 dias. Foi observado periodicamente a ocorrência de crescimento da cultura no meio GYP ágar de maneira idêntica ao risco da cultura (em "X") inoculada em CMA. O crescimento indica a formação de balistosporos, que são liberados da cultura CMA. Os esporos germinam em meio rico (formando uma imagem espelho). Se a cultura apresentasse a formação de balistosporos, seriam preparadas lâminas a

fresco, utilizando-se as lâminas colocadas sobre o meio rico e se observaria a morfologia dos balistosporos.

4.3.5. Características da Reprodução Sexuada

Para verificar a presença de ascos e a forma de seus ascósporos, a cultura foi inoculada em tubos inclinados com os seguintes meios de cultura: acetato ágar de Fowell (0,5% de acetato de sódio trihidratado, 2,0% de ágar, pH 6,5~7,0), gorodkova ágar (0,01% de glicose, 1,0% de peptona, 0,5% de NaCl e 2,0% de ágar), YM ágar (0,3% de extrato de levedura, 0,3% de extrato de malte, 0,5% de peptona, 1,0% de glicose e 2,0% de ágar), ME ágar (5,0% de extrato de malte e 3,0% de ágar) a 27°C. A formação de esporos foi observada periodicamente através da preparação de montagem úmida, em intervalos de 5, 7, 14, 21, 30 e 40 dias.

Para confirmar a presença de esporos, foi realizada a coloração de esporos pelo método de Vartz. Este método consiste na coloração das células de leveduras fixadas em lâminas de vidro com solução de 5,0% de verde de malaquita a 80°C (aquecimento em bico de Bunsen) por 60 segundos, seguido da lavagem em água corrente por 30 segundos e posterior coloração com solução de safranina por 30 segundos a temperatura ambiente e lavagem em água corrente. As células vegetativas coram-se de vermelho e os esporos sexuais de verde.

4.3.6. Características Fisiológicas e Bioquímicas

Estabelecida a pureza e determinadas as principais características morfológicas da cultura, foram realizados os testes para a verificação das principais características fisiológicas e bioquímicas.

4.3.6.1. Fermentação de açúcares

A linhagem foi testada quanto à habilidade em fermentar diferentes carboidratos: glicose, sacarose, maltose, lactose, galactose e rafinose, realizada de acordo com KREGER-VAN-RIJ (1984). Os carboidratos foram preparados em soluções estoques a 6,0%, com exceção da rafinose a 12,0% e foram esterilizados por filtração (Millipore) em membranas de celulose (0,22 μm de porosidade).

O poder fermentativo da linhagem foi verificado em tubos de ensaio com tubos de Durhan invertidos, contendo 2,0 ml de Meio Basal (0,45% de extrato de levedura, 0,75% de peptona e solução de azul de bromotimol até coloração verde garrafa) acrescido de 1,0 ml do carboidrato em estudo. Os tubos foram inoculados com 0,1 ml de uma suspensão celular densa de cultura e incubados a 27°C. Os tubos foram agitados diariamente e observados quanto a produção de ácido através da mudança de coloração do meio basal para amarelo, e a formação de gás capturado no interior do tubo de Durhan. As observações foram feitas por um período de 21 dias.

Preparação do inóculo: uma pequena quantidade de massa celular, cultivada por 48 horas em meio YM ágar a 27°C, foi suspensa em 2,0 ml de água destilada estéril contida em tubos de ensaio. A concentração das células da

suspensão foi avaliada através do Cartão de Whickerham (com 3 linhas pretas), utilizou-se densidade 2 (densidade média - linhas embaçadas e difusas). Esta técnica permite uma estimativa da densidade de células de uma suspensão.

Para efeito de identificação só foram considerados positivos os tubos que apresentaram produção de gás. A quantidade de gás produzida e a velocidade de produção indicaram o potencial fermentativo da linhagem e o registro dos resultados foi feito considerando-se:

- a) Positivo: quando o tubo de Durhan continha de 1/3 a 3/3 de gás em 1 a 3 dias de incubação;
- b) Lento: quando o tubo de Durhan continha de 1/3 a 3/3 de gás em período superior a 3 dias de incubação;
- c) Fraco: quando o tubo de Durhan continha apenas bolhas de gás;
- d) Negativo: quando não havia produção de gás.

4.3.6.2. Assimilação de Compostos de Carbono

Além da fermentação, as leveduras podem obter energia através da assimilação de açúcares realizada aerobicamente. De modo semelhante à fermentação, há diferenças quanto aos compostos que podem ser assimilados pelas diversas espécies de leveduras no processo respiratório. Algumas podem utilizar pentoses (D-xilose, D-ribose), polissacarídeos (amido), álcoois (manitol, sorbitol), ácidos orgânicos (ácido láctico, ácido acético e ácido cítrico) e outros substratos orgânicos.

As fontes de carbono foram preparadas em soluções estoques a 5,0%, com exceção da rafinose a 10,0% e foram esterilizadas por filtração em membranas de celulose (0,22 μm de porosidade) através de filtro Millipore. Todas as fontes de carbono foram utilizadas em uma concentração final de 0,5%, exceto a rafinose, que foi utilizada a 1,0%. As soluções de ácidos orgânicos tiveram seus pHs ajustados para 5,6.

Preparação do inóculo: uma pequena quantidade de massa celular, cultivada por 48 horas em meio YM ágar a 27°C, foi suspensa em 2,0 ml de água destilada estéril contida em tubos de ensaio. A concentração das células da suspensão foi avaliada através do Cartão de Whickerham (com 3 linhas pretas), utilizou-se densidade 2 (densidade média - linhas embaçadas e difusas), como descrito por KREGER-VAN-RIJ (1984). O uso do cartão visa padronizar as suspensões de levedura.

Inoculação da linhagem: em tubos contendo 2,0 ml de água destilada foi adicionado asépticamente 0,25 ml de base nitrogenada para levedura (Yeast Nitrogen Base) a 6,7% e esterilizada por filtração em Membrana Millipore HAWP 02500 0,45 μm e 0,25 ml das soluções com as fontes de carbono. Os tubos foram inoculados com 0,05 ml da suspensão de células com densidade 2, e incubados a 27°C por 21 dias. O grau de utilização dos compostos foi determinado utilizando o Cartão Whickerham, após 7, 14 e 21 dias de incubação. Os tubos com resultados 0 ou 1 são considerados negativos e com resultados 2 ou 3 são considerados positivos (a linhagem assimila aquele determinado composto).

4.3.6.3. Assimilação de Nitrato (KNO₃)

Leveduras são capazes de utilizar várias fontes de nitrogênio. A utilização de nitrato como fonte de nitrogênio é de grande valor para identificação. Espécies que utilizam nitrato também são hábeis para a utilização de nitrito, porém, o inverso, não se aplica. A utilização de etilamina e L-lisina são utilizados também para a identificação de espécies de leveduras.

Em tubos contendo 2,0 ml de água destilada estéril foi adicionado 0,25 ml de YCB (Yeast Carbon Base a 11,7%) e 0,25 ml das soluções com as fontes de nitrogênio. Foi esterilizado separadamente (por filtração em membranas de acetato com poros de 0,22 µm - sistema Millipore) os compostos nitrogenados em solução aquosa nas seguintes concentrações: 0,56% de L-lisina, 0,64% de etilamina, 0,78% de nitrato de potássio e 0,26% de nitrito de sódio. Inoculou-se 0,05 ml da suspensão de células com densidade 2 nos tubos de assimilação e incubou-se a 27°C por 21 dias. Os tubos foram agitados diariamente. A leitura foi realizada através do Cartão de Whickerham, após 7, 14 e 21 dias de incubação.

4.3.6.4. Produção de Amônia a partir de Uréia

Praticamente todas as leveduras podem utilizar a uréia em baixas concentrações no meio de cultura. No entanto, nem todas as leveduras apresentam a habilidade de hidrolisar a uréia em altas concentrações, transformando-a em amônia. Esta característica é um critério importante na taxonomia.

A linhagem de levedura foi inoculada em meio uréia ágar (0,01% de glicose, 0,01% de peptona, 0,05% de NaCl, 0,02% de KH_2PO_4 , 100ml de vermelho fenol 0,12%, 2,0% de ágar) e incubada a 25°C por 7 dias. A cultura foi observada diariamente. Se houver aparecimento de coloração rosa, a reação é dada como positiva.

4.3.6.5. Teste de Osmotolerância

Algumas leveduras são resistentes às altas pressões osmóticas, podendo crescer em substratos com altas concentrações de açúcar ou sal. Para verificar esta característica foram realizados 2 testes:

O teste de osmotolerância I verifica o crescimento da cultura em GYP ágar mais 50% de glicose. A cultura foi repicada em tubo inclinado de GYP ágar com 50% de glicose. Incubou-se a 27°C por 7 dias. Se houver crescimento na superfície do meio, o teste é considerado positivo.

O teste de osmotolerância II verifica o crescimento da cultura em 10% de cloreto de sódio mais 5% de glicose. Este teste foi realizado juntamente com os testes de assimilação de compostos de carbono.

Em tubo de ensaio contendo 2,25 ml da solução de cloreto de sódio mais 5% de glicose, adicionou-se 0,25 ml de solução de YNB (Yeast Nitrogen Base) a 6,7%. Foi acrescentado 0,1 ml de inóculo com densidade 2 (observada através do Cartão de Whickerham). Os tubos foram incubados a 27°C por 21 dias e agitados diariamente.

O crescimento da cultura foi observado através do Cartão de Whickerham após 7, 14, 21 dias de incubação, de maneira semelhante aos tubos de assimilação de carbono.

4.3.6.6. Teste de Crescimento a Temperatura de 37°C

Temperaturas entre 20° e 28°C são ideais para o crescimento de muitas espécies de leveduras. Entretanto, algumas espécies com habitats específicos e restritos crescem em temperaturas superiores ou inferiores a média.

Desta forma, foi realizado o seguinte teste: a cultura da levedura foi repicada em tubo inclinado GYP ágar e incubada a 37°C por 3 a 4 dias. Após este período, foi observado se havia crescimento na superfície do meio, considerando o teste positivo.

4.3.6.7. Teste de Resistência à Ciclohexamida

Em relação a sensibilidade ao antibiótico actidiona (ciclohexamida), as leveduras podem ser sensíveis, moderadamente sensíveis ou insensíveis a este antibiótico. Através de teste em meio líquido, foi verificada a habilidade da levedura de suportar altos teores de ciclohexamida, em concentrações de 100 ppm e 1.000 ppm. Este teste foi realizado juntamente com os teste de assimilação de compostos de carbono.

Em dois tubos contendo 2,0 ml de água destilada estéril, foi acrescentado 0,25 ml de YNB (Yeast Nitrogen Base). Em um dos tubos, foi acrescentado 0,25 ml da solução de ciclohexamida a 100 ppm e no outro 0,25 ml de solução de ciclohexamida a 1000 ppm. Foi adicionado aos tubos, 0,05ml do inóculo

com densidade 2 (observada através do Cartão de Whickerham) e foram incubados a 27°C por 21 dias, sendo agitados diariamente. O crescimento da cultura foi observado através do Cartão de Whickerham, após 7, 14 e 21 dias de incubação, de modo semelhante aos testes de assimilação.

4.3.6.8. Teste de Crescimento em Meio Livre de Vitaminas (VFB)

A necessidade de vitaminas para o crescimento das leveduras é muito variável entre as espécies. Esta característica foi verificada através do crescimento da linhagem em meio líquido desprovido de vitaminas.

Em tubos de ensaio contendo 2,25 ml de água destilada estéril, foi adicionado 0,25 ml de solução de meio VFB (vitamin free base). O tubo foi inoculado com 0,05 ml do inóculo com densidade 2 (observada através do Cartão de Whickerham) e incubado a 27°C por 21 dias (com agitação diariamente). O crescimento da cultura foi observado através do Cartão de Whickerham.

4.3.6.9. Teste da Atividade da Arbutina

Este teste tem a finalidade de verificar a habilidade das leveduras de hidrolisar a arbutina pela ação da β -galactosidase. Os compostos resultantes da hidrólise da arbutina, em presença de sais de ferro presentes no meio, acarretam uma mudança de coloração do meio de cultura, que passa de branco para marrom escuro devido aos sais de Fe^{+3} presentes no meio.

A cultura foi repicada em tubos de arbutina ágar (0,5% de arbutina, 0,5% de extrato de levedura, 2,0% de ágar e 1,0ml de uma solução 1,0% de citrato

férrico de amônia) e incubados a 27°C por 5 a 7 dias. A mudança de coloração do meio de cultura de branco para marrom, indica resultado positivo.

4.3.6.10. Teste de Produção de Ácido

Certas leveduras produzem ácido a partir de glicose e esta característica pode ser verificada através do meio sólido contendo carbonato de cálcio e glicose.

A cultura foi repicada em tubos inclinados de carbonato de cálcio ágar (0,5% de extrato de levedura, 5,0% de glicose, 0,5% de carbonato de cálcio e 2,0% de ágar) e incubados a 27°C, por 5 a 7 dias. Após 7 dias de incubação, o ácido formado pela linhagem é capaz de dissolver o carbonato de cálcio disperso no meio de cultura, produzindo halos translúcidos.

4.3.6.11. Teste de Formação de Compostos Amilóides Extra-celulares

Algumas linhagens de levedura, quando crescidas em glicose, formam polissacarídeos extra-celulares, que podem ser observados através de uma reação com iodo.

Após o crescimento de 21 dias, foi pingado 1 a 2 gotas de solução de lugol ao tubo de glicose do teste de assimilação. O tubo foi agitado e sua coloração observada. A cor azul indica a formação de compostos amilóides, sendo o teste positivo; a coloração marrom é indicativo de teste negativo.

4.3.6.12. Teste Diazonium Blue B (DBB)

O teste foi realizado em culturas crescidas em placas de Petri contendo o meio GYP ágar com 3 semanas de incubação à temperatura de 27°C. Pode-se reduzir este tempo, colocando-se a placa para incubar a 55-60°C por 16 horas.

Sobre a colônia foi pingado 1 a 2 gotas do reagente Diazonium Blue B, e deixado à temperatura ambiente por 1 a 2 minutos. A reação é considerada positiva quando apresentar uma coloração vermelha escura ou violeta. Na reação negativa não há alteração de cor.

Dissolveu-se 15 mg de DBB salt em 15 ml de tampão tris a 0,25M em pH 7,0. Este reagente é instável, e portanto foi utilizado num período de 30 minutos.

V - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 IDENTIFICAÇÃO DA LINHAGEM DE LEVEDURA LB-250

A linhagem de levedura previamente isolada e selecionada para este trabalho, foi classificada de acordo com KREGER-VAN RIJ (1984) e BARNETT et al. (1990), como *Pichia membranaefaciens*, pois apresentou características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas pertencentes a esta espécie. Os resultados sobre as características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas da levedura submetida à identificação em nível de gênero e espécie serão apresentados a seguir.

5.1.1 Características da Reprodução Vegetativa

5.1.1.1 Morfologia das Células

As formas observadas da linhagem de levedura LB-250 em microscópio óptico foram esféricas e elipsóides. O tipo de reprodução observado foi brotamento multipolar, que significa que esta linhagem de levedura se reproduz assexuadamente (gemulação). Observar as figuras 1a e 1b.

A coloração das colônias em meio YM ágar e GYP ágar foi branca-creme. A configuração das colônias da levedura selecionada foi arredondada, possuindo superfície rugosa e margem lanosa. Não apresentou brilho, sendo portanto caracterizada como opaca. A textura das colônias era cremosa, não apresentou dificuldade na remoção do meio sólido. A elevação das colônias foi do tipo “drop-like”. Observar as figuras 2a e 2b.

A levedura apresentou a característica de formar pseudomicélio nos meios de cultura Yeast Malt ágar, GYP ágar e CMA ágar. Observar as figuras 3a a 5b. Não foi observada a formação de balistosporos no meio de cultura GYP ágar.

5.1.2 Resultados dos Testes Fisiológicos e Bioquímicos

De acordo com KREGER VAN-RIJ (1984) e BARNETT et al. (1990), *Pichia membranaefaciens* é capaz de fermentar glicose, D-xilose, ácido succínico, ácido láctico, etanol e glicerol. Em nossos estudos, esta linhagem de levedura também foi capaz de fermentar mais dois compostos, amido e inulina. Entretanto, todos os outros testes realizados coincidiram com os resultados esperados para esta espécie, sendo portanto esta pequena diferença, decorrente da diversidade metabólica entre as espécies.

A linhagem de levedura estudada apresentou respostas negativas aos testes de DBB, teste de assimilação de nitrato, teste de crescimento a temperatura a 37°C, teste de resistência a ciclohexamida, teste de crescimento em meio livre de vitaminas, testes de osmotolerância, teste da produção de amônia a partir da uréia, teste de produção de compostos amilóides extracelulares e teste da atividade arbutina. A produção de ácido foi fraca e não houve formação de balistosporos.

Os resultados dos testes de fermentação de açúcares, de assimilação de compostos de carbono, de nitrato, etilamina, L-lisina e VFB, estão apresentados na Tabela 3:

Tabela 3: Resultados dos testes de fermentação, assimilação de fontes de carbono e de nitrogênio da linhagem de levedura LB-250:

Fontes de Carbono e de Nitrogênio	Resultados
Glicose	+
Galactose	-
Sacarose	-
Maltose	-
Celobiose	-
Trealose	-
Lactose	-
Rafinose	-
Amido	+
D-Xilose	+
L-Arabinose	-
D-Arabinose	-
D-Ribose	-
L-Ramnose	-
Eritritol	-
Ribitol (Adonitol)	-
D-Manitol	-
Ácido Succínico	+
Ácido Cítrico	-
Inositol	-
L-Sorbose	-
Melizítose	-
Melibiose	-
Inulina	+
Etanol	+
Glicerol	+
Galactitol (Dulcitol)	-
Sorbitol (Glucitol)	-
α -m-d-Glucosídeo	-
Salicina	-
Ácido Lático	+
Metanol	-
Ciclohexamida 100	-
Ciclohexamida 1000	-
NaCl 10%	-
KNO ₃	-
NaNO ₂	-
Lisina	+
Etilamina	+
VFB	-

Figuras de *Pichia membranaefaciens* realizadas para caracterização de sua morfologia e reprodução

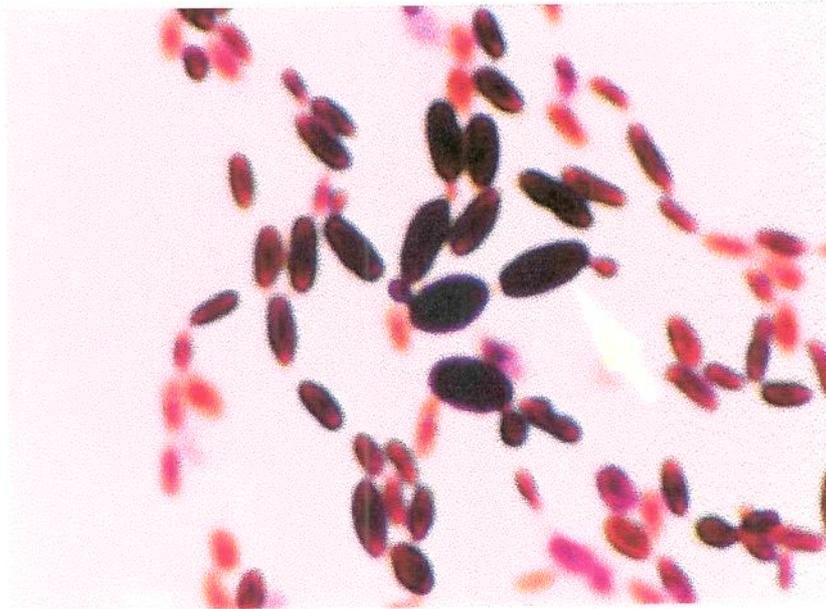


Figura 1a: Células de *Pichia membranaefaciens* coradas por Gram, cultivadas em meio de cultura Yeast Malt, com 48 horas de crescimento. Visualiza-se células esféricas e elipsóides e brotamento multipolar (na seta). Aumento de 1250 vezes.

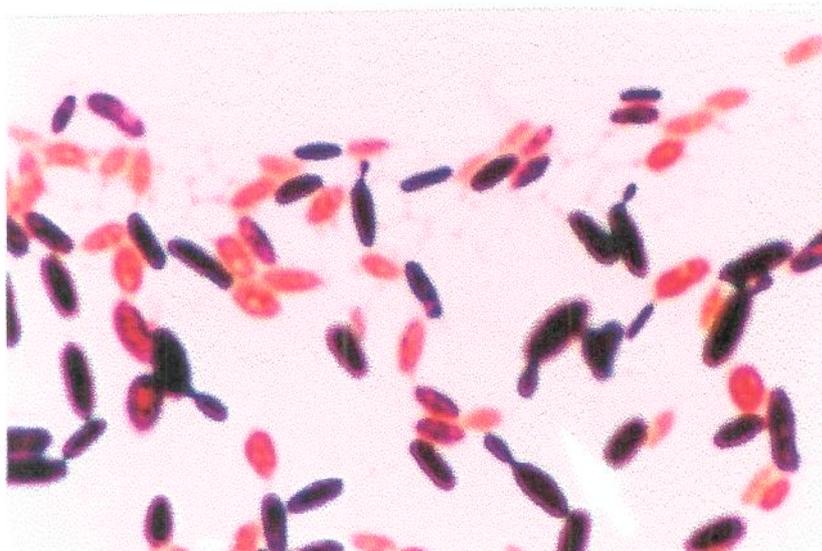


Figura 1b: Células de *Pichia membranaefaciens* coradas por Gram, cultivadas meio de cultura Yeast Malt, com 48 horas de crescimento. Visualiza-se células esféricas e elipsóides e brotamento multipolar (na seta). Aumento de 1250 vezes.



Figura 2a: Colônias de *Pichia membranaefaciens* cultivadas em meio de cultura Yeast Malt ágar, com 48 horas de crescimento. Nesta placa foram verificadas as características morfológicas da linhagem de *Pichia membranaefaciens*, tais como: configuração arredondada, com superfície rugosa e margem lanosa.

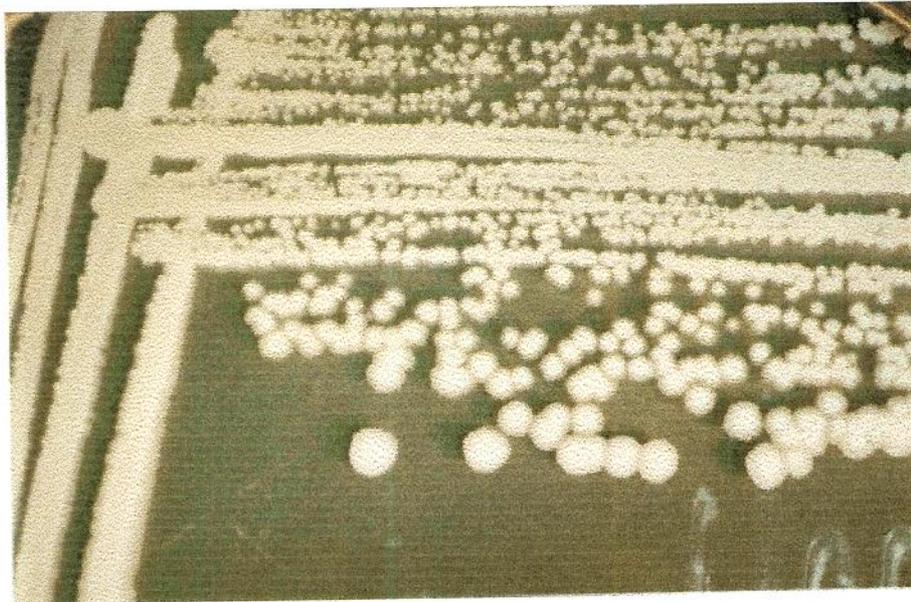


Figura 2b: Colônias de *Pichia membranaefaciens* cultivadas em meio de cultura Yeast Malt ágar, com 48 horas de crescimento. Nesta placa foram verificadas as características morfológicas da linhagem de *Pichia membranaefaciens*, tais como: configuração arredondada, com superfície rugosa e margem lanosa (em detalhe).

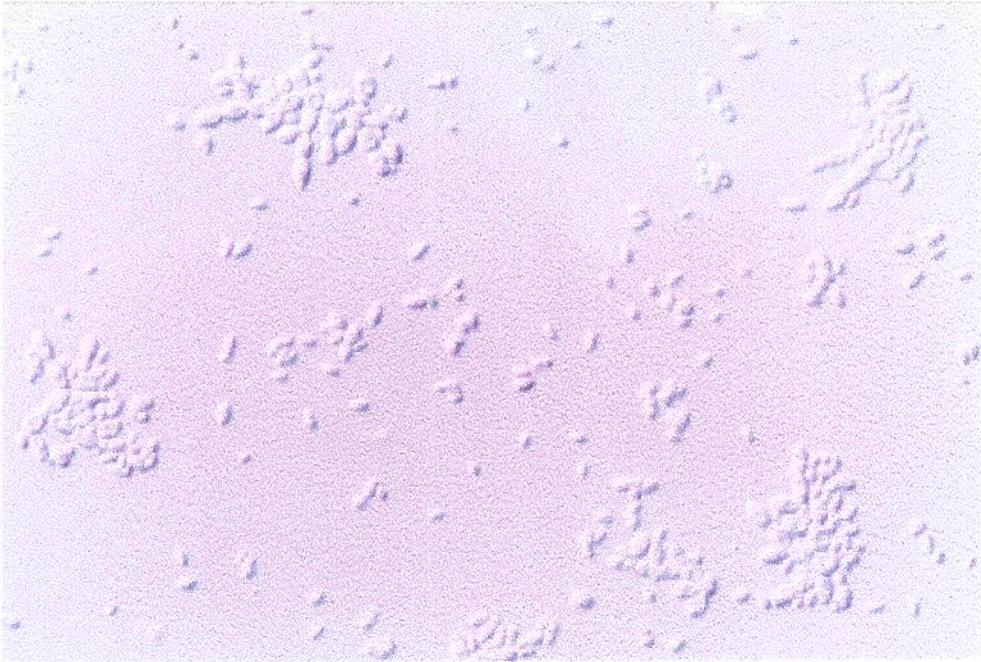


Figura 3a: Células de *Pichia membranaefaciens* cultivadas em meio de cultura Yeast Malt ágar com 48 horas de crescimento. Visualiza-se formação de pseudomicélio. Aumento de 250 vezes.

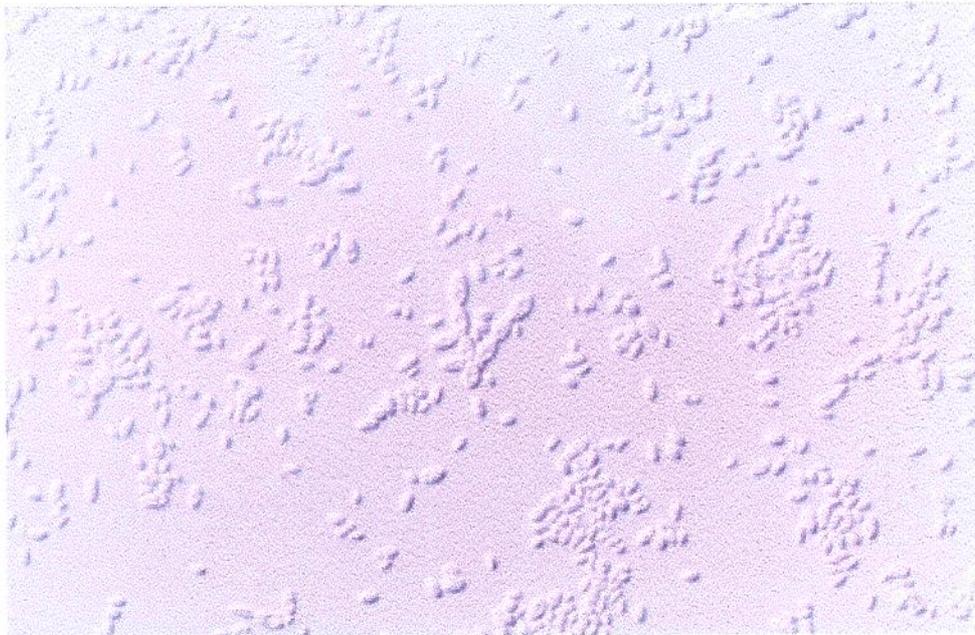


Figura 3b: Células de *Pichia membranaefaciens* cultivadas em meio de cultura Yeast Malt ágar com 48 horas de crescimento. Visualiza-se formação de pseudomicélio. Aumento de 250 vezes.

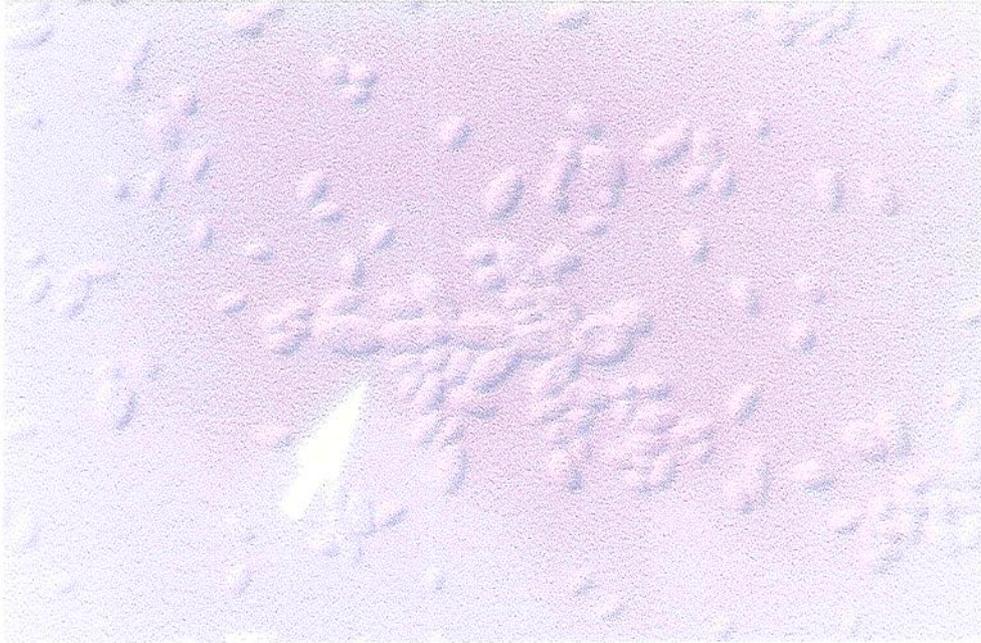


Figura 4a: Células de *Pichia membranaefaciens* cultivadas em meio Yeast Malt ágar, com 48 horas de crescimento. Visualiza-se células esféricas e elipsóides e formação de pseudomicélio (na seta). Aumento de 500 vezes.

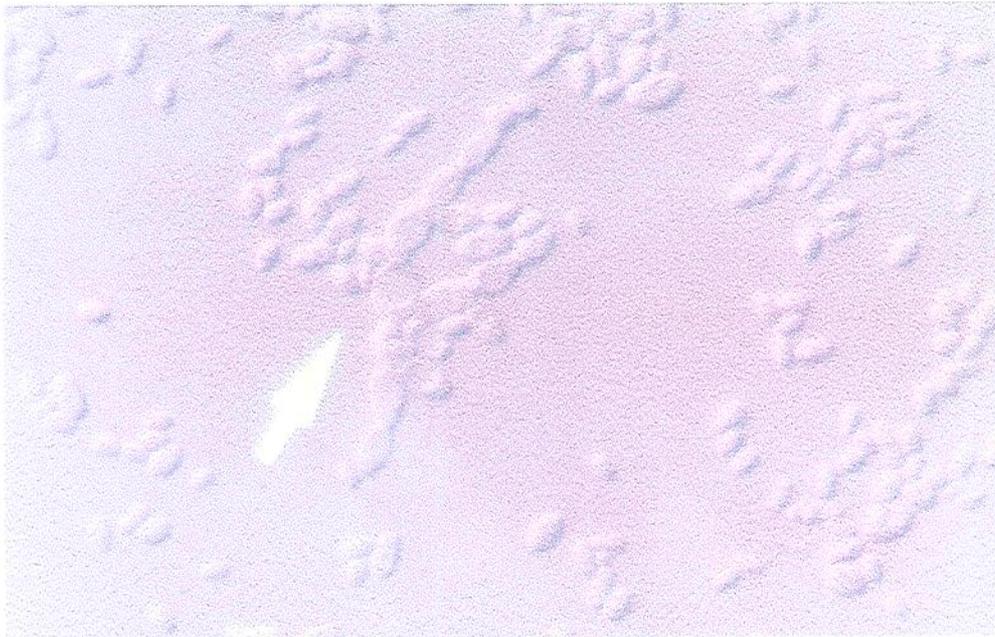


Figura 4b: Células de *Pichia membranaefaciens* cultivadas em meio Yeast Malt ágar, com 48 horas de crescimento. Visualiza-se células esféricas e elipsóides e formação de pseudomicélio (na seta). Aumento de 500 vezes.



Figura 5a: Células de *Pichia membranaefaciens* cultivadas em meio de cultura Yeast Malt ágar, com 48 horas de crescimento. Visualiza-se a formação de pseudomicélio (na seta). Aumento de 1250 vezes.



Figura 5b: Células de *Pichia membranaefaciens* cultivadas em meio de cultura Yeast Malt ágar, com 48 horas de crescimento. Visualiza-se a formação de pseudomicélio (na seta). Aumento de 1250 vezes.

5.1.3 Determinação da Curva de Crescimento

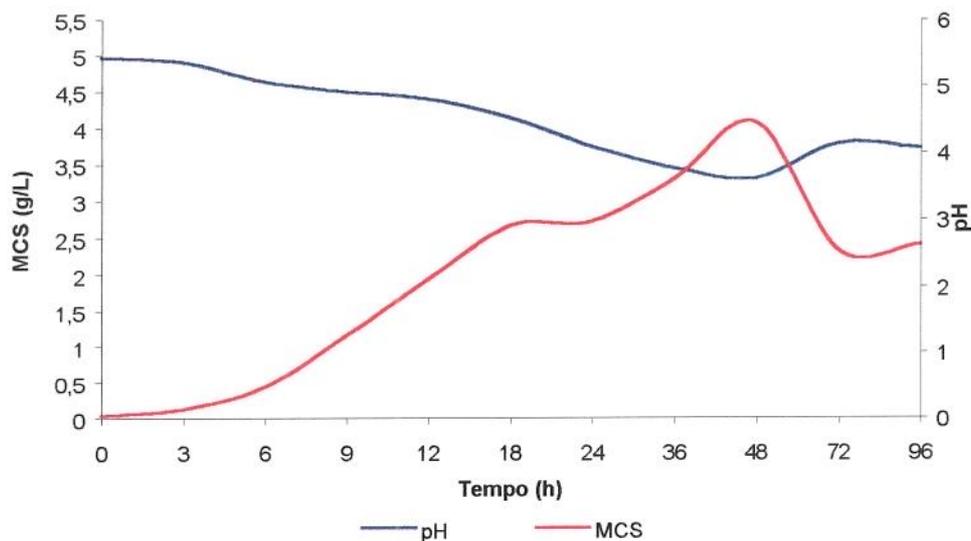


Figura 6: Curva de crescimento da levedura *Pichia membranaefaciens* no meio de cultura contendo glicose como fonte de carbono e autolisado de levedura como fonte de nitrogênio, durante 96 horas de crescimento. MCS, massa celular seca em g/L.

A figura 6 mostra as mudanças na biomassa e nos valores de pH na determinação da curva de crescimento de *Pichia membranaefaciens*, no meio de cultura usado como padrão Glicose/Autolisado de levedura. A biomassa mostrou um rápido crescimento e alcançou seu ponto máximo em 48 horas. Concomitantemente ao aumento de biomassa, observou-se a acidificação do meio de cultura.

O suprimento de glicose causou um aumento gradual na biomassa até 48 horas de incubação. Após este período, é possível que este suprimento de glicose

Resultados semelhantes foram relatados por FABRE et al., 1995. Os autores registraram um aumento da biomassa até 40 horas de incubação, dando uma produção de 16 g/L de massa celular seca. Analisando-se os gráficos mostrados por este autores, verificou-se também, a acidificação do meio de cultura em até 48 horas de incubação. Em seguida foi registrado um aumento gradual dos valores de pH do meio de cultura contendo glicose e extrato de levedura.

5.2 Seleção das Fontes de Carbono e de Nitrogênio para Produção de Compostos Voláteis com Aroma de Frutas pela Linhagem de *Pichia membranaefaciens*:

Neste estudo de seleção das fontes de carbono e de nitrogênio, foram testadas como fontes de carbono para a produção de aromas de frutas: glicose, frutose, galactose, sacarose, lactose, maltose, amido e manose. As fontes nitrogenadas foram: autolisado de levedura, extrato de levedura, extrato de malte, peptona, uréia, NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e NH_4Cl .

Foi observado um agradável aroma de fruta quando as fontes de carbono foram glicose, frutose e manose. As fontes de carbono: amido, sacarose, maltose, galactose e lactose não apresentaram nenhum odor característico de frutas.

Foi observado para as três fontes de carbono selecionadas, a formação de aroma de frutas logo após 24 horas de fermentação, se intensificando após 48 horas. O aroma se assemelha ao de banana madura.

Os resultados da seleção das fontes de carbono na produção de aroma de frutas pela linhagem de *Pichia membranaefaciens*, estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Resultados da seleção das fontes de carbono na produção de aroma de frutas por *Pichia membranaefaciens*:

Fontes de Carbono	24 Horas	48 Horas	72 Horas	96 Horas
Glicose	+	+	+	+
Amido	-	-	-	-
Sacarose	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-
Galactose	-	-	-	-
Manose	+	+	+	+
Frutose	+	+	+	+

Os resultados da seleção das fontes de nitrogênio na produção de aroma de frutas pela linhagem de *Pichia membranaefaciens*, estão apresentados na Tabela 5.

Dentre elas, apenas o autolisado de levedura e o extrato de levedura produziram aroma agradável de frutas quando as fontes de carbono foram glicose, frutose e manose. As outras fontes de nitrogênio quando não apresentaram cheiro, o odor era desagradável, principalmente quando a fonte de nitrogênio era peptona.

Tabela 5: Resultados da seleção das fontes de nitrogênio na produção de aroma de frutas por *Pichia membranaefaciens*:

Fontes Nitrogenadas	24 Horas	48 Horas	72 Horas	96 Horas
Autolisado de levedura	+	+	+	+
Extrato de levedura	+	+	+	+
Extrato de malte	-	-	-	-
Peptona	-	-	-	-
Uréia	-	-	-	-
NaNO ₃	-	-	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	-	-
NH ₄ Cl	-	-	-	-

5.3 Seleção dos Meios de Cultura para Produção de Compostos Voláteis de Aroma de Frutas pela Linhagem de *Pichia membranaefaciens*:

Para a realização destes experimentos, foram selecionadas as seguintes fontes de carbono: glicose, frutose e manose, e as seguintes fontes de nitrogênio: autolisado de levedura e extrato de levedura. Assim, a composição dos meios de cultura utilizados nos experimentos foi:

Meio G/AL: 20 ml de autolisado de levedura, 10 ml de água destilada e 5% de glicose;

Meio F/AL: 20 ml de autolisado de levedura, 10 ml de água destilada e 5% de frutose;

Meio M/AL: 20 ml de autolisado de levedura, 10 ml de água destilada e 5% de manose;

Meio G/EL: 30 ml de água destilada, 5% de glicose e 0,5% de extrato de levedura;

Meio F/EL: 30 ml de água destilada, 5% de frutose e 0,5% de extrato de levedura;

Meio M/EL: 30 ml de água destilada, 5% de manose e 0,5% de extrato de levedura.

5.4 Efeito do pH Inicial na Produção de Massa Celular Seca da Linhagem de *Pichia membranaefaciens*:

O estudo do efeito do pH inicial no meio de cultura na produção de massa celular seca de *Pichia membranaefaciens*, foi realizado nos seis meios de cultura selecionados. A produção de massa celular seca de *Pichia membranaefaciens* foi testada nos pHs iniciais 4,0, 5,0, 6,0 e 7,0. Observar as figuras 7a, 8a e 9a.

Analisando a influência do pH inicial na produção de massa celular seca de *Pichia membranaefaciens*, observou-se que quando se variava as fontes de nitrogênio nos meios de cultura, o pH inicial 4,0, foi o que produziu maior massa celular seca nos meios contendo extrato de levedura, como fonte de nitrogênio. O mesmo não ocorreu para o autolisado de levedura, já que este sempre apresentou maiores massas celulares em pHs entre 5,0 e 7,0. Observar as figuras 7b, 8b, 9b.

Tabela 6: Teste do Efeito do pH Inicial na Produção de Massa Celular Seca de *Pichia membranaefaciens*

Meios de cultura	pH inicial	pH final	Massa celular seca (g/L)
G/AL	4,0	3,33	4,02
G/AL	5,0	3,86	4,28
G/AL	6,0	4,17	4,39
G/AL	7,0	3,35	4,41
G/EL	4,0	3,37	4,40
G/EL	5,0	3,80	3,84
G/EL	6,0	3,98	3,55
G/EL	7,0	4,15	3,47
F/AL	4,0	3,25	3,96
F/AL	5,0	3,92	4,04
F/AL	6,0	4,14	3,92
F/AL	7,0	3,17	3,85
F/EL	4,0	3,26	4,11
F/EL	5,0	3,64	3,68
F/EL	6,0	3,73	3,54
F/EL	7,0	3,86	3,39
M/AL	4,0	3,28	3,72
M/AL	5,0	3,68	3,78
M/AL	6,0	3,86	4,40
M/AL	7,0	3,86	3,91
M/EL	4,0	3,34	4,22
M/EL	5,0	3,69	3,79
M/EL	6,0	4,01	3,65
M/EL	7,0	4,15	3,47

Analisando os resultados expostos na tabela 6, não foram verificadas grandes alterações na massa celular de *Pichia membranaefaciens* nos quatro pHs testados. Portanto, para as análises de compostos voláteis produzidos por *Pichia mebranaefaciens*, foram selecionados os pHs que apresentaram a maior massa celular seca de *Pichia membranaefaciens* nos meios de cultura estudados.

Figura 7a: Crescimento da linhagem de *Pichia membranaefaciens* nos meios de cultura selecionados a 20°C:

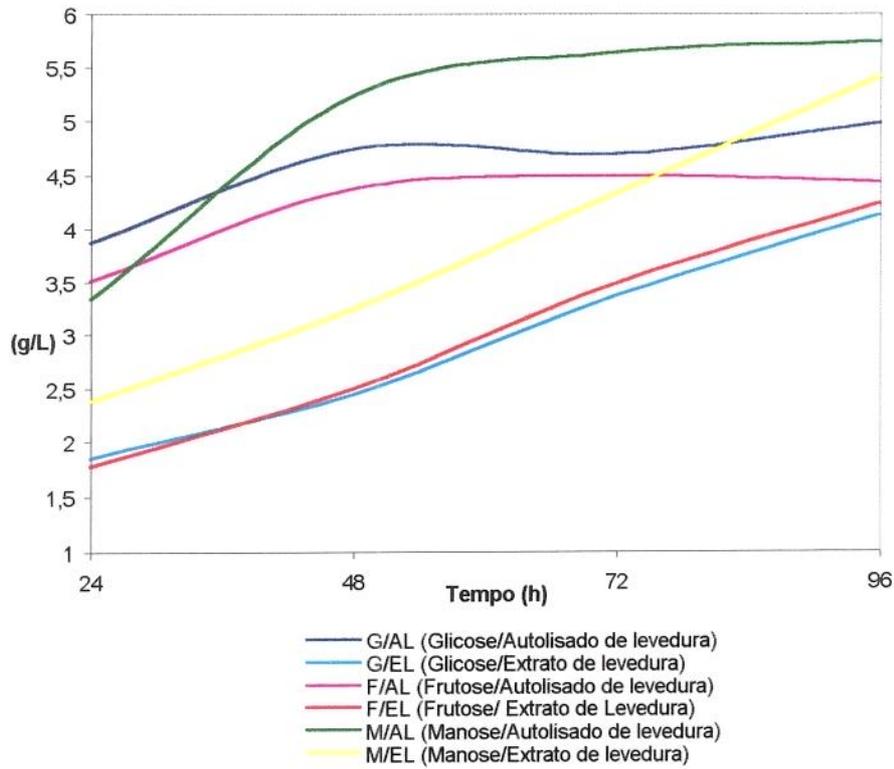


Figura 7b: Variação do pH nos meios de cultura selecionados a 20°C

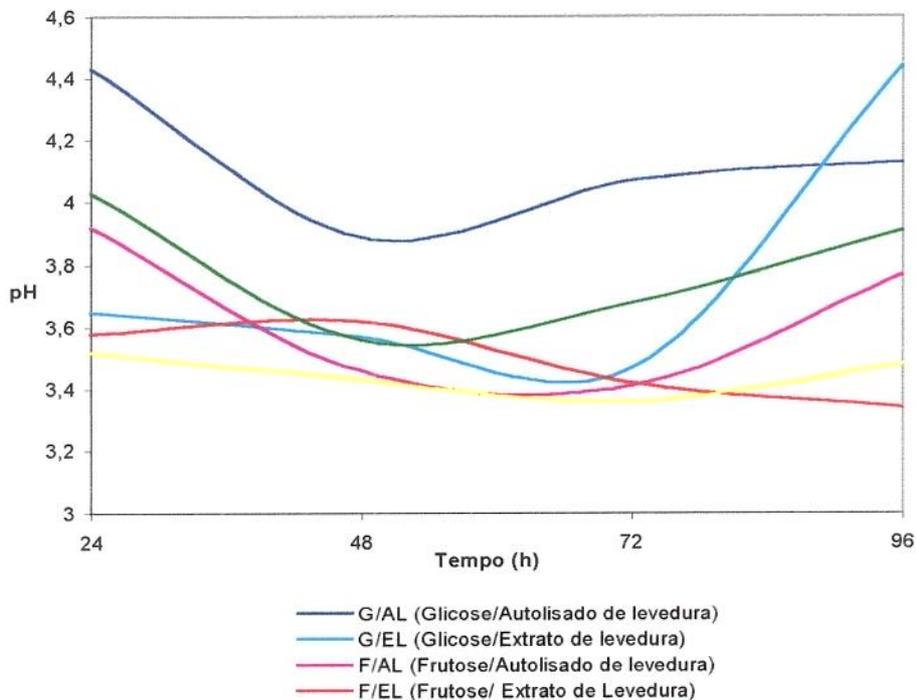


Figura 8a: Crescimento da linhagem de *Pichia membranaefaciens* nos meios de cultura selecionados a 25°C:

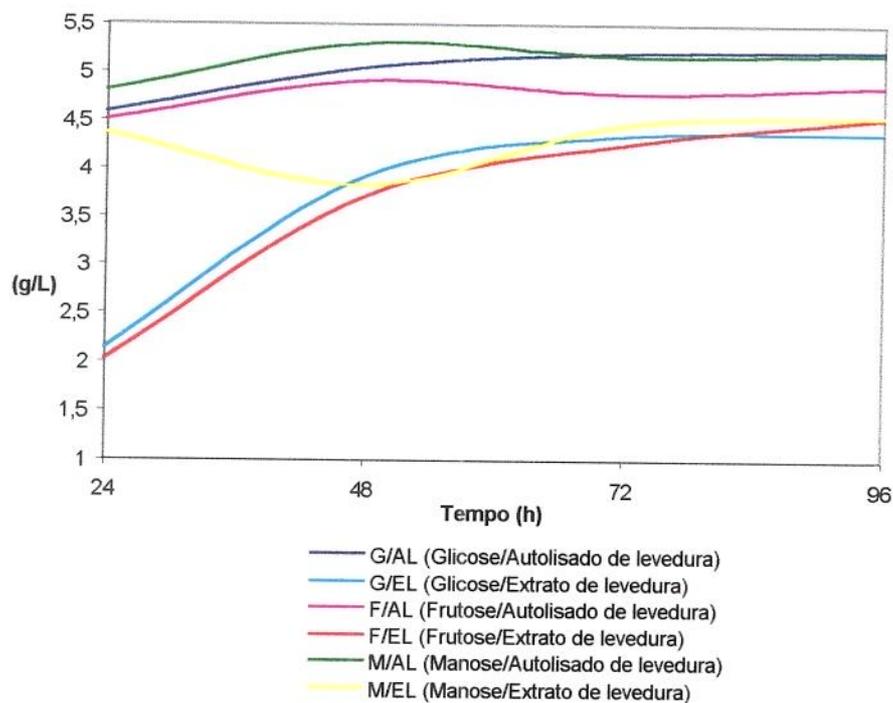


Figura 8b: Variação do pH nos meios de cultura selecionados a 25°C

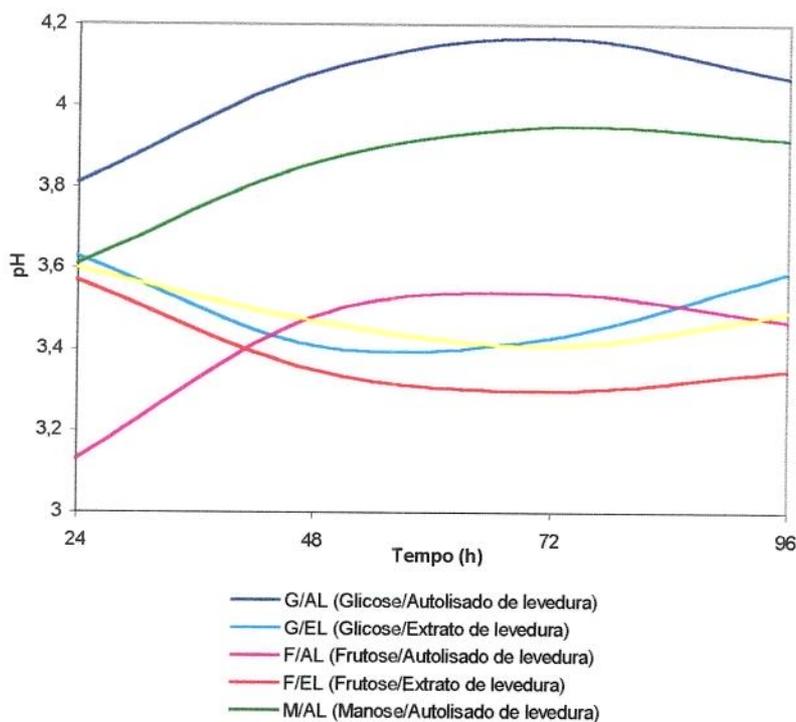


Figura 9a: Crescimento da linhagem de *Pichia membranaefaciens* nos meios de cultura selecionados a 30°C:

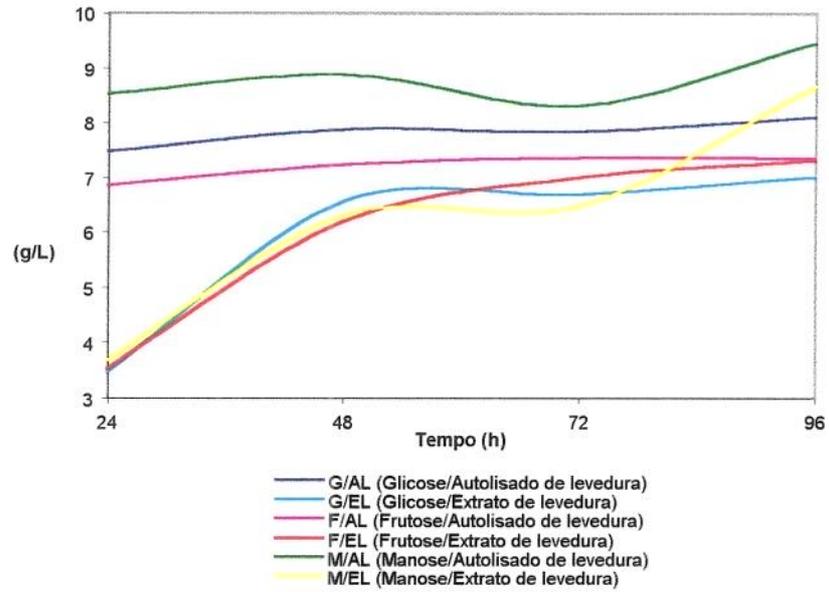
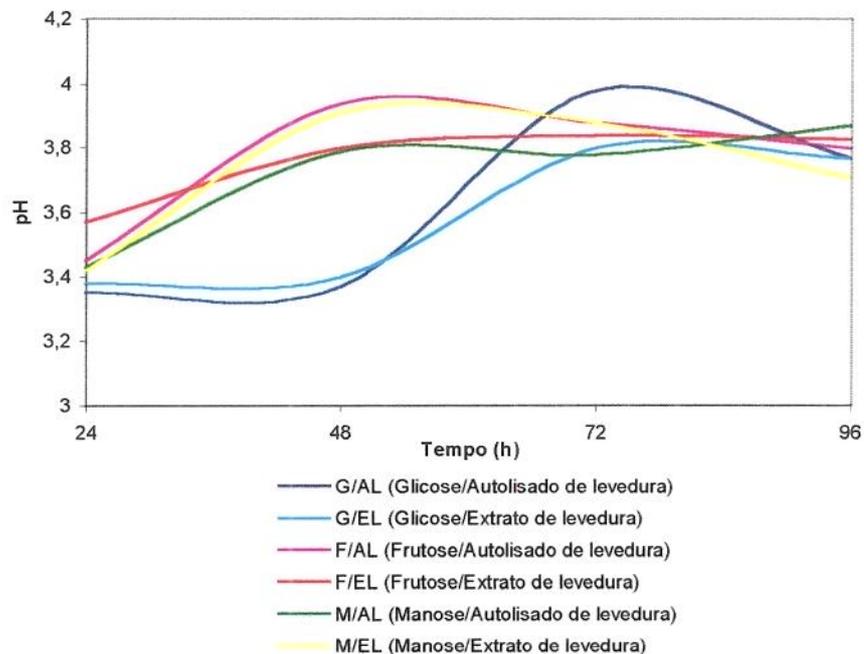


Figura 9b: Variação do pH nos meios de cultura selecionados a 30°C



5.5 Efeito da Temperatura de Incubação na Produção de Compostos Voláteis com Aroma de Frutas pela Linhagem de *Pichia membranaefaciens*:

Com relação à influência da temperatura de incubação na produção de compostos voláteis, observou-se que *Pichia membranaefaciens* não resistiu à temperatura de 40°C, fato este comprovado pelos testes fisiológicos para a identificação de levedura, uma vez que não foi observado crescimento a 37°C. Sendo assim, foi inviável a produção de aroma de frutas por *Pichia membranaefaciens* nesta temperatura.

Nas temperaturas de 20°C, 25°C e 30°C a linhagem de *Pichia membranaefaciens* cresceu em todos os meios testados, entretanto não apresentou grandes alterações no aroma da cultura, apenas pequenas variações na intensidade, o que se deve às diferentes concentrações dos compostos produzidos, nos diferentes tempos de fermentação. Após 24 horas de fermentação, foi observado aroma de frutas nos meios de cultura inoculados por *Pichia membranaefaciens*.

Entre as temperaturas testadas, a que apresentou maior rendimento do composto acetato de etila foi a de 30°C. Isto foi verificado em todos os meios de cultura selecionados. As maiores quantidades observadas ficaram entre 27,3 g/L no meio de cultura Manose/Autolisado de levedura e 46,07 g/L no meio de cultura Glicose/Autolisado de levedura. Os dados numéricos podem ser observados no Anexo 1.

5.6 Relação entre o Tempo de Fermentação e a Produção de Compostos Voláteis com Aroma de Frutas pela Linhagem de *Pichia membranaefaciens*:

O aroma produzido pela linhagem de *Pichia membranaefaciens* foi mais agradável sensorialmente após 48 horas de fermentação. O aroma gerado pode ser caracterizado como de banana madura. Os compostos voláteis produzidos nos meios de cultura por *Pichia membranaefaciens* tiveram seus rendimentos máximos em condições distintas. Estes resultados podem ser observados nas figuras 10 a 27, e os dados numéricos no Anexo 1.

5.7 Resultados Obtidos com o Meio Glicose/Autolisado de levedura

As figuras 10, 11 e 12 ilustram as quantidades dos compostos formados no processo fermentativo com o meio de cultura glicose/autolisado de levedura nas temperaturas de 20°C, 25°C e 30°C.

Nas figuras 10, 11 e 12, os aspectos observados serão os de influência da temperatura na natureza e na quantidade dos compostos voláteis produzidos por *Pichia membranaefaciens*.

Neste meio foram encontrados os seguintes compostos: acetato de etila, isobutanol (2-metil 1-propanol), 1-butanol, álcool isoamílico (3-metil 1-butanol), álcool n-amílico (2-metil 1-butanol), acetato de n-butila (butil éster de ácido acético), acetato de isoamila (acetato 3-metil 1-butanol), caproato de etila (etil éster de ácido hexanóico), álcool feniletílico (2-feniletanol).

Analisando as quantidades dos compostos voláteis formados nas três temperaturas testadas, na temperatura de 30°C, as maiores taxas foram dos compostos: acetato de etila (46,07g/L), isobutanol (3,73 g/L), 1-butanol (3,21 g/L), propanoato de etila (0,74 g/L) e acetato de isoamila (90,38 g/L).

Álcool n-amílico e álcool isoamílico tiveram seus maiores rendimentos a 25°C, em diferentes tempos de fermentação. O primeiro a 24 horas e o segundo em 96 horas de fermentação.

À temperatura de 20°C, foram verificadas as maiores taxas de produção de acetato de n-butila (0,28 g/L), caproato de etila (0,0215 g/L) e álcool feniletílico (0,595 g/L).

5.8 Resultados Obtidos com o Meio Glicose/Extrato de levedura

As figuras 13, 14 e 15 ilustram as quantidades dos compostos formados no processo fermentativo com o meio de cultura glicose/extrato de levedura nas temperaturas de 20°C, 25°C e 30°C.

Nas figuras 13,14 e 15, os aspectos observados serão os de influência da temperatura na natureza e na quantidade dos compostos voláteis produzidos por *Pichia membranaefaciens*.

Neste meio foram encontrados os seguintes compostos: acetato de etila, isobutanol, 1-butanol, álcool isoamílico, álcool n-amílico, acetato de n-butila, acetato de isoamila, caproato de etila, álcool feniletílico.

Altas taxas de acetato de etila e de isobutanol foram encontradas neste meio de cultura a 30°C. A quantidade de acetato de etila foi em torno de 34 g/L e de isobutanol 3,88 g/L, as maiores quando comparadas às outras duas temperaturas. Nesta temperatura também foram encontradas as maiores concentrações de propanoato de etila, acetato de isoamila e caproato de etila. As quantidades correspondem a 0,302 g/L; 0,480g/L e 0,286 g/L respectivamente.

A 25°C, o único composto produzido em grande quantidade quando comparado às outras temperaturas, foi o álcool isoamílico, com a concentração em torno de 2,65 g/L.

A 20°C, foram encontradas as maiores taxas de 1-butanol, álcool n-amílico, acetato de n-butila e álcool feniletílico, nas concentrações de 3,902 g/L; 0,824 g/L; 0,193 g/L e 1,707 g/L respectivamente. Quantidades similares de acetato de etila foram encontradas nas temperaturas de 20°C e 25° C, 7,532g/L e 7,462 g/L respectivamente.

5.9 Resultados Obtidos com o Meio Frutose/Autolisado de levedura

As figuras 16, 17 e 18 ilustram as quantidades dos compostos formados no processo fermentativo com o meio de cultura frutose/autolisado de levedura nas temperaturas de 20°C, 25°C e 30°C.

Nas figuras 16, 17 e 18, os aspectos observados serão os de influência da temperatura na natureza e na quantidade dos compostos voláteis produzidos por *Pichia membranaefaciens*.

Neste meio foram encontrados os seguintes compostos: acetato de etila, isobutanol, 1-butanol, álcool isoamílico, álcool n-amílico, acetato de n-butila, acetato de isoamila, caproato de etila, álcool feniletílico.

As maiores taxas de acetato de etila e isobutanol foram registradas à temperatura de 30°C, nas concentrações de 33,37 g/L e 2,282 g/L respectivamente. Foi observado a 25°C, uma pequena produção de acetato de etila, não ultrapassando a 2,169 g/L.

A 25°C, foram encontradas as maiores concentrações de 1-butanol (2,23 g/L), acetato de isoamila (0,755 g/L), caproato de etila (0,090 g/L) e álcool feniletílico (90,52 g/L), quando comparadas às outras temperaturas.

Propanoato de etila, álcool isoamílico, álcool n-amílico e acetato de n-butila foram obtidos as maiores concentrações a 20°C, em torno de 0,49 g/L; 1,027 g/L; 1,637 g/L e 0,283 g/L respectivamente.

5.10 Resultados Obtidos com o Meio Frutose/Extrato de levedura

As figuras 19, 20 e 21 ilustram as quantidades dos compostos formados no processo fermentativo com o meio de cultura frutose/extrato de levedura nas temperaturas de 20°C, 25°C e 30°C.

Nas figuras 19, 20 e 21, os aspectos observados serão os de influência da temperatura na natureza e na quantidade dos compostos voláteis produzidos por *Pichia membranaefaciens*.

Neste meio foram encontrados os seguintes compostos: acetato de etila, isobutanol, 1-butanol, álcool isoamílico, álcool n-amílico, acetato de n-butila, acetato de isoamila, caproato de etila, álcool feniletílico.

Acetato de etila, isobutanol, e 1-butanol obtiveram as mais altas concentrações neste meio de cultura a 30°C, 41,98 g/L; 3,579 g/L e 1,73 g/L respectivamente.

Propanoato de etila, álcool isoamílico, álcool n-amílico e acetato de isoamila, obtiveram as maiores concentrações a 25°C, em torno de 0,528 g/L; 1,61 g/L; 0,47 g/L e 0,267 g/L respectivamente.

5.11 Resultados Obtidos com o Meio Manose/Autolisado de levedura

As figuras 22, 23 e 24 ilustram as quantidades dos compostos formados no processo fermentativo com o meio de cultura manose/autolisado de levedura nas temperaturas de 20°C, 25°C e 30°C.

Nas figuras 22, 23 e 24, os aspectos observados serão os de influência da temperatura na natureza e na quantidade dos compostos voláteis produzidos por *Pichia membranaefaciens*.

Neste meio foram encontrados os seguintes compostos: acetato de etila, isobutanol, 1-butanol, álcool isoamílico, álcool n-amílico, acetato de n-butila, acetato de isoamila, caproato de etila, álcool feniletílico.

O composto isobutanol apresentou uma concentração bastante elevada a 30°C, ultrapassando a concentração de acetato de etila, fato este que não havia ocorrido até então. Sua concentração foi em torno de 42,07 g/L enquanto a de acetato de etila foi de 27,337 g/L. 1-butanol, propanoato de etila e álcool n-amílico tiveram suas maiores concentrações a 30°C, 2,88 g/L; 0,831 e 0,191 g/L respectivamente.

Registrou-se uma alta concentração de álcool isoamílico a 25°C, cerca de 2,33 g/L. Nesta temperatura, também foram encontradas as maiores quantidades dos compostos acetato de isoamila (0,862 g/L) e caproato de etila (0,255 g/L).

A 20°C, registrou-se uma alta produção de acetato de n-butila (3,089 g/L). A concentração de álcool feniletílico encontrada nesta temperatura foi de 0,259 g/L, a maior entre as temperaturas.

5.12 Resultados Obtidos com o Meio Manose/Extrato de levedura

As figuras 25, 26 e 27 ilustram as quantidades dos compostos formados no processo fermentativo com o meio de manose/extrato de levedura nas temperaturas de 20°C, 25°C e 30°C.

Nas figuras 25, 26 e 27, os aspectos observados serão os de influência da temperatura na natureza e na quantidade dos compostos voláteis produzidos por *Pichia membranaefaciens*.

Neste meio foram encontrados os seguintes compostos: acetato de etila, isobutanol, 1-butanol, álcool isoamílico, álcool n-amílico, acetato de n-butila, acetato de isoamila, caproato de etila, álcool feniletílico.

O composto acetato de etila apresentou sua maior concentração a 30°C, em torno de 35,16 g/L. Nesta temperatura, o composto propanoato também apresentou sua maior quantidade, 1,120 g/L.

Altas quantidades de isobutanol (3,334 g/L), 1-butanol (6,88 g/L) e acetato de isoamila foram registradas a 20°C. Nesta temperatura, foram observadas as maiores concentrações dos compostos álcool isoamílico (1,864 g/L) álcool n-amílico (0,194 g/L) e acetato de n-butila (0,583 g/L).

Caproato e álcool fenilético produziram suas maiores concentrações a 25°C, em torno de 0,329 g/L e 0,269 g/L, respectivamente.

Efeito da Temperatura de Incubação na Produção de Compostos Voláteis por *Pichia membranaefaciens*

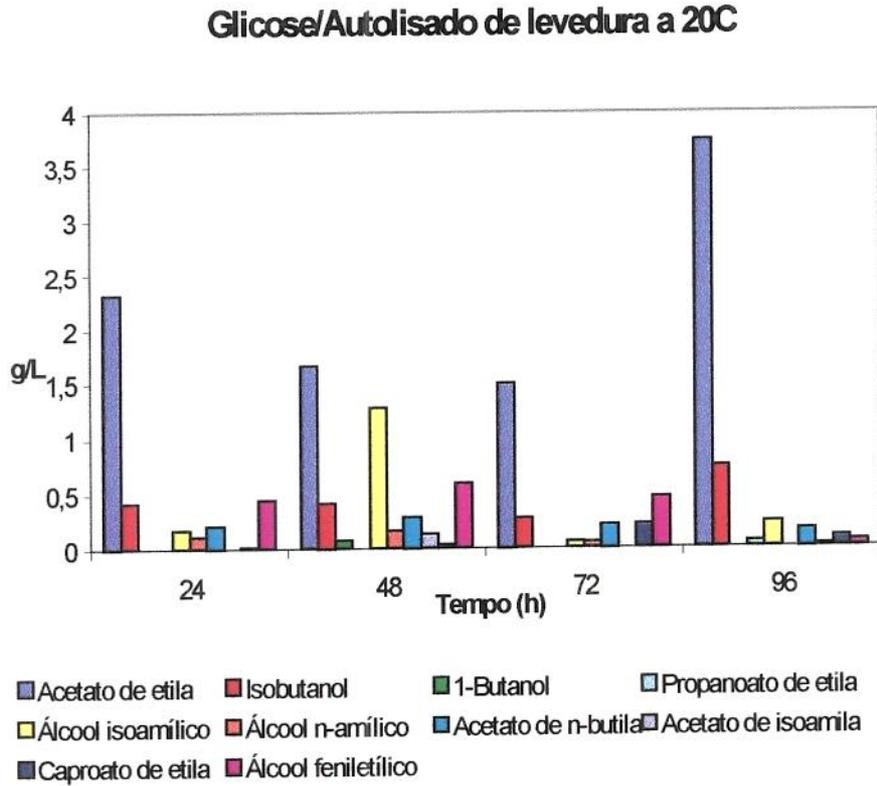


Figura 10: Fermentação realizada em meio de cultura Glicose/Autolisado de levedura à temperatura de 20°C, por *Pichia membranaefaciens*.

Glicose/Autolisado de levedura a 25C

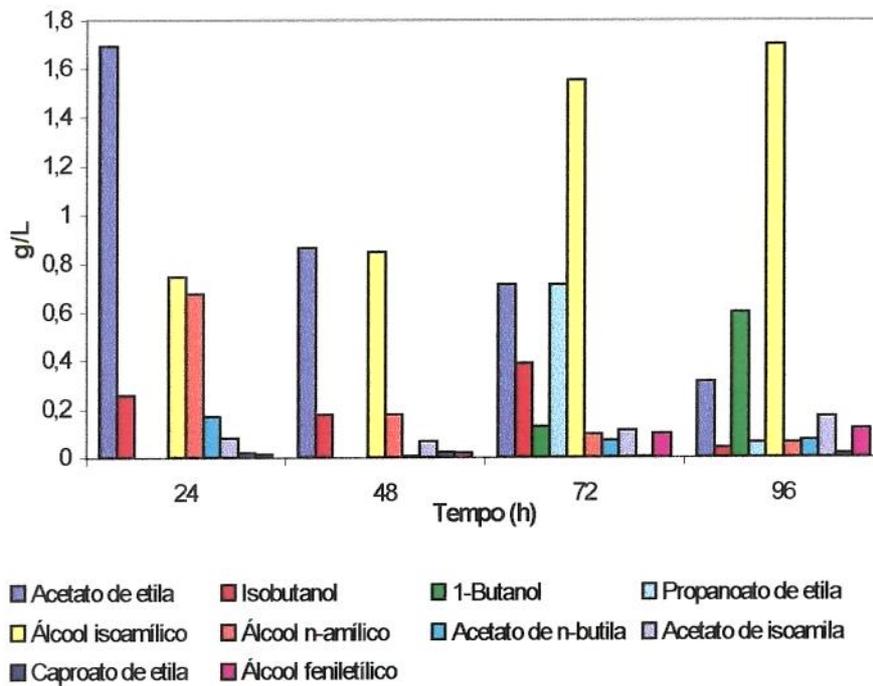


Figura 11: Fermentação realizada em meio de cultura Glicose/Autolisado de levedura à temperatura de 25°C, por *Pichia membranaefaciens*.

Glicose/Autolisado de levedura a 30C

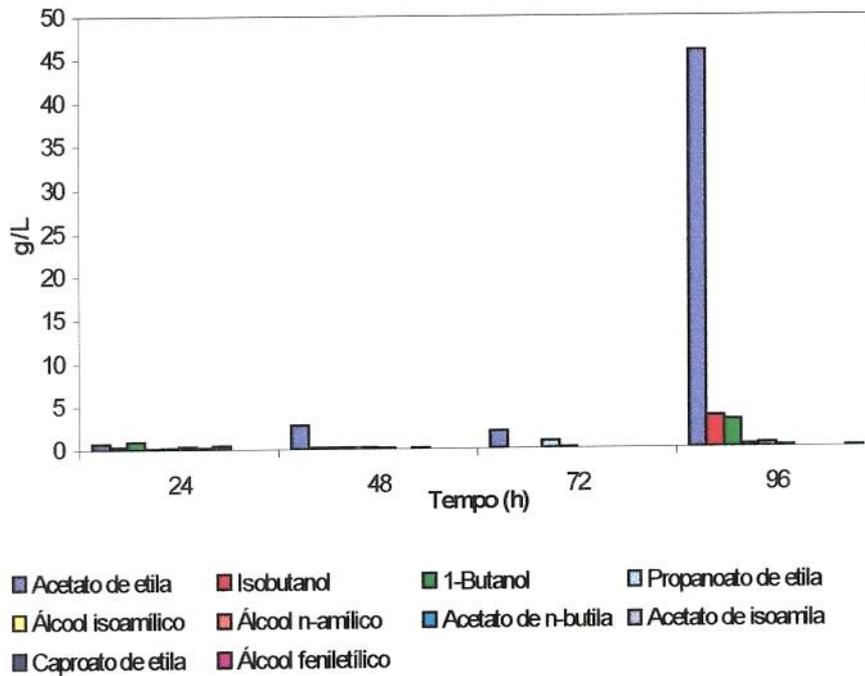


Figura 12: Fermentação realizada em meio de cultura Glicose/Autolisado de levedura à temperatura de 30°C, por *Pichia membranaefaciens*.

Glicose/Extrato de levedura a 20C

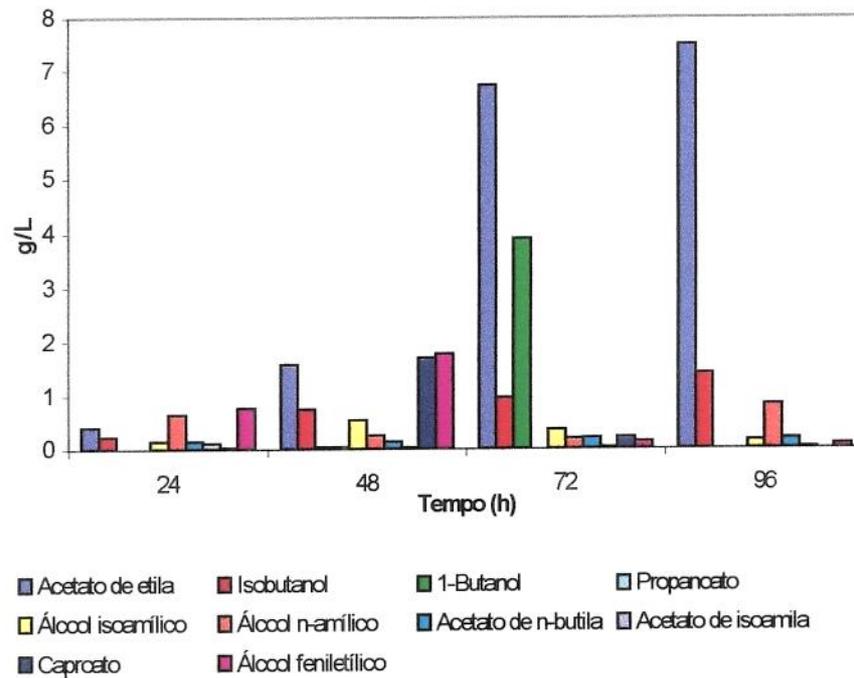


Figura 13: Fermentação realizada em meio de cultura Glicose/Extrato de levedura à temperatura de 20°C, por *Pichia membranaefaciens*.

Glicose/Extrato de levedura a 25C

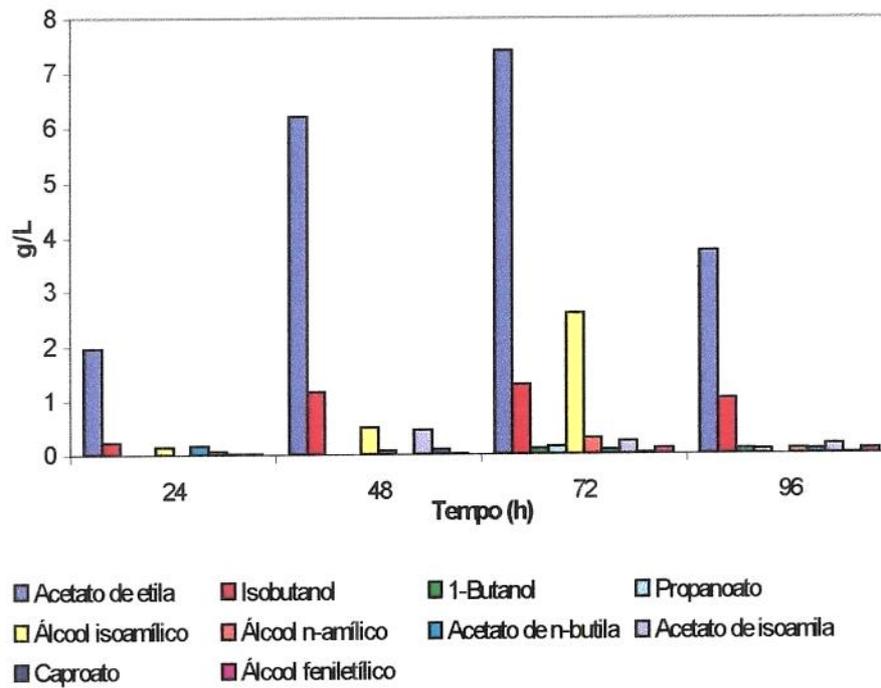


Figura 14: Fermentação realizada em meio de cultura Glicose/Extrato de levedura à temperatura de 25°C, por *Pichia membranaefaciens*.

Glicose/Extrato de levedura a 30C

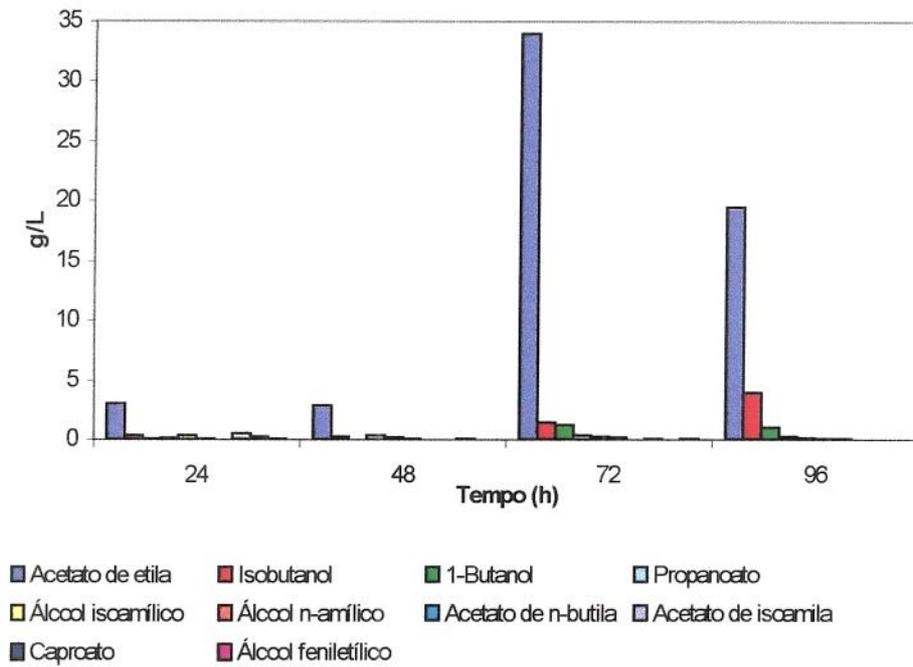


Figura 15: Fermentação realizada em meio de cultura Glicose/Extrato de levedura à temperatura de 30°C, por *Pichia membranaefaciens*.

Frutose/Autolisado de levedura a 20C

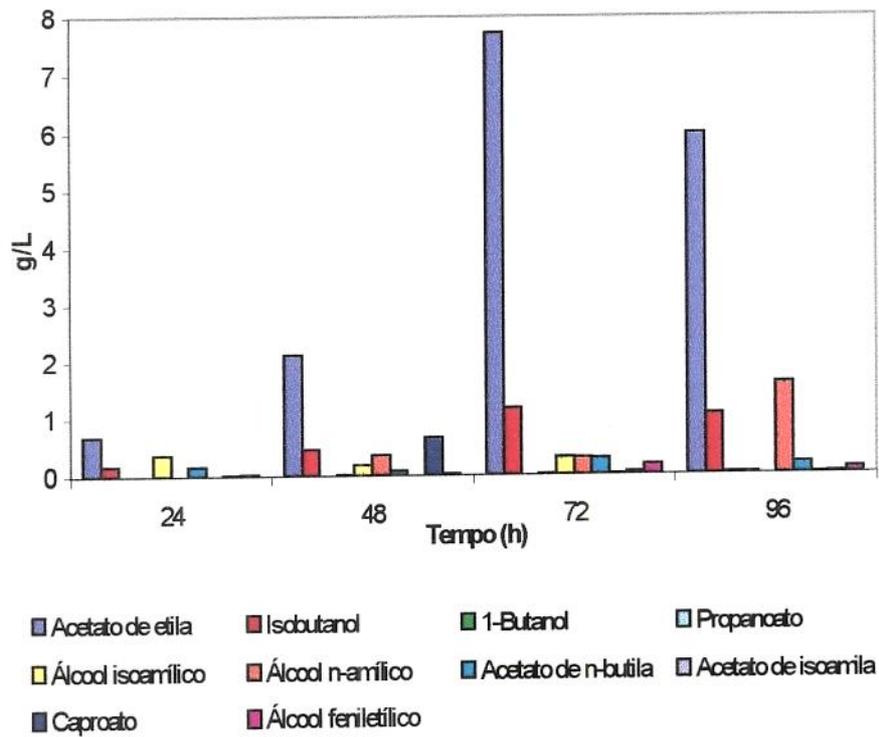


Figura 16: Fermentação realizada em meio de cultura Frutose/Autolisado de levedura à temperatura de 20°C, por *Pichia membranaefaciens*.

Frutose/Autolisado de levedura a 25C

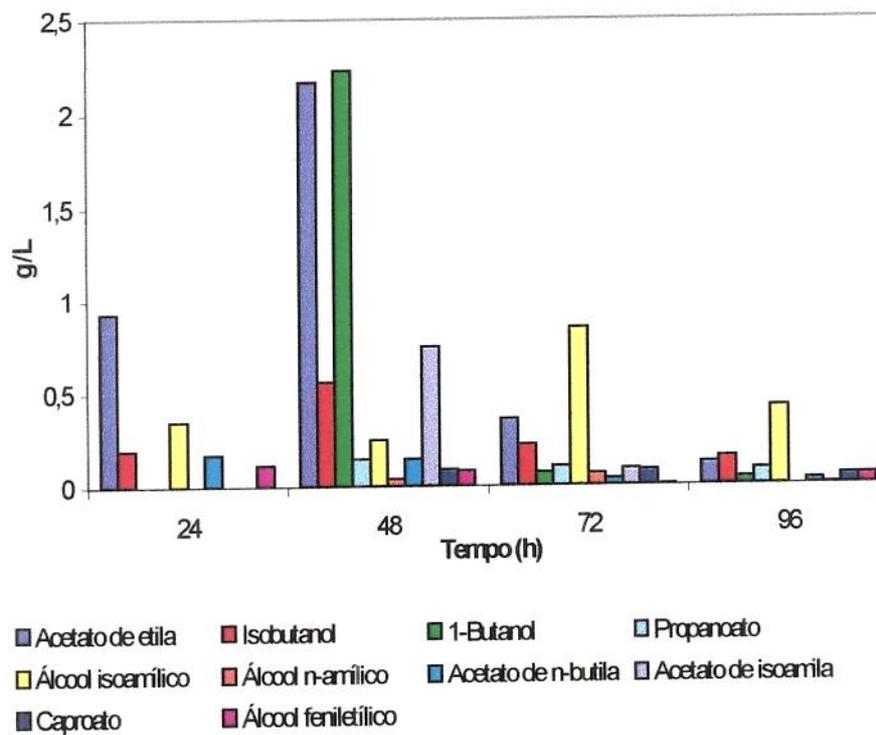


Figura 17: Fermentação realizada em meio de cultura Frutose/Autolisado de levedura à temperatura de 25°C, por *Pichia membranaefaciens*.

Frutose/Autolisado de levedura a 30C

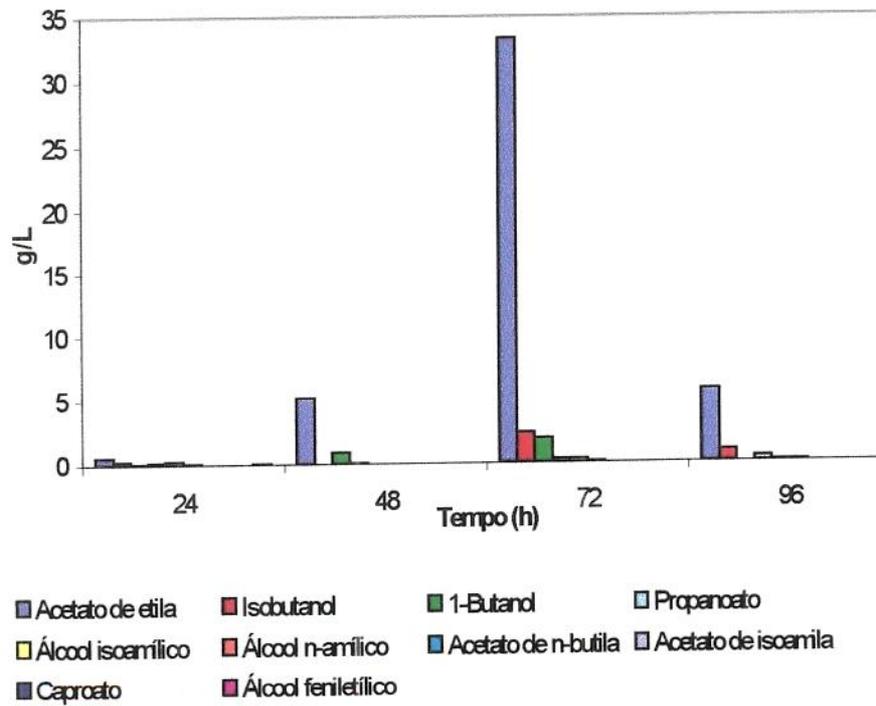


Figura 18: Fermentação realizada em meio de cultura Frutose/Autolisado de levedura à temperatura de 30°C, por *Pichia membranaefaciens*.

Frutose/Extrato de levedura a 20C

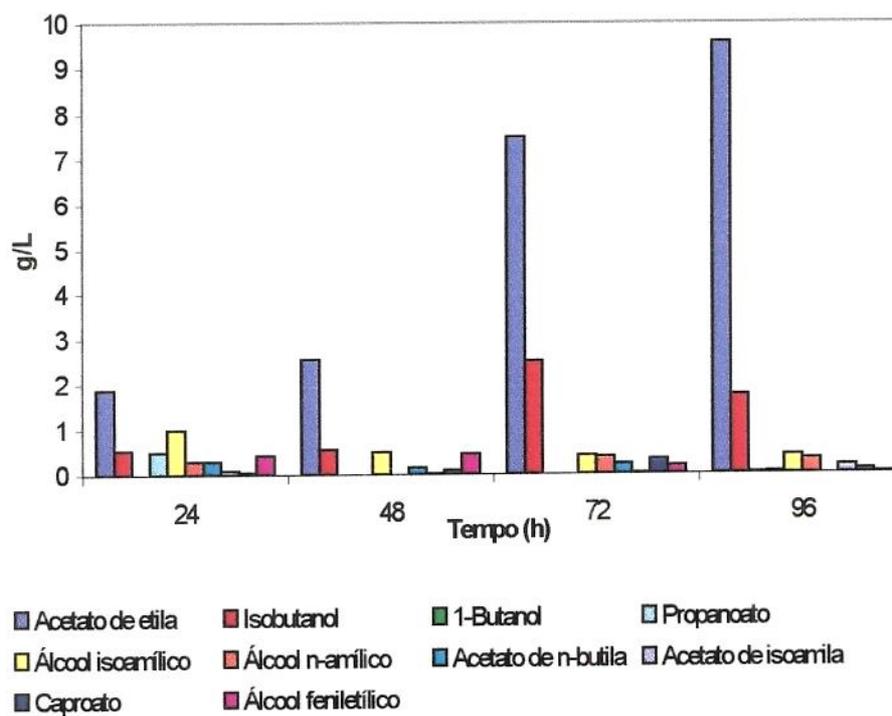


Figura 19: Fermentação realizada em meio de cultura Frutose/Extrato de levedura à temperatura de 20°C, por *Pichia membranaefaciens*.

Frutose/Extrato de levedura a 25C

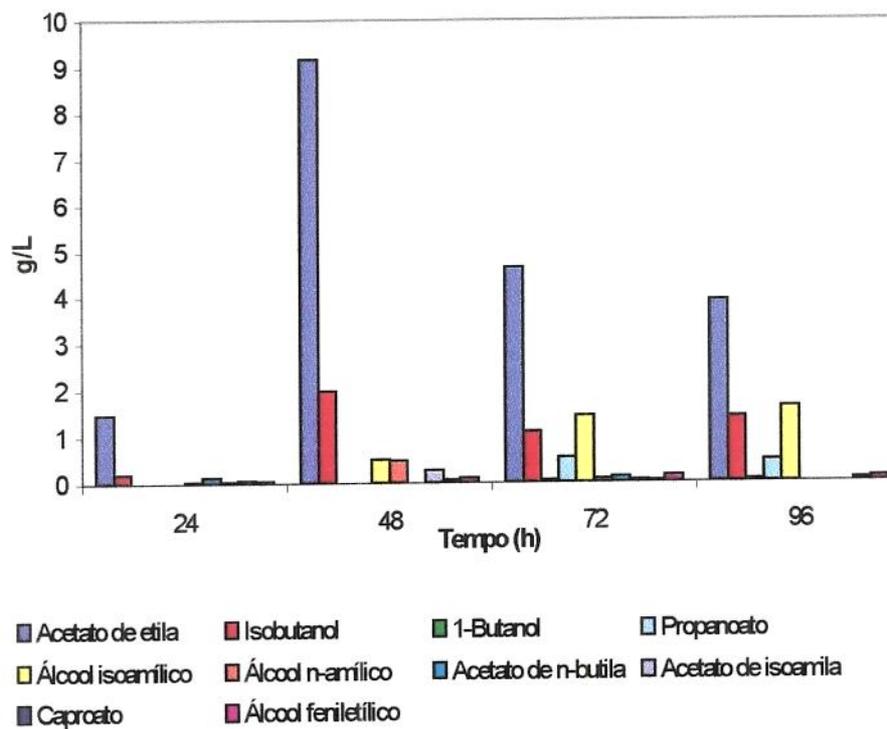


Figura 20: Fermentação realizada em meio de cultura Frutose/Extrato de levedura à temperatura de 25°C, por *Pichia membranaefaciens*.

Frutose/Extrato de levedura a 30C

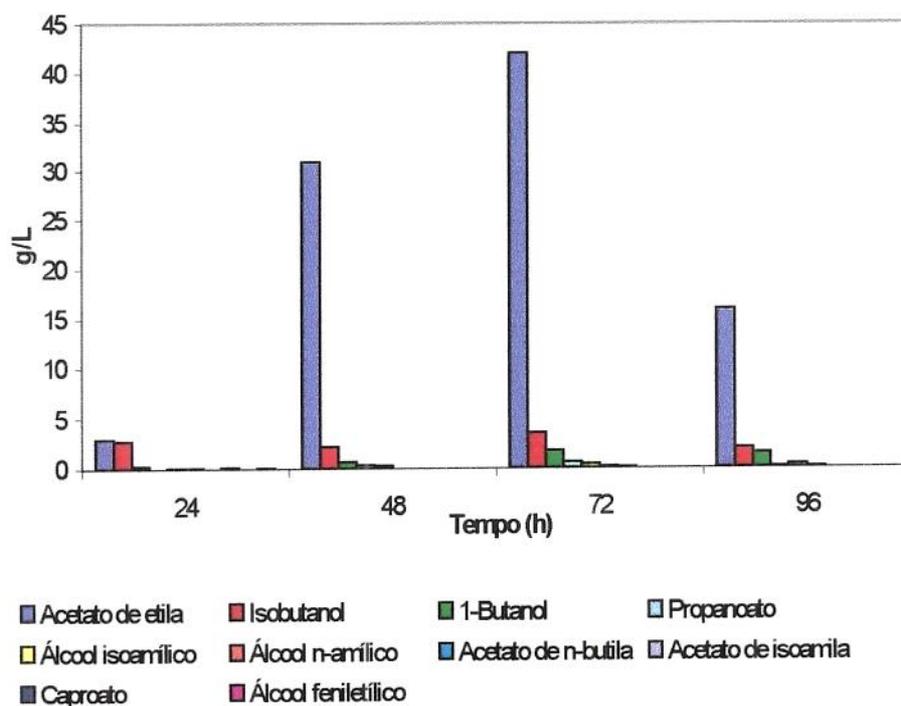


Figura 21: Fermentação realizada em meio de cultura Frutose/Extrato de levedura à temperatura de 30°C, por *Pichia membranaefaciens*.

Manose/Autolisado de levedura a 20C

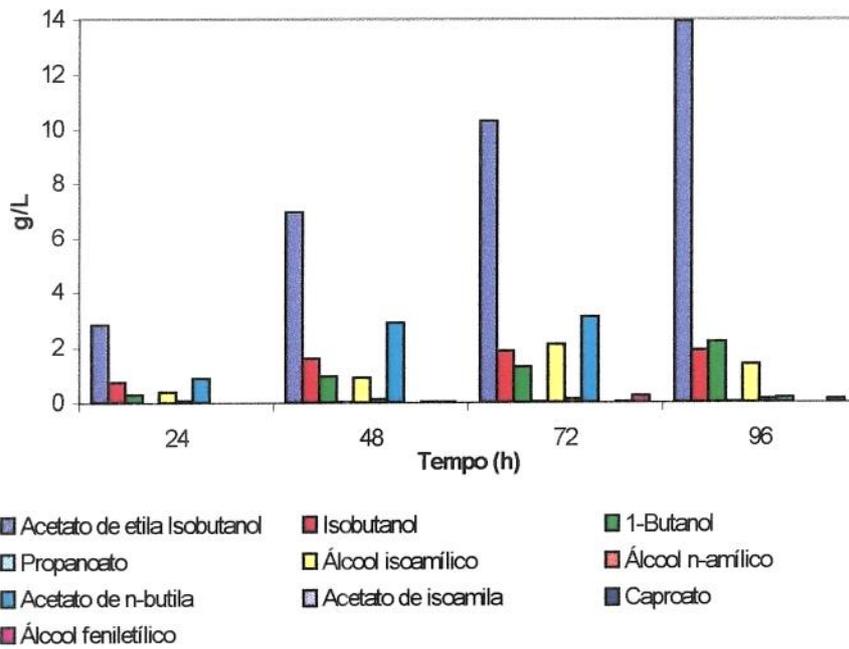


Figura 22: Fermentação realizada em meio de cultura Manose/Autolisado de levedura à temperatura de 20°C, com agitação de 100 rpm, por *Pichia membranaefaciens*

Manose/Autolisado de levedura a 25C

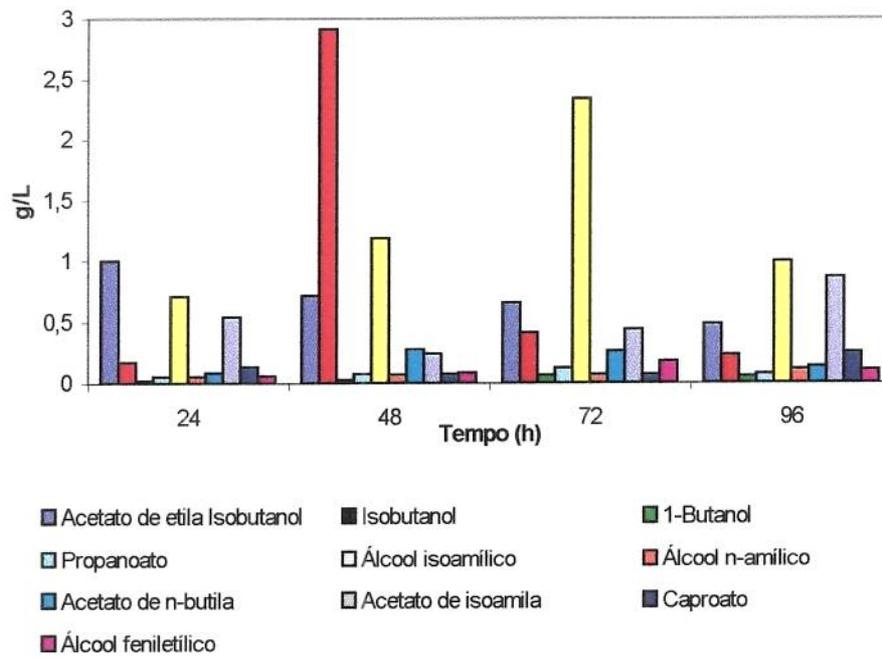


Figura 23: Fermentação realizada em meio de cultura Manose/Autolisado de levedura à temperatura de 25°C, com agitação de 100 rpm, por *Pichia membranaefaciens*

Manose/Autolisado de levedura a 30C

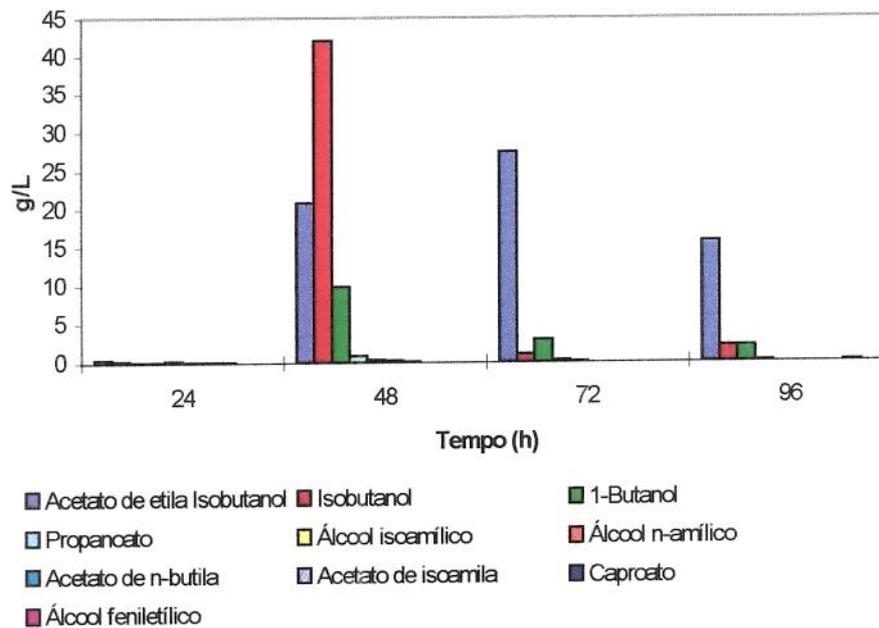


Figura 24: Fermentação realizada em meio de cultura Manose/Autolisado de levedura à temperatura de 30°C, com agitação de 100 rpm, por *Pichia membranaefaciens*

Manose/Extrato de levedura a 20C

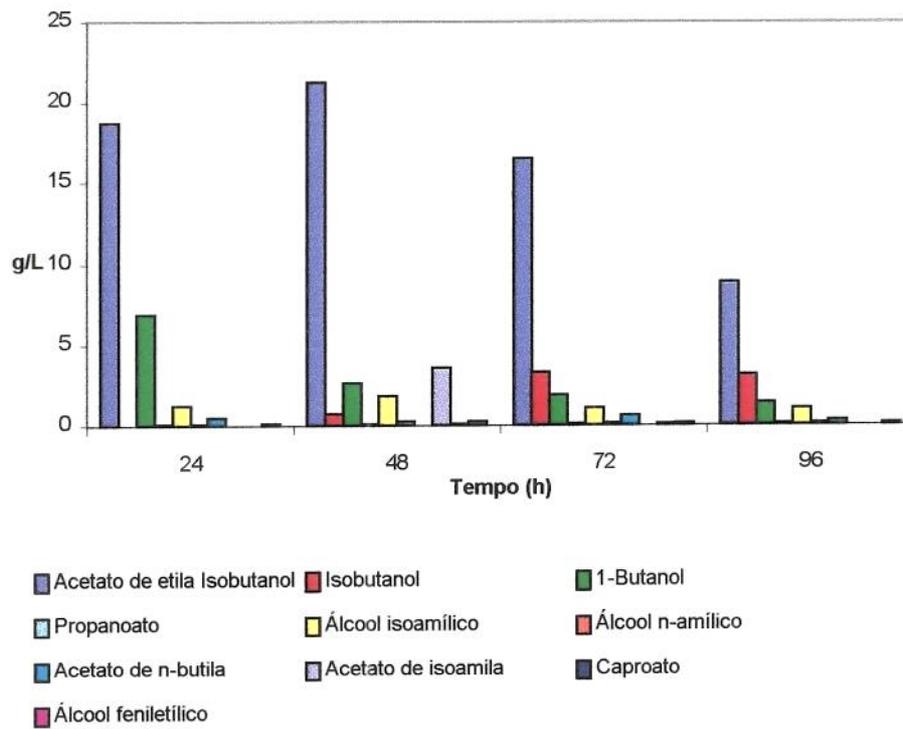


Figura 25: Fermentação realizada em meio de cultura Manose/Extrato de levedura à temperatura de 20°C com agitação de 100 rpm por *Pichia membranaefaciens*

Manose/Extrato de levedura a 25C

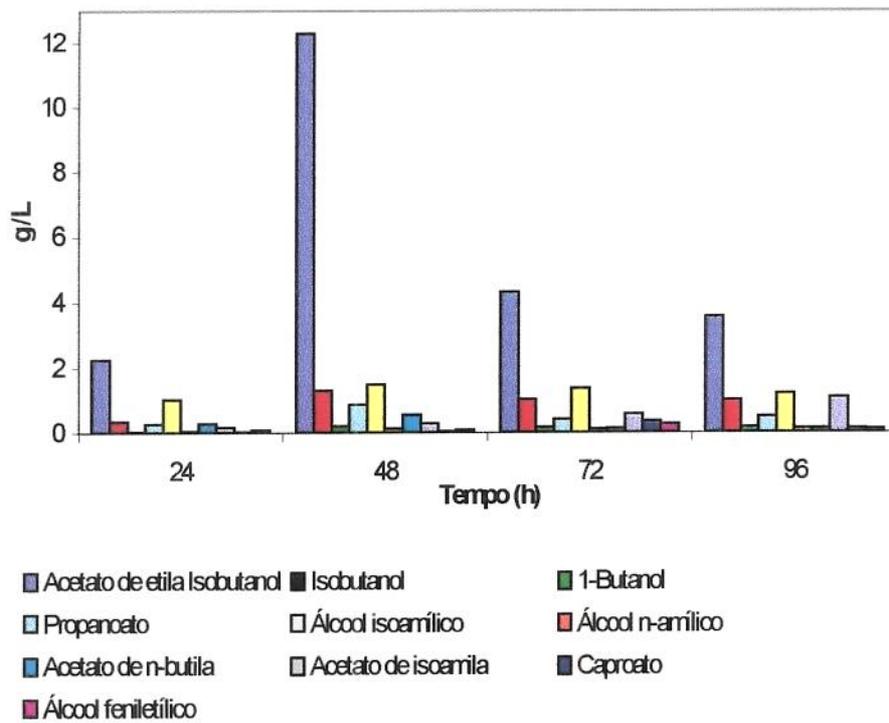


Figura 26: Fermentação realizada em meio de cultura Manose/Extrato de levedura à temperatura de 25°C com agitação de 100 rpm por *Pichia membranaefaciens*

Manose/Extrato de levedura a 30C

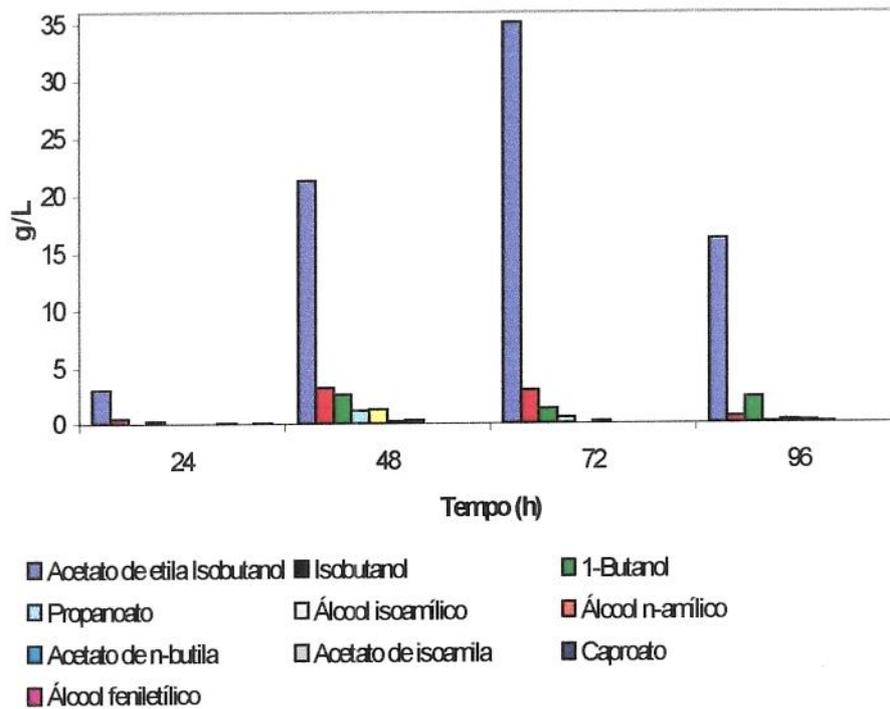


Figura 27: Fermentação realizada em meio de cultura Manose/Extrato de levedura à temperatura de 30°C com agitação de 100 rpm por *Pichia membranaefaciens*

A levedura previamente isolada e identificada como *Pichia membranaefaciens* mostrou-se capaz de produzir aroma de frutas em determinadas condições de fermentação. Dentre as fontes de carbono testadas verificou-se que *P. membranaefaciens* produziu aroma de banana madura quando as fontes de carbono foram glicose, frutose ou manose, juntamente com as fontes nitrogenadas: autolisado de levedura ou extrato de levedura.

É de grande importância a escolha, tanto das fontes de carbono quanto das fontes de nitrogênio, para a produção de aromas por microrganismos, pois estas fontes são os precursores dos compostos voláteis produzidos pelo microrganismo.

A literatura disponível na área de produção de aromas por microrganismos ressalta as influências que as condições de fermentação, tais como: a composição do meio de cultura, tempo de fermentação, temperatura de incubação, pH do meio de cultura e aeração, além da linhagem do microrganismo, exercem no tipo e na quantidade de compostos voláteis produzidos pelo microrganismo.

Através de testes pilotos, verificou-se a formação relativamente pequena de ésteres de cadeia curta e álcoois de baixo peso molecular nos meios de cultura estudados. A pequena presença destes compostos voláteis nos meios de cultura pode ser devida às perdas ocasionadas pela evaporação, devido aos seus baixos pontos de ebulição. De acordo com a literatura pertinente, a aeração durante a fermentação também acarretaria a perda destes voláteis (JIANG, 1995). Para tanto, neste trabalho, restringimos o estudo das condições de fermentação à temperatura de incubação, pH do meio e tempo de fermentação, além da composição dos meios de cultura.

Neste trabalho foi estipulado 96 horas de fermentação pois, através de testes pilotos e de acordo com a literatura, foi observado que os compostos voláteis, principalmente ésteres e álcoois produzidos, desapareciam após 4 dias de fermentação, além da exaustão do suprimento da fonte de carbono.

Segundo JIANG (1995), a concentração da glicose decresceu rapidamente no início e foi sendo reduzida a um nível quase indetectável após 5 dias de fermentação, em contraste com a biomassa que obteve crescimento máximo no quarto dia. Mas etanol e o total de metabólitos voláteis aumentaram rapidamente no começo da fermentação e atingiram ponto máximo após 3 dias de fermentação.

As figuras 7a, 7b, 8a, 8b, 8b, 9a e 9b mostram as mudanças ocorridas na biomassa e nos valores de pH para os seis meios de cultura selecionados, durante 96 horas de fermentação, nas temperaturas de 20°C, 25°C e 30°C.

Os compostos voláteis encontrados nos meios de fermentação por *Pichia membranaefaciens*, foram acetato de etila, isobutanol, 1-butanol, propanoato de etila, álcool isoamílico, álcool n-amílico, acetato de isoamila, acetato de n-butila, caproato de etila e álcool feniletílico, os quais também foram identificados em frutas, vegetais e bebidas fermentadas (TRESSL & DRAWERT, 1973, ROWAN, 1996).

Foram identificados dez compostos principais, pertencentes às classes químicas: álcoois (isobutanol, 1-butanol, álcool isoamílico, álcool n-amílico e álcool feniletílico) e ésteres (acetato de etila, propanoato de etila, acetato de isoamila, acetato de n-butila e caproato de etila). A maioria dos álcoois e ésteres detectados nos meios estudados, foram encontrados em baixos níveis, exceto o

acetato de etila, isobutanol e 1-butanol. Assim como o microrganismo *Kluyveromyces lactis* é conhecido pela sua grande capacidade de produção de ésteres, principalmente acetato de etila, a levedura *Pichia membranaefaciens* também mostrou ser uma grande produtora de acetato de etila.

Alguns compostos, mesmo que produzidos em pequenas quantidades, apresentam um baixo limite de detecção (“threshold”), podendo ser detectados e identificados em baixíssimas concentrações, contribuindo de forma significativa para o aroma final. Um exemplo destas substâncias são os compostos heterocíclicos, produzidos por *Kluyveromyces lactis* (JIANG, 1995).

Muitos metabólitos secundários são largamente produzidos somente após a biomassa ter atingido o seu ponto máximo, talvez porque o desenvolvimento de certas enzimas envolvidas na produção destes compostos, estejam frequentemente reprimidas na fase de crescimento ativo (ABRAHAM et al. 1993). Entretanto, certos metabólitos secundários não seguem o mesmo padrão. Um exemplo é a síntese de ácido abscísico por *Cercospora rosicola*, que aumentou quase que em paralelo com a massa celular seca na fase inicial de crescimento (JIANG, 1995).

Segundo ARMSTRONG & BROWN (1986), culturas de *Sporobolomyces odorus* produziram lactonas, enquanto as células ainda estavam em crescimento, ou seja, no metabolismo primário, e também após a parada de crescimento.

A produção dos compostos voláteis por *Pichia membranaefaciens*, teve seu início já nas primeiras 24 horas de fermentação. Entretanto, os maiores

rendimentos do principal composto produzido, acetato de etila, foram após 72 horas de fermentação.

Nos primeiros experimentos, após 120 horas de fermentação, observou-se um grande declínio na produção de voláteis. Sensorialmente houve uma perda grande destes voláteis, e cromatograficamente, constatou-se que depois de 96 horas de fermentação, a produção de voláteis caiu drasticamente. Observa-se melhor este fato, analisando as Tabelas no Anexo 1. O rápido crescimento de *Pichia membranaefaciens* nas condições desenvolvidas neste estudo, provavelmente deve ter esgotado a fonte de carbono e de outros nutrientes, que juntamente com o acúmulo de metabólitos secundários, inibiram o aumento da biomassa.

As fontes de carbono e nitrogênio influenciam na produção de compostos de aroma. LANZA et al. (1976) fizeram um estudo extenso sobre os efeitos das diferentes fontes de carbono e de nitrogênio na produção de aromas por *Ceratocystis moniliformis*. Segundo estes autores, a intensidade do aroma estava, na maioria das vezes, relacionada ao crescimento. Acharam quatro combinações de fontes de nitrogênio e carbono, que produziram um forte aroma de frutas devido à produção de acetato de isoamila, que oferece um forte aroma de banana.

LATRASSE & DAMERON (1988), estudaram diferentes composições de meios de cultura, variando as fontes de carbono e de nitrogênio, mas sem variar a composição inorgânica, para o fungo filamentoso *Geotrichum candidum* (Staron). Analisando os resultados obtidos, verificou-se que há alterações nas concentrações dos voláteis produzidos, de acordo com o meio de cultura em que o microrganismo foi inoculado. Nos meios de cultura que

continham os precursores para as sínteses de ésteres, por exemplo glicerol ou a L-asparagina, o rendimento dos mesmos foi bem maior. Enquanto que, em meios de cultura que eram deficientes nestas substâncias, por exemplo quando a fonte de nitrogênio foi a uréia, o rendimento foi bem menor.

Pichia membranaefaciens não produziu compostos de aroma agradáveis quando a fonte de nitrogênio foi a uréia. Isto foi verificado com todas as fontes de carbono testadas: glicose, frutose, manose, galactose, sacarose, lactose, maltose e amido.

PASTORE et al. (1994) observaram a relação entre o crescimento do microrganismo e a produção de etil isovalerato e etil hexanoato, em diferentes meios de cultura. Meio G, contendo glicose e autolisado de levedura, Meio F, contendo frutose e autolisado de levedura e Yeast Malt (YM) caldo. A produção de etil isovalerato e etil hexanoato foi consideravelmente maior após 5 dias de fermentação, nos meios G e YM enquanto que no meio F, produziu uma pequena quantidade de etil hexanoato, mas não produziu etil isovalerato.

JANSSENS et al. (1988), adicionaram isoleucina, que é um aminoácido precursor de ésteres para o microrganismo *Geotrichum candidum* (Staron) e comparou os rendimentos dos ésteres, no meio contendo o precursor com o meio controle. Em comparação com o controle, houve uma importante produção de 2-metilbutanol, etil 2-metilbutirato após 67 horas de incubação e 2-metilbutil acetato após 85 horas de fermentação. Estes resultados sugerem que a composição específica do meio de cultura e a seleção de uma fonte de nitrogênio adequada, é possível forçar o microrganismo a produzir um padrão desejado de ésteres.

Segundo TRESSL & ALBERCHT (1986), muitos compostos de aroma tais como álcoois, ácidos, ésteres, cetonas, compostos contendo enxofre e compostos aromáticos são derivados do metabolismo de aminoácidos.

TRESSL & DRAWERT (1973), em estudos com pedaços de tecido de bananas com carvão radioativo, demonstraram a formação de compostos voláteis presentes na fruta. A maioria dos compostos voláteis presentes na banana são álcoois e ésteres de cadeia aberta. Segundo estes autores, o 3-metilbutil ésteres, 3-metilbutiratos e 3-metil-1-butanol poderiam ser derivados do aminoácido leucina. Já os compostos 2-metilpropil ésteres, 2-metilpropionatos e 2-metil-1-propanol seriam derivados da valina. Observar a figura 28.

Aminoácidos aromáticos também servem como precursores de aroma de frutas. Alguns dos compostos voláteis aromáticos são derivados da tirosina e da fenilalanina. Alguns ésteres fenólicos encontrados em bananas, tais como: o eugenol, metil éter e elimicina, que são derivados da L-fenilalanina (TRESSL & DRAWERT, 1973; HEATH & REINECCIUS, 1986). Este aminoácido pode ser transformado em fenilpiruvato pela transaminação e pela subsequente descarboxilação em 2-fenilacetil-CoA, reação análoga à transformação da leucina e valina em seus álcoois correspondentes. 2-fenilacetil-CoA é convertido em ésteres de uma variedade de álcoois ou reduzido a 2-feniletanol (álcool feniletílico) e transformado em 2-feniletil ésteres. Os produtos finais do catabolismo da fenilalanina são ácido fumárico e acetoacetato, que são posteriormente metabolizados pelo Ciclo do Ácido Cítrico. α -cetoácido (fenilpiruvato) pode derivar tanto catabolicamente do aminoácido correspondente (L-fenilalanina) pela desaminação (via Ehrlich) ou sinteticamente através da glicose ou de outro carboidrato precursor na síntese de

aminoácidos (TRESSL & DRAWERT, 1973, TRESSL & ALBRECHT, 1986; LATRASSE & DAMERON, 1988; ALBERTAZZI et al. 1994). Observar a figura 29.

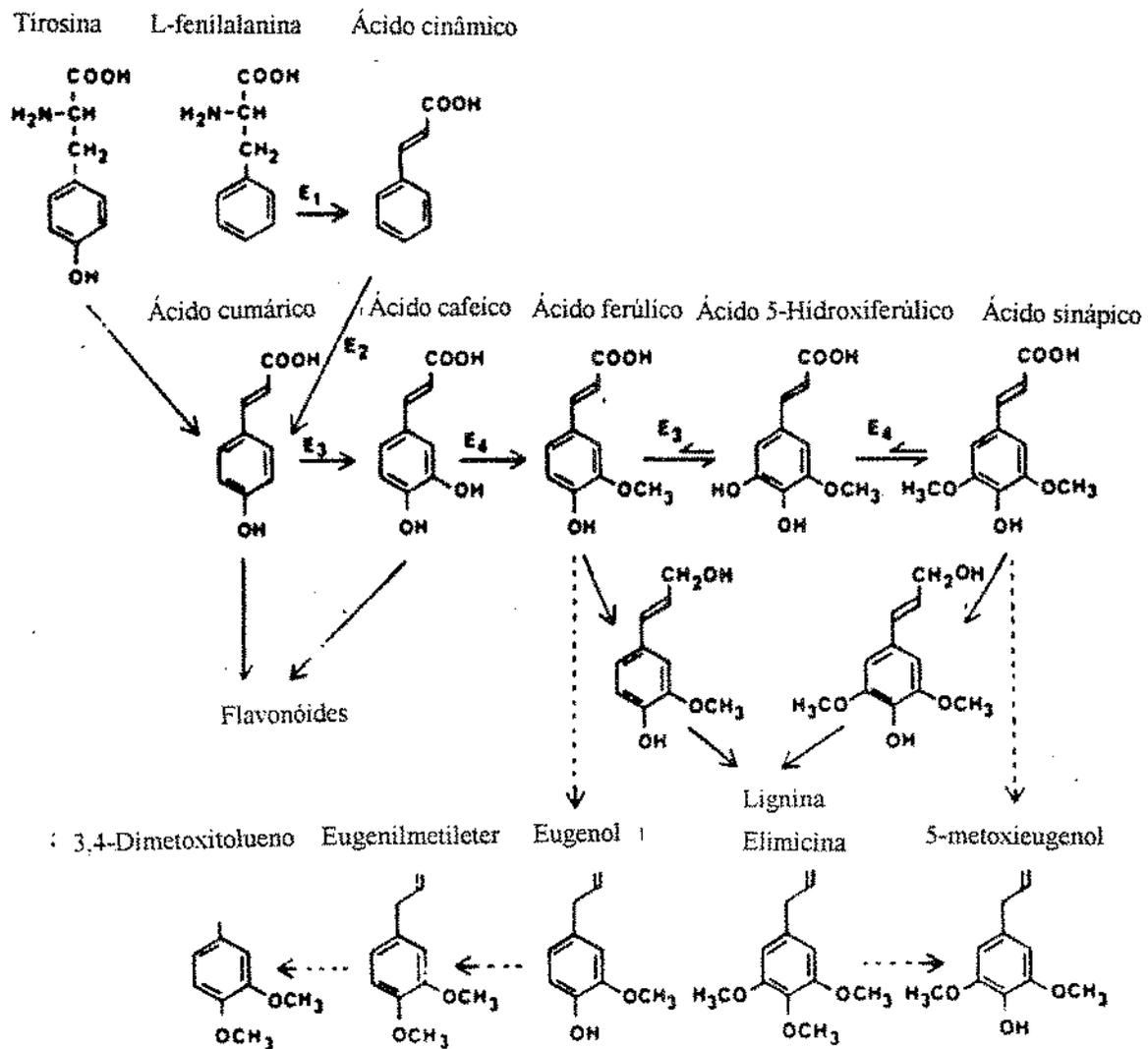


Figura 28: Vias metabólicas para a formação de ácidos fenólicos e ésteres de fenol em banana. E₁, L-fenilalanina-amônia-liase; E₂, ácido cinâmico-hidroxilase; E₃, fenolase; E₄, metiltransferase.

Fonte: HEATH & REINECCIUS, 1986.

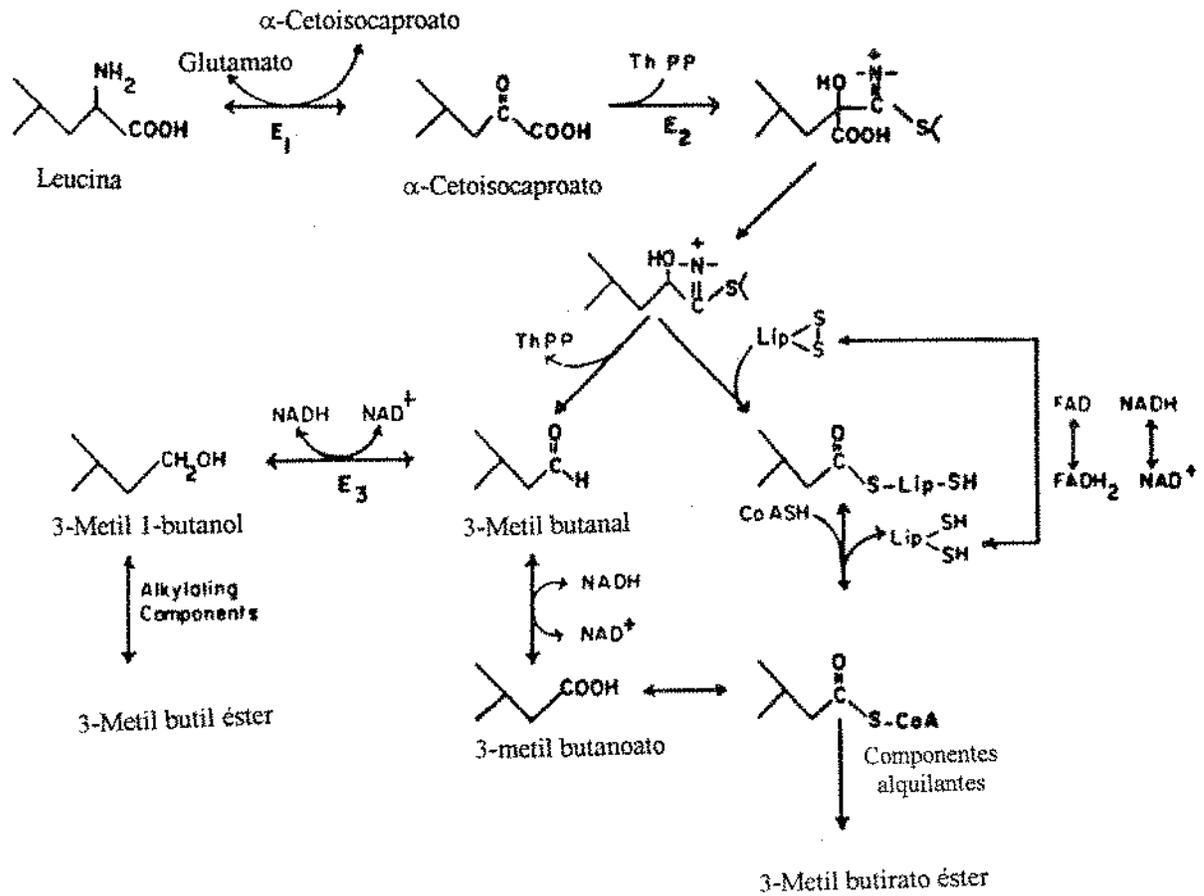
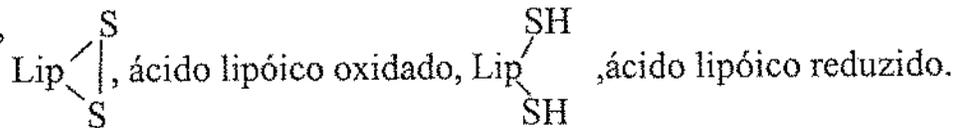


Figura 29: Conversão de aminoácidos em compostos de aroma de banana a partir da leucina. E_1 , L-leucina aminotransferase; E_2 , piruvato descarboxilase; E_3 , aldeído desidrogenase; ThPP, tiamina pirofosfato; FAD flavina-adenina dinucleotídeo; NAD^+ , Nicotinamida-adenina dinucleotídeo oxidado; CoA-SH, coenzima A,



Fonte: HEATH & REINECCIUS, 1986.

A produção de álcoois através de aminoácidos pode ocorrer pela transaminação, descarboxilação e redução ou pela desaminação oxidativa seguida de descarboxilação e redução. Em qualquer que seja a via metabólica, o produto será sempre o aminoácido com um carbono a menos e sem o grupo amino (HEATH & DRAWERT, 1986).

Em leveduras, a formação de ésteres está ligada ao metabolismo de lipídios. O metabolismo lipídico produz um grande número de ácidos e álcoois, os quais podem sofrer esterificação, formando uma variedade de ésteres. As enzimas intracelulares, presentes nos microrganismos, são responsáveis pela esterificação (HEATH & REINECCIUS, 1986).

Comparando-se os compostos presentes na banana com os compostos voláteis formados nos meios de cultura selecionados por *Pichia membranaefaciens*, constatou-se que muitos deles estavam presentes em ambos. Foi observada a presença de acetato de etila, acetato de isoamila, acetato de n-butila, álcool isoamílico, 1-butanol, caproato de etila e álcool feniletílico. A presença destes compostos justifica o aroma de banana formado nos meios de cultura por *Pichia membranaefaciens*.

ABRAHAM & BERGER (1994) verificaram que de um total de 40 álcoois produzidos por Basidiomicetos, os mais abundantes foram 1-butanol, isobutanol e álcool isoamílico.

Nos meios de cultura estudados, não foi observada formação de nenhum composto diferente daqueles já citados anteriormente, o que diferencia é a concentração destes voláteis durante a fermentação, nos diferentes meios de cultura.

ABRAHAM & BERGER (1993) verificaram mudanças significativas no perfil de aroma durante a fermentação com os Basidiomicetos *Mycena pura* 817 e *Pleurotus sapidus* P 226-1. Para anisaldeído e anisálcool e 1-octen-3-ol produzidos por *Pleurotus sapidus*, a produção destes compostos ocorreu em períodos de crescimento completamente diferentes.

JANSSENS et al. (1988) verificaram um abaixamento do pH na fase log de crescimento com a concomitante formação de álcool. Isobutanol e isopentanol apresentaram seu ponto ótimo no final da fase log de crescimento. Já a síntese de acetato de etila começou na fase log, enquanto outros ésteres foram formados especialmente na fase estacionária.

O decréscimo do pH durante a fermentação também foi verificado neste trabalho. Verificou-se que *P. membranaefaciens* não é muito exigente quanto ao pH, na faixa entre 4,0 a 7,0. O microrganismo desenvolveu-se bem em todos os pHs testados.

A síntese de acetato de etila observou-se ter começado logo após 24 horas de fermentação, estando ainda na fase log de crescimento. Entretanto, a produção máxima de acetato de etila foi de 46,07 g/L, após 96 horas de fermentação no meio de cultura Glicose/Autolisado de levedura.

ARMSTRONG & BROWN (1994), verificaram que *Candida utilis* é capaz de oxidar etanol a acetaldeído com bons rendimentos. O rendimento máximo foi obtido quando o meio de cultura foi deficiente em ferro e os níveis de álcool de 65 g/L. A deficiência em ferro no meio de cultivo diminui a velocidade do Ciclo do Ácido Cítrico, pois sabe-se que as enzimas envolvidas, succinato desidrogenase e aconitase, requerem ferro para catalisar reações

químicas. Conseqüentemente, há o acúmulo de acetil-CoA, que por sua vez, leva ao aumento no rendimento de acetato de etila, via uma álcool transferase, quando a concentração de etanol é 35 g/L ou menos. Observar a figura 30.

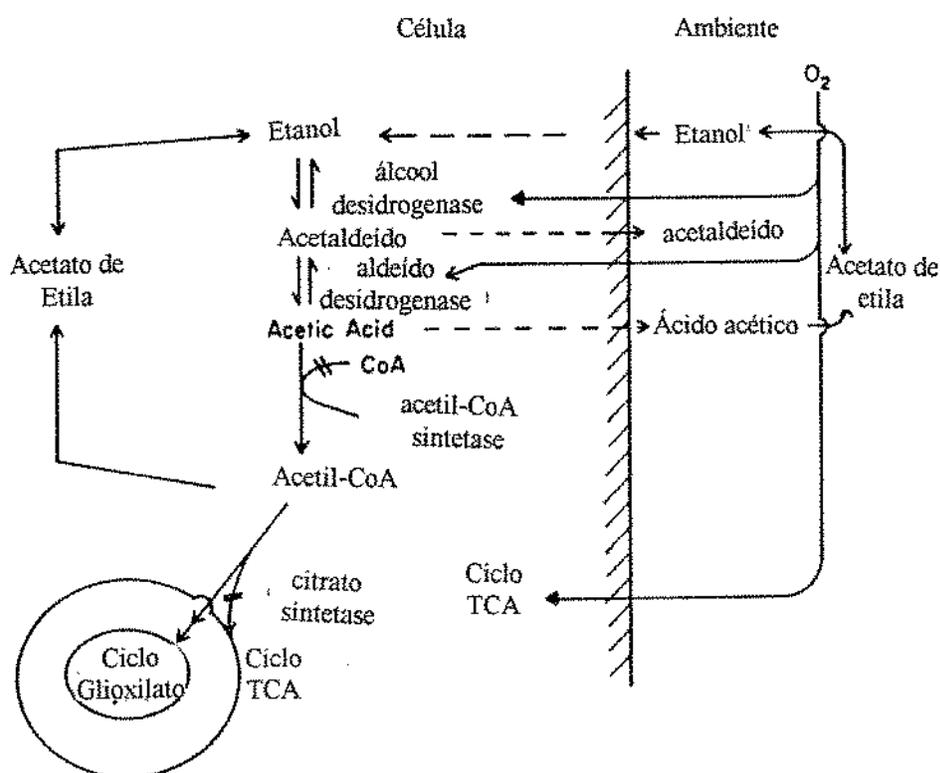


Figura 30: Via metabólica da utilização de etanol na formação de acetato de etila por *Candida utilis* (modelo).

Fonte: ARMSTRONG, 1986.

ARMSTRONG et al. (1984), estudaram o potencial de *Candida utilis* converter etanol a acetato de etila. Os resultados mostraram que a formação do éster resultou da utilização de etanol sob condições adequadas de aeração e foi inibida com suplementação de Fe^{+3} .

ARMSTRONG & BROWN (1986) estudaram os efeitos da tensão de oxigênio na produção de metabólitos celulares. A aeração tem um efeito significativo na produção de acetato de etila a partir de etanol por *Candida utilis*. Uma aeração pobre resulta em uma lenta utilização de etanol, acarretando num pequeno acúmulo de acetato de etila. Com o aumento da aeração, o etanol foi metabolizado mais rapidamente e conseqüentemente houve um maior acúmulo de acetato de etila. Entretanto, altos níveis de aeração diminuíram o rendimento do éster. Portanto, uma aeração adequada permite um alto acúmulo de metabólitos celulares (por exemplo: acetil-CoA) juntamente com o uso relativamente eficiente do etanol, como precursor.

Há registros de *Hansenula anomala*, que é uma levedura similar à *Candida utilis*, como produtora de acetato de etila a partir de açúcares. Os rendimentos são comparáveis aos obtidos com *Candida utilis*, embora as taxas de produção sejam significativamente menores. *Pichia pastoris*, uma levedura capaz de crescer em meio contendo metanol como única fonte de carbono e de energia, é capaz de oxidar etanol produzindo acetaldeído. (ARMSTRONG & BROWN, 1986).

ARMSTRONG (1986) estudou a cinética de formação de acetato de etila a partir de glicose. A formação de acetato de etila em meio de cultura contendo glicose sem adição de ferro, foi observada quantidades significativas, enquanto

que, em meio de cultura com adição de ferro (FeCl_3 a $100 \mu\text{M}$), a capacidade de acúmulo do éster foi inibida.

A temperatura de incubação exerceu grande influência nas quantidades produzidas deste composto. Analisando-se os gráficos das quantidades de compostos voláteis produzidos por *Pichia membranaefaciens*, é possível verificar que em todos os meios estudados, a temperatura de 30°C foi a que promoveu as maiores quantidades de acetato de etila, apenas variando em relação ao tempo, entre 72 e 96 horas de incubação. Um fato interessante é que todos os meios de cultura que tinham como fonte de carbono, o extrato de levedura, tiveram suas maiores concentrações de acetato de etila em 72 horas de incubação.

DRAWERT & BARTON (1978) estudando a biossíntese de monoterpenos por *Kluyveromyces lactis*, verificaram que a produção destes compostos não dependia apenas de precursores especiais, mas também das variações nas condições de fermentação da cultura. Com o aumento da temperatura, houve um concomitante aumento do rendimento do citrônolol.

Na temperatura de 25°C , foram registradas as menores concentrações de acetato de etila. A concentração máxima observada foi de $12,28 \text{ g/L}$, no meio de cultura Manose/Extrato de levedura, após 48 horas de incubação. A concentração mínima foi de $1,01 \text{ g/L}$, no meio Manose/Autolisado de levedura, após 24 horas de incubação.

Os outros compostos presentes em menores quantidades que acetato de etila não apresentaram uma igualdade nas mudanças cinéticas nos meios de cultura estudados. Isto se deve às várias vias metabólicas utilizadas pelo

microrganismo, na formação destes compostos. As variações nas concentrações dos voláteis dependem também da sua volatilidade.

O isobutanol foi o segundo composto mais produzido nos meios de cultura testados. Em quase todos os meios de cultura, os seus maiores rendimentos foram verificados à temperatura de 30°C, com exceção do meio Manose/Extrato de levedura que apresentou à temperatura de 20°C. Uma alta produção deste composto, foi observada no meio de cultura Manose/Autolisado de levedura, 42,06 g/L, com 48 horas de fermentação.

FABRE et al. (1995), também verificaram produção máxima de isobutanol com 48 horas de fermentação com o microrganismo *Kluyveromyces marxianus*. A concentração observada neste período foi de 180 mg/L. A fonte de carbono utilizada foi glicose e a fonte de nitrogênio foi extrato de levedura.

JANSSENS et al. (1988) observaram que a formação dos álcoois, isobutanol e isopentanol alcançou seu ponto máximo no final da fase ativa de crescimento do microrganismo, por volta de 48 horas de fermentação.

ABRAHAM & BERGER (1994) estudaram várias linhagens de Basidiomicetos na produção de aromas que, comparados aos outros microrganismos, os voláteis produzidos por eles, são os mais próximos aos voláteis produzidos por plantas. Os autores observaram a formação de 40 álcoois diferentes, a maioria deles na quantidade de 100 µg/L. A maioria das linhagens produziu 1-butanol, 2-metil 1-propanol e 3-metil 1-propanol. *Sarcodontia setosa* produziu até 24 mg/L de 3-metil 1-propanol. O 2-feniletanol, formado por *Grifola frondosa*, foi de 800 µg/L.

O álcool 1-butanol, produzido com a fonte de nitrogênio autolisado de levedura, independente das fontes de carbono, obteve rendimento máximo à temperatura de 30°C. Não foi observado rendimento ótimo à temperatura de 25°C, apenas em 20°C quando as fontes de carbono foram glicose e manose, e à 30°C, quando a fonte de carbono foi frutose.

Com as fontes de carbono glicose e manose e as fontes de nitrogênio autolisado e extrato de levedura, o composto propanoato de etila obteve sua quantidade máxima à temperatura de 30°C. Com frutose, seu rendimento aumentou com o decréscimo de temperatura: 20°C para o autolisado de levedura e 25°C para o extrato de levedura. Os rendimentos para estes meios foram 0,490 g/L e 0,538 g/L, respectivamente.

A produção de álcool isoamílico nos meios Glicose/Autolisado de levedura, Glicose/Extrato de levedura e Manose /Autolisado de levedura foi máxima à temperatura de 25°C. Com a fonte de carbono frutose, independente das fontes de nitrogênio, a temperatura ótima foi de 20°C. O mesmo foi observado para o meio Manose/Extrato de levedura.

Não foram observados altos rendimentos de álcool n-amílico à temperatura de 30°C, nos meios estudados. Para este composto, a quantidade máxima produzida foi no meio de cultura Frutose/Autolisado de levedura, 96 horas de fermentação, à temperatura de 20°C.

Quando comparou-se os rendimentos dos meios de cultura testados, nas diferentes temperaturas, o acetato de n-butila obteve seus rendimentos máximos à temperatura de 20°C.

Para determinados compostos, fatores como a temperatura e o pH do meio exercem mais influência que a composição do meio de cultura. Portanto, para a produção de um determinado composto, é preciso estudar quais são os fatores que mais influenciam no seu rendimento final. Há necessidade de um estudo rigoroso das condições de fermentação, para evitar desperdício de material e de tempo, visando um alto rendimento do composto em questão. O microrganismo utilizado na produção destes compostos flavorizantes deve ser seguro para ser usado em alimentos.

Assim, pode-se concluir que existem possibilidades interessantes no uso de *Pichia membranaefaciens* para a biossíntese de ésteres, principalmente do composto acetato de etila. Portanto, estes resultados revelaram que a composição do meio de cultura, as condições de fermentação e a escolha da linhagem, determinam a natureza e a proporção de cada composto volátil a ser obtido. A este respeito, é essencial entender o mecanismo e a bioquímica da formação de ésteres em *Pichia membranaefaciens*. As condições de fermentação devem ser rigorosamente controladas.

CONCLUSÕES

A linhagem de levedura LB-250, através de testes morfológicos, bioquímicos e fisiológicos, foi identificada como *Pichia membranaefaciens*.

Dentre as fontes de carbono estudadas para produção de aromas, glicose, frutose e manose apresentaram os melhores resultados, obtendo-se aroma de frutas, similar ao aroma de banana madura.

As fontes de nitrogênio: autolisado de levedura e o extrato de levedura, foram selecionadas para produção de aroma de frutas, nas condições de fermentação estudadas.

O maior rendimento do principal composto produzido por *Pichia membranaefaciens*, o acetato de etila, foi obtido à temperatura de 30°C, após 96 horas de fermentação, no meio de cultura composto de glicose e autolisado de levedura. O acetato de etila está presente no aroma gerado por diversas frutas. Isso explica a ênfase dada a este composto neste trabalho.

Dentre a classe dos álcoois, os principais compostos produzidos foram: isobutanol, 1-butanol, álcool isoamílico, álcool n-amílico e álcool feniletílico. O isobutanol e o 1-butanol foram os álcoois que apresentaram maiores concentrações nos meios estudados. Os álcoois produzidos nos meios de cultura selecionados, já foram identificados em aromas de frutas. Mesmo em pequenas quantidades, estes álcoois contribuem no aroma de frutas gerado por *P. membranaefaciens*.

Na classe dos ésteres estavam presentes: acetato de etila, acetato de isoamila, propanoato de etila, acetato de n-butila e caproato de etila. Estes ésteres fazem parte da composição de voláteis da maioria dos aromas de frutas, daí a importância destes compostos, formados por *P. membranaefaciens*, nos meios de cultura selecionados.

A quantidade dos compostos voláteis produzidos variou em função dos seguintes fatores: composição de meio de culturas, temperatura e tempo de incubação.

As condições de fermentação podem ser ajustadas para aumentar ou direcionar o rendimento de determinados compostos. Neste trabalho, os compostos voláteis produzidos por *P. membranaefaciens* apresentaram rendimentos máximos em condições de fermentação diferentes. Porém, a maioria dos compostos voláteis formados, apresentou maior rendimento após 72 de incubação, à 30°C.

Os resultados revelaram que a linhagem de *P. membranaefaciens*, apresentou grande potencialidade de produção de aromas de frutas, principalmente devido a presença do éster acetato de etila, o que levou a obtenção de aroma com características extremamente agradáveis nos meios de cultura.

O estudo realizado demonstrou a potencialidade apresentada pela levedura *Pichia membranaefaciens*, na produção de aroma de frutas por via biotecnológica. A continuidade deste trabalho pode levar ao aumento de rendimento e ao aumento de escala, visando a aplicação industrial.

IV - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRAHAM, B. G. & BERGER, R. G. Higher Fungi for Generating Aroma Components through Novel Biotechnologies. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 42, n. 10, p. 2344-2348, 1994.
2. ABRAHAM, B., KRINGS, U. & BERGER, R. G. Dynamic Extraction, An Efficient Screening Procedure for Aroma Producing Basidiomycetes. **Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.** v. 15, n. 5/6, p. 178-181, 1993.
3. ALBERTAZZI, E.; CARDILLO, R.; SERVI, S. & ZUCCHI, G. Biogenesis of 2-Phenylethanol and 2-Phenylethylacetate Important Aroma Components. **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 5, p. 491-496, 1994.
4. ARMSTRONG, D. W. Selective Production of Ethyl Acetate by *Candida utilis*. In: Biogenesis of Aromas (T. H. Parliment and Croteau, eds.). Washington, DC, ACS Symposium Series 317, p. 254-265, 1986.
5. ARMSTRONG, D. W & BROWN, L. A. Aliphatic, Aromatic, and Lactone Compounds. In: Bioprocess Production of Flavor, Fragrance, and Color Ingredients, edited by Alan Gabelman, p. 1994.
6. ARMSTRONG, D. W.; MARTIN, S. M.; YAMAZAKI, H. Production of Ethyl Acetate from Dilute Ethanol Solutions by *Candida utilis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, p. 1038-1041, 1984.
7. BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W. & YARROW, D. Yeasts; Characteristics and Identification, p. 811-812, 1984.

8. BERGER, R. G., DRAWERT, F. & HADRICH, S. Microbial Sources of Flavour Compounds. Bioflavor'87. Analysis - Biochemistry - Biotechnology. Editor Peter Schreier, p. 415-434, 1988.
9. BOELENS, M. H., BOELENS H. & GEMERT, L. J. Trends in Aroma Research and Gas Chromatography-Olfactometry. **Perfumer & Flavorist**, v. 20, p. 1-6, 1995.
10. CHRISTEN, P. & LOPEZ-MUNGUÍA, A. Enzymes and Food Flavor. A Review. **Food Biotechnology**, v. 8, n. 2 e 3, p. 167-190, 1994.
11. DRAWERT, F. & BARTON, H. Biosynthesis of Flavor Compounds by Microorganisms. 3. Production of Monoterpenes by the Yeast *Kluyveromyces lactis*. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 26, n.3, p. 765-766, 1978.
12. FABRE, C. E.; DUVIAU, V. J.; BLANC, P. J. & GOMA, G. Identification of Volatile Flavour Compounds Obtained in Culture of *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology Letters**, v. 17, n. 11, p. 1207-1212, 1995.
13. FERON, G., BONNARME, P. & DURAND, A. Prospects for the Microbial Production of Food Flavours. **Trends in Food Science & Tecnology**, v. 17, p. 285-293, 1996.
14. GATFIELD, I. L. Generation of Flavor and Aroma Components by Microbial Fermentation and Enzyme Engineering Technology. In Biogeneration of Aromas (T. H. Parliment and Croteau, eds.). Washington, DC, ACS Symposium Series. 317, p.310-322, 1986.

15. GATFIELD, I. L. Production of Flavor and Aroma Compounds by Biotechnology. **Food Technology**, p. 110-169, 1988.
16. GATFIELD, I. L. Enzymatic and Microbial Generation of Flavor. **Perfumer & Flavorist**, v. 20, p. 5-14, 1995.
17. HAMILTON-KEMP, T. R.; ARCHBOLD, D.D.; LOUGHRIN, J.H.; COLLINS, R.W. & BYERS, M. E. Metabolism of Natural Volatile Compounds by Strawberry Fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 9, p. 2802, 1996.
18. HEATH, H. B. & REINECCIUS, G. Flavor Chemistry and Tecnology. Biogenesis of Flavor in Fruits and Vegetables, New York, Published by Van Nostrand Reinhold Company, p. 1986.
19. HERRÁIZ, T. Produccion Biotecnologica de Compuestos del Aroma de Alimentos. Aplicacion en la Industria Alimentaria. **Alimentaria**, p. 35-39, 1990.
20. JANSSENS, L.; DE POOTER, H. L.; VANDAMME, E. J. & SCHAMP, N. M. Biosynthesis of Esters by *Geotrichum penicillatum*. Bioflavour'87. Analysis - Biochemistry - Biotechnology. Editor Peter Schreier, p. 465-471, 1988.
21. JANSSENS, L., DE POOTER, H. L., SCHAMP, N. M. & VANDAMME, E. J. Production of Flavours by Microorganisms. **Process Biochemistry**, v. 27, p. 195-215, 1992.

22. JIANG, J. Volatile Metabolites Produced by *Kluyveromyces lactis* and Their Changes During Fermentation. **Process Biochemistry**, v. 30, n. 7, p. 635-640, 1995.
23. KATZ, I. Biogenesis of Aromas. In: Biogenesis of Aromas (T. H. Parliment and Croteau, eds.). Washington, DC, ACS Symposium Series 317, p. 380-386, 1986.
24. KEMPLER, G. M. Production of Flavor Compounds by Microorganisms. **Advances in Applied Microbiology**, v. 29, p. 29-51, 1983.
25. KOGAN, N. & FREEMAN, A. Development of Macrocapsules Containing Bioflavors Generated *in situ* by Immobilized Cells. **Process Biochemistry**, v. 29, n. 8, p. 671-677, 1994.
26. KREGER, V. R. The Yeasts, A Taxonomic Study. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 1984.
27. KRINGS, U., ABRAHAM, B. G. & BERGER, R. G. Plant Impact Volatiles from Higher Fungi: A Biotechnological Perspective. **Perfumer & Flavorist**, v. 20, p. 79-86, 1995.
28. LABOWS, J. N., MCGINGLEY, K.J., LEYDEN, J. J. & WEBSTER, G. F. Characteristic γ -Lactone Odor Production of the Genus *Pityrosporum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.38, n. 3, p. 412-415, 1979.
29. LANZA, E.; KO, K. H.; PALMER, J. K. Aroma Production by Cultures of *Ceratocystis moniliformis*. **Agr. Food Chem.**, v. 24, n. 6, p. 1247-1250, 1976.

30. LATRASSE, A. & DAMERON, P. An Ester Producing Microorganism: *Geotrichum candidum* (STARON). Bioflavour'87. Analysis - Biochemistry - Biotechnology. Editor Peter Schreier, p. 465-471, 1988.
31. LU, G.; YU, T.H. & HO, C.T. Generation of Flavor Compounds by the Reaction of 2-Deoxyglucose with Selected Aminoacids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 1, p. 233-236, 1996.
32. LUGAY, J. C. Biogenesis of Aromas. An Industrial Perspective. In: Biogenesis of Aromas (T. H. Parliment and Croteau, eds.). Washington, DC, ACS Symposium Series 317, p. 11-17, 1986.
33. MAARSE, H. Volatile Compounds in Foods and Beverages. Marcel Dekker, Inc, 1991.
34. MANLEY, C. H. The Development and Regulation of Flavor, Fragrance, and Color Ingredients Produced by Biotechnology. Process of Production of Flavor, Fragrance and Color Ingredients, edited by Alan Gabelman, p. 19-39, 1995.
35. MORTON, I. D. & MACLEOD, A. J. Developments in Food Science, Food Flavours. Part A - Introduction - Techniques of Analysis of Flavours, p. 15-78, 1982.
36. NAGODAWITHANA, T. Yeast- Derived Flavors and Flavor Enhancers and their Probable Mode of Action. **Food Tecnology**, v. 46, n. 11, p. 138-144 , 1992.

37. PARLIMENT, T. H. Sample Preparation Techniques for Gas-Liquid Chromatographic Analysis of Biologically Derived Aromas. In: Biogenesis of Aromas (T. H. Parliment and Croteau, eds.). Washington, DC, ACS Symposium Series 317, p. 34-52, 1986.
38. PASTORE, G. M., SATO, H. H., YANG, T. S., PARK, Y. K. & MIN, D. B. Production of Fruity Aroma by Newly Isolated Yeast, **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 4, p. 389-392, 1994.
39. ROWAN, D. D.; LANE, H. P.; ALLEN, J. M.; FIELDER & MARTIN, B. H. Biosynthesis of 2-Methylbutyl, 2-Methyl-2-butenyl, and 2-Methylbutanoate Esters in Red Delicious and Granny Smith Apples Using Deuterium-Labeled Substrates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 10, p. 3276-3285, 1996.
40. SARIASLANI, F. S. & ROSAZZA, J. P. N. Biocatalysis in Natural Products Chemistry. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 6, p. 242-253, 1984.
41. SARRIS, J. & LATRASSE, A. Production of Odoriferous γ -lactones by *Fusarium poae*. **Agricultural Biological Chemistry**, v. 49, n. 11., p. 3227-3230, 1985.
42. SCHARPF, Jr. L. G.; SEITZ; E. W.; MORRIS, J. A. & FARBOOD, M. I. Generation of Flavor and Odor Compounds through Fermentation Processes. In: Biogenesis of Aromas (T. H. Parliment and Croteau, eds.). Washington, DC, ACS Symposium Series. 317, p. 323-346, 1986.

44. SCHINDLER, J. & SCHMID, R. D. Fragrance or Aroma Chemicals - Microbial Synthesis and Enzymatic Transformation. **Process Biochemistry**, p. 2-8, 1982.
45. TAHARA, S. & MIZUTANI, J. δ -Lactones Produced by *Sporobolomyces odorus*. **Agricultural Biological Chemistry**, v. 39, n. 1, p. 281-282, 1975.
46. TAHARA, S; FUJIWARA, K. & MIZUTANI, J. Neutral Constituents of Volatiles in Cultured Broth of *Sporobolomyces odorus*. **Agricultural Biological Chemistry**, v. 37, n. 12, p. 2855-2861, 1973.
47. TRESSL, R. & ALBRECHT, W. Biogenesis of Aroma Compounds through Acyl Pathways, In: Biogenesis of Aromas. ACS Symposium Series 317, p. 114-133, 1986.
48. TRESSL, R & DRAWERT, F. Biogenesis of Banana Volatiles. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 21, n. 4, p. 560-565, 1973.
49. WELSH, F. W. Overview of Bioprocess Flavor and Fragrance Production. In: Bioprocess Production of Flavor, Fragrance and Color Ingredients, edited by Alan Gabelman, 1995.
50. YAMAUCHI, H., OBATA, T., AMACHI, T. & HARA, S. Production of characteristic odors by *Neurospora*. **Agricultural Biological Chemistry**, v. 55, n. 12, p. 3115-3116, 1991.

51. YOSHIZAWA, K., YAMAUCHI, H., HASUO, T., AKITA, O. & HARA, S.
Production of a Fruity Odor by *Neurospora* sp. **Agricultural Biological
Chemistry**, v. 52, n. 8, p. 2129-30, 1988.

ANEXOS

ANEXO 1 - Dados numéricos das quantidades de compostos voláteis produzidos nos diferentes meios de culturas nas temperaturas de 20°C, 25°C e 30°C por *Pichia membranaefaciens*.

ANEXO 1 - Dados numéricos das quantidades de compostos voláteis produzidos nos diferentes meios de culturas nas temperaturas de 20°C, 25°C e 30°C por *Pichia membranaefaciens*.

Tabela 1.1: Quantidade de compostos voláteis produzidos por *Pichia membranaefaciens* no meio de cultura Glicose/Autolisado de levedura à temperatura de 20°C:

COMPOSTOS	24 Horas (g/L)	48 Horas (g/L)	72 Horas (g/L)	96 Horas (g/L)
Acetato de etila	2,32	1,66	1,496	3,738
Isobutanol	0,419	0,406	0,271	0,741
1-Butanol		0,068		
Propanoato de etila				0,047
Álcool isoamílico	0,169	1,286	0,055	0,228
Álcool n-amílico	0,105	0,157	0,048	0,002
Acetato de n-butila	0,201	0,283		0,164
Acetato de isoamila		0,125		0,0206
Caproato de etila	0,0115	0,027	0,215	0,0930
Álcool feniletílico	0,445	0,595	0,465	0,060

Tabela 1.2: Quantidade de compostos voláteis produzidos por *Pichia membranaefaciens* no meio de cultura Glicose/Autolisado de levedura à temperatura de 25°C:

COMPOSTOS	24 Horas (g/L)	48 Horas (g/L)	72 Horas (g/L)	96 Horas (g/L)
Acetato de etila	1,696	0,863	0,714	0,312
Isobutanol	0,257	0,179	0,389	0,042
1-Butanol			0,127	0,606
Propanoato de etila			0,714	0,069
Álcool isoamílico	0,744	0,008	1,550	1,707
Álcool n-amílico	0,674	0,006	0,096	0,059
Acetato de n-butila	0,171	0,179	0,069	0,074
Acetato de isoamila	0,079	0,068	0,1138	0,1730
Caproato de etila	0,020	0,020	0,003	0,017
Álcool feniletílico	0,013	0,019	0,1	0,122

Tabela 1.3: Quantidade de compostos voláteis produzidos por *Pichia membranaefaciens* no meio de cultura Glicose/Autolisado de levedura à temperatura de 30°C:

COMPOSTOS	24 Horas (g/L)	48 Horas (g/L)	72 Horas (g/L)	96 Horas (g/L)
Acetato de etila	0,744	2,794	2,065	46,07
Isobutanol	0,288	0,147	0,019	3,732
1-Butanol	0,087	0,210	0,015	3,21
Propanoato de etila	0,101	0,146	0,749	0,303
Álcool isoamílico	0,150	0,197	0,122	0,468
Álcool n-amílico	0,231	0,064	0,019	0,171
Acetato de n-butila	0,170			
Acetato de isoamila	0,389	0,048		0,012
Caproato de etila		0,021		
Álcool feniletílico	0,037	0,008	0,006	0,063

Tabela 1.4: Quantidade de compostos voláteis produzidos por *Pichia membranaefaciens* no meio de cultura Glicose/Extrato de levedura à temperatura de 20°C:

COMPOSTOS	24 Horas (g/L)	48 Horas (g/L)	72 Horas (g/L)	96 Horas (g/L)
Acetato de etila	0,417	1,58	6,722	7,532
Isobutanol	0,229	0,758	0,954	1,458
1-Butanol		0,025	3,902	
Propanoato de etila		0,035		
Álcool isoamílico	0,136	0,549	0,356	0,15
Álcool n-amílico	0,655	0,025	0,179	0,824
Acetato de n-butila	0,140	0,123	0,193	0,179
Acetato de isoamila	0,105	0,008	0,008	0,020
Caproato de etila	0,008	0,101	0,213	
Álcool feniletílico	0,777	1,707	0,132	0,081

Tabela 1.5: Quantidade de compostos voláteis produzidos por *Pichia membranaefaciens* no meio de cultura Glicose/Extrato de levedura à temperatura de 25°C:

COMPOSTOS	24 Horas (g/L)	48 Horas (g/L)	72 Horas (g/L)	96 Horas (g/L)
Acetato de etila	1,973	6,28	7,462	3,736
Isobutanol	0,229	1,168	1,315	1,041
1-Butanol			0,127	0,100
Propanoato de etila			0,139	0,082
Álcool isoamílico	0,142	0,502	2,659	1,592
Álcool n-amílico		0,069	0,315	0,105
Acetato de n-butila	0,172		0,091	0,084
Acetato de isoamila	0,059	0,456	0,249	0,182
Caproato de etila	0,025	0,010	0,034	0,02
Álcool feniletílico	0,013	0,016	0,113	0,101

Tabela 1.6: Quantidade de compostos voláteis produzidos por *Pichia membranaefaciens* no meio de cultura Glicose/Extrato de levedura à temperatura de 30°C:

COMPOSTOS	24 Horas (g/L)	48 Horas (g/L)	72 Horas (g/L)	96 Horas (g/L)
Acetato de etila	3,049	2,813	34,02	19,543
Isobutanol	0,386	0,243	1,44	3,881
1-Butanol	0,047		1,189	0,994
Propanoato de etila	0,108	0,302		0,286
Álcool isoamílico	0,301	0,191	0,243	0,114
Álcool n-amílico	0,041	0,040	0,193	0,060
Acetato de n-butila	0,014	0,023		0,0453
Acetato de isoamila	0,480	0,010	0,042	0,005
Caproato de etila	0,286	0,003	0,021	
Álcool feniletílico	0,051	0,003	0,035	0,025

Tabela 1.7: Quantidade de compostos voláteis produzidos por *Pichia membranaefaciens* no meio de cultura Frutose/Autolisado de levedura à temperatura de 20°C:

COMPOSTOS	24 Horas (g/L)	48 Horas (g/L)	72 Horas (g/L)	96 Horas (g/L)
Acetato de etila	1,88	2,11	7,715	5,986
Isobutanol	0,529	0,461	1,176	1,067
1-Butanol			0,007	0,0255
Propanoato de etila	0,490	0,0095	0,0208	0,022
Álcool isoamílico	1,027	0,187	0,318	
Álcool n-amílico	0,288	0,352	0,309	1,637
Acetato de n-butila	0,283	0,088	0,281	0,207
Acetato de isoamila	0,008		0,011	0,0085
Caproato de etila	0,047	0,067	0,041	0,023
Álcool feniletílico	0,435	0,033	0,164	0,094

Tabela 1.8: Quantidade de compostos voláteis produzidos por *Pichia membranaefaciens* no meio de cultura Frutose/Autolisado de levedura à temperatura de 25°C:

COMPOSTOS	24 Horas (g/L)	48 Horas (g/L)	72 Horas (g/L)	96 Horas (g/L)
Acetato de etila	1,473	2,169	0,360	0,125
Isobutanol	0,200	0,565	0,226	0,151
1-Butanol		2,23	0,078	0,039
Propanoato de etila		0,146	0,103	0,085
Álcool isoamílico	0,007	0,251	0,854	0,42
Álcool n-amílico	0,026	0,0404	0,0642	
Acetato de n-butila	0,131	0,138	0,035	0,024
Acetato de isoamila	0,012	0,755	0,091	0,005
Caproato de etila	0,059	0,090	0,087	0,053
Álcool feniletílico	0,030	0,081	0,006	0,52

Tabela 1.9: Quantidade de compostos voláteis produzidos por *Pichia membranaefaciens* no meio de cultura Frutose/Autolisado de levedura à temperatura de 30°C:

COMPOSTOS	24 Horas (g/L)	48 Horas (g/L)	72 Horas (g/L)	96 Horas (g/L)
Acetato de etila	0,548	5,118	33,37	5,71
Isobutanol	0,231		2,282	0,970
1-Butanol	0,048	0,894	1,85	
Propanoato de etila	0,103	0,069	0,284	0,356
Álcool isoamílico	0,263		0,273	0,645
Álcool n-amílico	0,044		0,0464	0,023
Acetato de n-butila	0,032		0,021	
Acetato de isoamila	0,007	0,001	0,021	0,005
Caproato de etila	0,004	0,004	0,006	0,007
Álcool feniletílico	0,007	0,009	0,014	0,0019

Tabela 1.10: Quantidade de compostos voláteis produzidos por *Pichia membranaefaciens* no meio de cultura Frutose/Extrato de levedura à temperatura de 20°C:

COMPOSTOS	24 Horas (g/L)	48 Horas (g/L)	72 Horas (g/L)	96 Horas (g/L)
Acetato de etila	1,88	2,554	7,507	9,565
Isobutanol	0,529	0,589	2,503	1,765
1-Butanol				0,022
Propanoato de etila	0,49			0,029
Álcool isoamílico	1,027	0,51	0,416	0,414
Álcool n-amílico	0,288		0,380	0,337
Acetato de n-butila	0,283	0,145	0,212	
Acetato de isoamila	0,008	0,01	0,015	0,177
Caproato de etila	0,047	0,089	0,337	0,096
Álcool feniletílico	0,435	0,0445	0,172	0,015

Tabela 1.11 Quantidade de compostos voláteis produzidos por *Pichia membranaefaciens* no meio de cultura Frutose/Extrato de levedura à temperatura de 25°C:

COMPOSTOS	24 Horas (g/L)	48 Horas (g/L)	72 Horas (g/L)	96 Horas (g/L)
Acetato de etila	1,473	9,17	4,634	3,924
Isobutanol	0,2	1,981	1,098	1,493
1-Butanol			0,036	0,0271
Propanoato de etila			0,528	0,462
Álcool isoamílico	0,007	0,496	1,449	1,61
Álcool n-amílico	0,026	0,477	0,0723	
Acetato de n-butila	0,131	0,008	0,115	
Acetato de isoamila	0,012	0,267	0,0325	0,008
Caproato de etila	0,0059	0,0486	0,0176	0,044
Álcool feniletílico	0,03	0,008	0,138	0,0921

Tabela 1.12 Quantidade de compostos voláteis produzidos por *Pichia membranaefaciens* no meio de cultura Frutose/Extrato de levedura à temperatura de 30°C:

COMPOSTOS	24 Horas (g/L)	48 Horas (g/L)	72 Horas (g/L)	96 Horas (g/L)
Acetato de etila	2,980	30,90	41,981	15,890
Isobutanol	2,762	2,264	3,579	2,008
1-Butanol	0,248	0,666	1,733	1,543
Propanoato de etila	0,033	0,301	0,526	0,102
Álcool isoamílico	0,075	0,225	0,362	0,823
Álcool n-amílico	0,043	0,029	0,143	0,079
Acetato de n-butila		0,005	0,068	0,016
Acetato de isoamila	0,120	0,09	0,004	0,009
Caproato de etila	0,0102		0,007	
Álcool feniletílico	0,096	0,011	0,008	0,012

Tabela 1.13 Quantidade de compostos voláteis produzidos por *Pichia membranaefaciens* no meio de cultura Manose/Autolisado de levedura à temperatura de 20°C:

COMPOSTOS	24 Horas (g/L)	48 Horas (g/L)	72 Horas (g/L)	96 Horas (g/L)
Acetato de etila	2,81	6,92	10,296	13,955
Isobutanol	0,74	1,59	1,864	1,886
1-Butanol	0,29	0,97	1,307	2,172
Propanoato de etila	0,01	0,04	0,041	0,031
Álcool isoamílico	0,4	0,92	2,091	1,38
Álcool n-amílico	0,09	0,15	0,142	0,138
Acetato de n-butila	0,81	2,87	3,089	0,159
Acetato de isoamila	0,001	0,002	0,002	0,004
Caproato de etila		0,02	0,026	0,0129
Álcool feniletílico	0,01	0,02	0,259	0,146

Tabela 1.14 Quantidade de compostos voláteis produzidos por *Pichia membranaefaciens* no meio de cultura Manose/Autolisado de levedura à temperatura de 25°C:

COMPOSTOS	24 Horas (g/L)	48 Horas (g/L)	72 Horas (g/L)	96 Horas (g/L)
Acetato de etila	1,01	0,72	0,658	0,483
Isobutanol	0,177	0,292	0,41	0,232
1-Butanol	0,022	0,028	0,063	0,051
Propanoato de etila	0,055	0,074	0,122	0,074
Álcool isoamílico	0,712	1,187	2,336	0,996
Álcool n-amílico	0,053	0,068	0,073	0,111
Acetato de n-butila	0,086	0,273	0,264	0,133
Acetato de isoamila	0,542	0,241	0,44	0,862
Caproato de etila	0,137	0,074	0,071	0,255
Álcool feniletílico	0,06	0,095	0,179	0,108

Tabela 1.15 Quantidade de compostos voláteis produzidos por *Pichia membranaefaciens* no meio de cultura Manose/Autolisado de levedura à temperatura de 30°C:

COMPOSTOS	24 Horas (g/L)	48 Horas (g/L)	72 Horas (g/L)	96 Horas (g/L)
Acetato de etila	0,438	20,827	27,337	15,726
Isobutanol	0,154	42,06	0,992	1,971
1-Butanol	0,064	9,908	2,885	1,977
Propanoato de etila	0,080	0,831	0,219	0,115
Álcool isoamílico	0,156	0,293	0,077	0,009
Álcool n-amílico	0,058	0,191	0,029	0,008
Acetato de n-butila	0,076	0,114	0,021	0,022
Acetato de isoamila	0,051	0,042	0,048	0,024
Caproato de etila	0,038	0,020	0,06	0,014
Álcool feniletílico	0,034	0,027	0,017	0,009

Tabela 1.16 Quantidade de compostos voláteis produzidos por *Pichia membranaefaciens* no meio de cultura Manose/Extrato de levedura à temperatura de 20°C:

COMPOSTOS	24 Horas (g/L)	48 Horas (g/L)	72 Horas (g/L)	96 Horas (g/L)
Acetato de etila	18,67	21,24	16,47	8,862
Isobutanol		0,732	3,334	3,141
1-Butanol	6,885	2,662	1,884	1,496
Propanoato de etila	0,065	0,054	0,05	0,07
Álcool isoamílico	1,236	1,869	1,083	1,027
Álcool n-amílico	0,068	0,194	0,113	0,110
Acetato de n-butila	0,463	0,018	0,583	0,258
Acetato de isoamila	0,003	3,58		
Caproato de etila	0,016	0,033	0,04	0,01
Álcool feniletílico	0,1	0,193	0,118	0,09

Tabela 1.17 Quantidade de compostos voláteis produzidos por *Pichia membranaefaciens* no meio de cultura Manose/Extrato de levedura à temperatura de 25°C:

COMPOSTOS	24 Horas (g/L)	48 Horas (g/L)	72 Horas (g/L)	96 Horas (g/L)
Acetato de etila	2,268	12,28	4,325	3,574
Isobutanol	0,337	1,368	1,047	0,99
1-Butanol	0,024	0,213	0,163	0,166
Propanoato de etila	0,261	0,869	0,416	0,491
Álcool isoamílico	1,035	1,49	1,37	1,209
Álcool n-amílico	0,066	0,124	0,097	0,14
Acetato de n-butila	0,274	0,549	0,141	0,139
Acetato de isoamila	0,163	0,282	0,57	1,077
Caproato de etila	0,023	0,039	0,329	0,125
Álcool feniletílico	0,89	0,077	0,269	0,102

Tabela 1.18 Quantidade de compostos voláteis produzidos por *Pichia membranaefaciens* no meio de cultura Manose/Extrato de levedura à temperatura de 30°C:

COMPOSTOS	24 Horas (g/L)	48 Horas (g/L)	72 Horas (g/L)	96 Horas (g/L)
Acetato de etila	3,003	21,292	35,12	16,183
Isobutanol	0,419	3,187	2,927	0,557
1-Butanol		2,656	1,322	2,323
Propanoato de etila	0,231	1,120	0,519	0,066
Álcool isoamílico	0,02	1,239	0,025	0,240
Álcool n-amílico	0,02	0,151	0,141	0,115
Acetato de n-butila	0,011	0,324		0,049
Acetato de isoamila	0,075	0,026	0,035	0,032
Caproato de etila	0,021	0,032	0,006	0,016
Álcool feniletílico	0,063	0,13	0,019	0,009

ANEXO 2 - Maiores rendimentos obtidos nos meios de cultura selecionados nas temperaturas de 20°C, 25°C e 30°C.

Tabela 2.1: Maiores rendimentos dos compostos voláteis no meio Glicose/Autolisado de levedura nas temperaturas de 20°C, 25°C e 30°C:

MEIOS DE CULTURA	COMPOSTOS	TEMPO DE FERMENTAÇÃO (horas)	RENDIMENTO MÁXIMO (g/L)
GAL 20			
	Acetato de n-butila	48	0,283
	Caproato	72	0,215
	Álcool fenilético	48	0,595
GAL 25			
	Álcool isoamílico	96	1,707
	Álcool n-amílico	24	0,674
GAL 30			
	Acetato de etila	96	46,07
	Isobutanol	96	3,732
	1-butanol	96	3,21
	Propanoato	72	0,749
	Acetato de isoamila	24	0,389

Tabela 2.2: Maiores rendimentos dos compostos voláteis no meio Glicose/Extrato de levedura nas temperaturas de 20°C, 25°C e 30°C:

MEIOS DE CULTURA	COMPOSTOS	TEMPO DE FERMENTAÇÃO (horas)	RENDIMENTO MÁXIMO (g/L)
GEL 20	1-butanol	72	3,902
	Álcool n-amílico	96	0,824
	Acetato de n-butila	72	0,193
	Álcool feniletílico	48	1,707
GEL 25	Álcool isoamílico	96	1,707
GEL 30	Acetato de etila	72	34,02
	Isobutanol	96	3,881
	Propanoato	48	0,302
	Acetato de isoamila	24	0,480
	Caproato	24	0,286

Tabela 2.3: Maiores rendimentos dos compostos voláteis no meio Frutose/Autolisado de levedura nas temperaturas de 20°C, 25°C e 30°C:

MEIOS DE CULTURA	COMPOSTOS	TEMPO DE FERMENTAÇÃO (horas)	RENDIMENTO MÁXIMO (g/L)
FAL 20			
	Propanoato de etila	24	0,490
	Álcool isoamílico	24	1,027
	Álcool n-amílico	96	1,637
	Acetato de n-butila	24	0,283
FAL 25			
	1-butanol	48	2,23
	Acetato de isoamila	48	0,75
	Caproato de etila	48	0,090
	Álcool fenilético	96	0,52
FAL 30			
	Acetato de etila	72	33,37
	Isobutanol	72	2,282

Tabela 2.4: Maiores rendimentos dos compostos voláteis no meio Frutose/Extrato de levedura nas temperaturas de 20°C, 25°C e 30°C:

MEIOS DE CULTURA	COMPOSTOS	TEMPO DE FERMENTAÇÃO (horas)	RENDIMENTO MÁXIMO (g/L)
FEL 20	Acetato de n-butila	24	0,283
	Caproato de etila	72	0,337
	Álcool fenilefílico	24	0,435
FEL 25	Propanoato de etila	72	0,528
	Álcool isoamílico	96	1,61
	Álcool n-amílico	96	1,61
	Acetato de isoamila	48	0,267
FEL 30	Acetato de etila	72	41,981
	Isobutanol	72	3,579
	1-butanol	72	1,733

Tabela 2.5: Maiores rendimentos dos compostos voláteis no meio Manose/Autolisado de levedura nas temperaturas de 20°C, 25°C e 30°C:

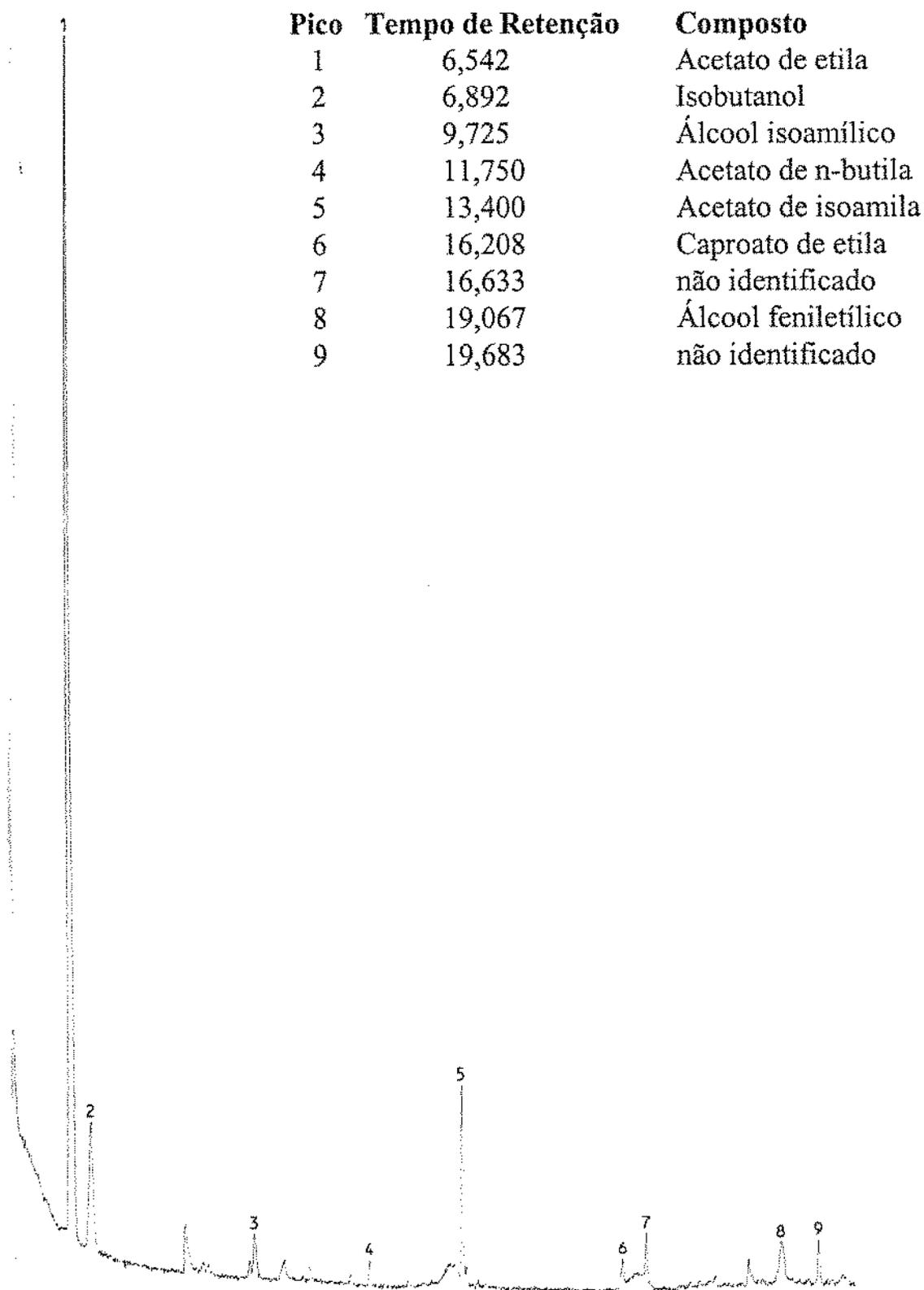
MEIOS DE CULTURA	COMPOSTOS	TEMPO DE FERMENTAÇÃO (horas)	RENDIMENTO MÁXIMO (g/L)
MAL 20			
	Acetato de n-butila	72	3,089
	Álcool fenilético	72	0,259
MAL 25			
	Álcool isoamílico	72	2,336
	Acetato de isoamila	96	0,862
	Caproato de etila	96	0,255
MAL 30			
	Acetato de etila	72	27,33
	Isobutanol	48	42,06
	1-butanol	72	2,88
	Propanoato	48	0,831
	Álcool n-amílico	48	0,191

Tabela 2.6: Maiores rendimentos dos compostos voláteis no meio Manose/Extrato de levedura nas temperaturas de 20°C, 25°C e 30°C:

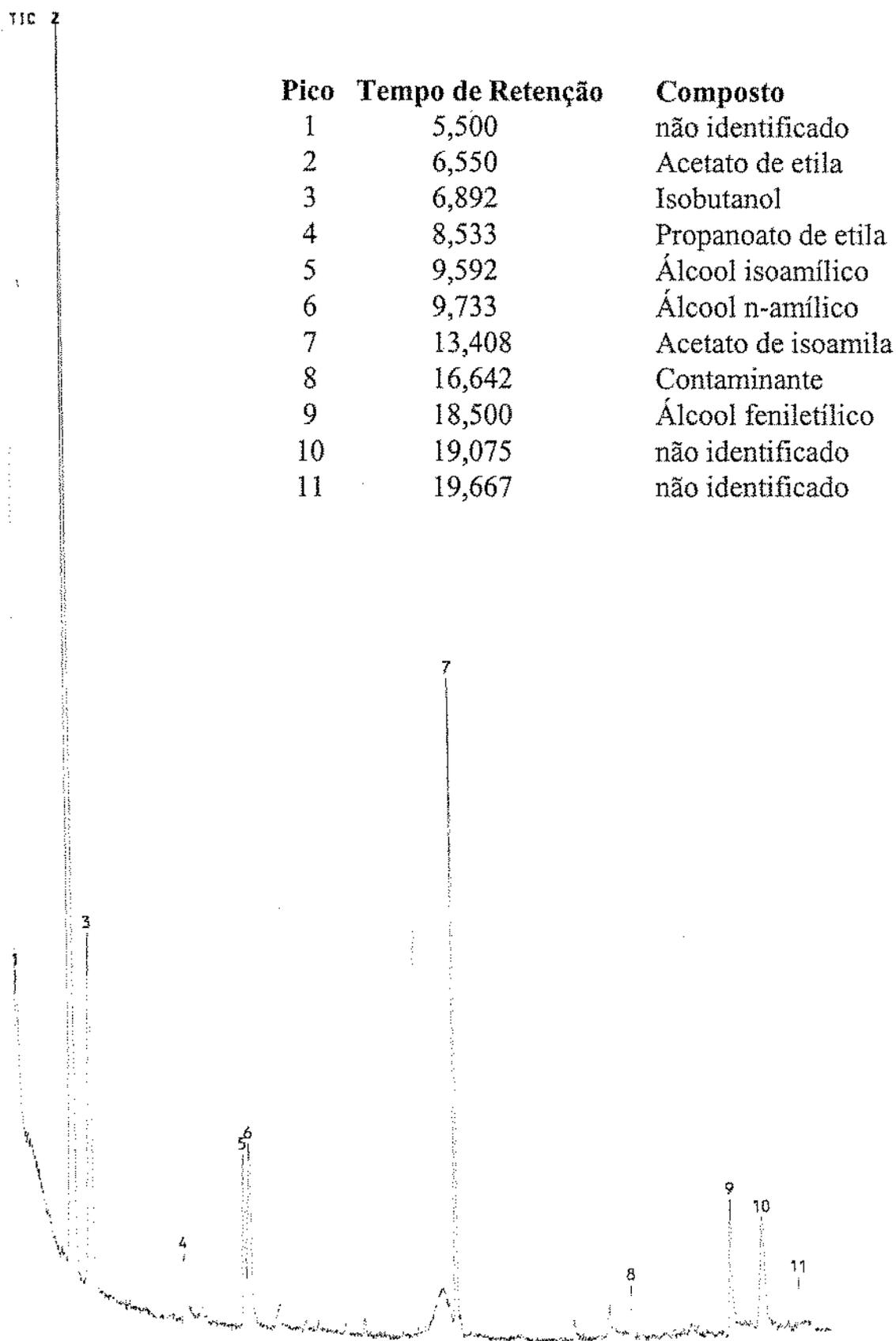
MEIOS DE CULTURA	COMPOSTOS	TEMPO DE FERMENTAÇÃO (horas)	RENDIMENTO MÁXIMO (g/L)
MEL 20			
	Isobutanol	72	3,33
	1-butanol	24	6,885
	Álcool isoamílico	48	1,869
	Álcool n-amílico	48	0,194
	Acetato n-butila	72	0,583
	Acetato isoamila	48	3,58
MEL 25			
	Caproato de etila	72	0,329
	Álcool fenilético	72	0,269
MEL 30			
	Acetato de etila	72	35,12
	Propanoato de etila	48	1,12

ANEXO 3- Ilustração dos cromatogramas de quantificação e identificação dos compostos voláteis produzidos por *Pichia membranaefaciens*, nos diferentes meios de cultura, após 48 horas de fermentação.

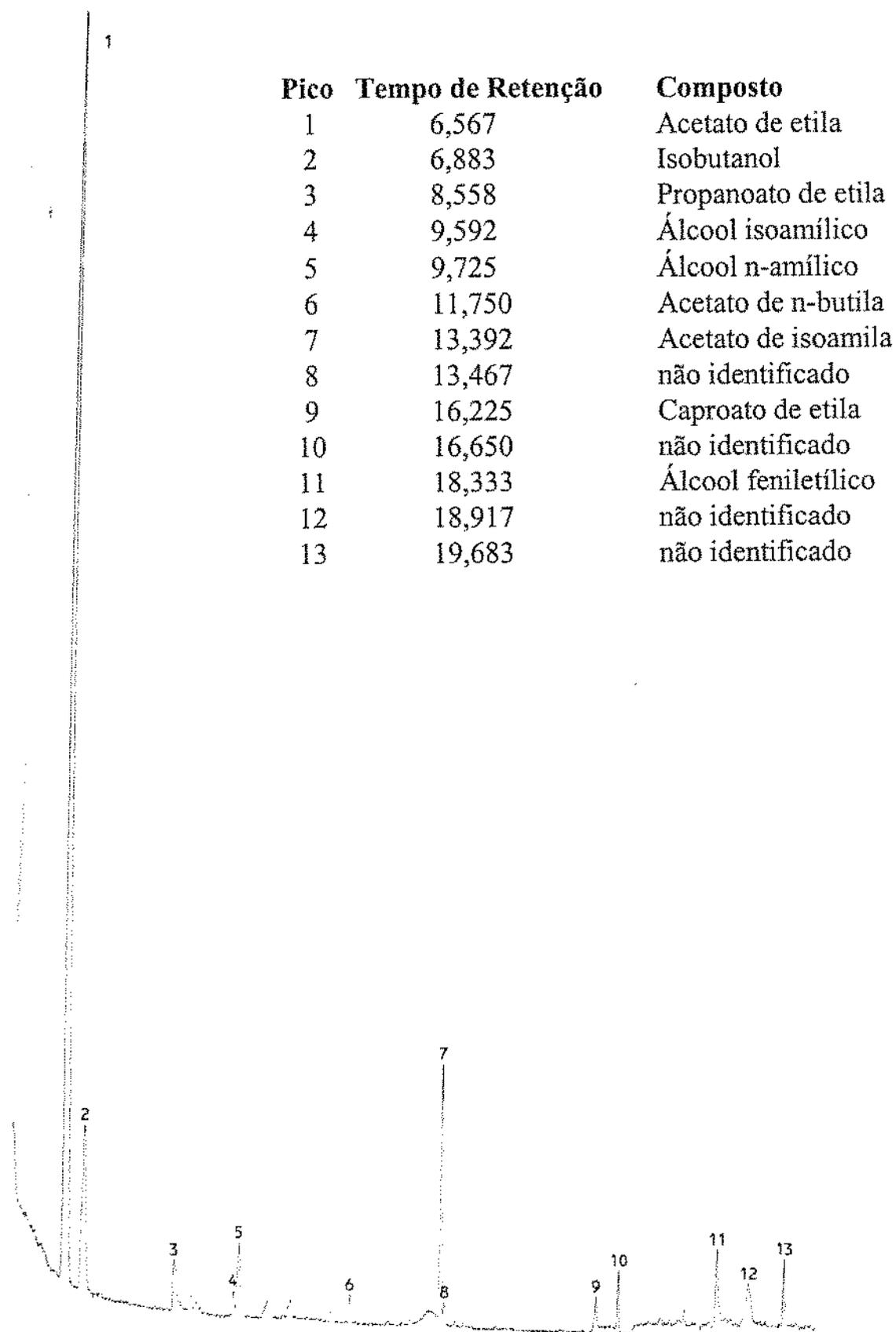
Anexo 3.1 Cromatograma de quantificação dos compostos voláteis no meio de cultura Glicose/Autolisado de levedura após 48 horas, á temperatura de 20°C.



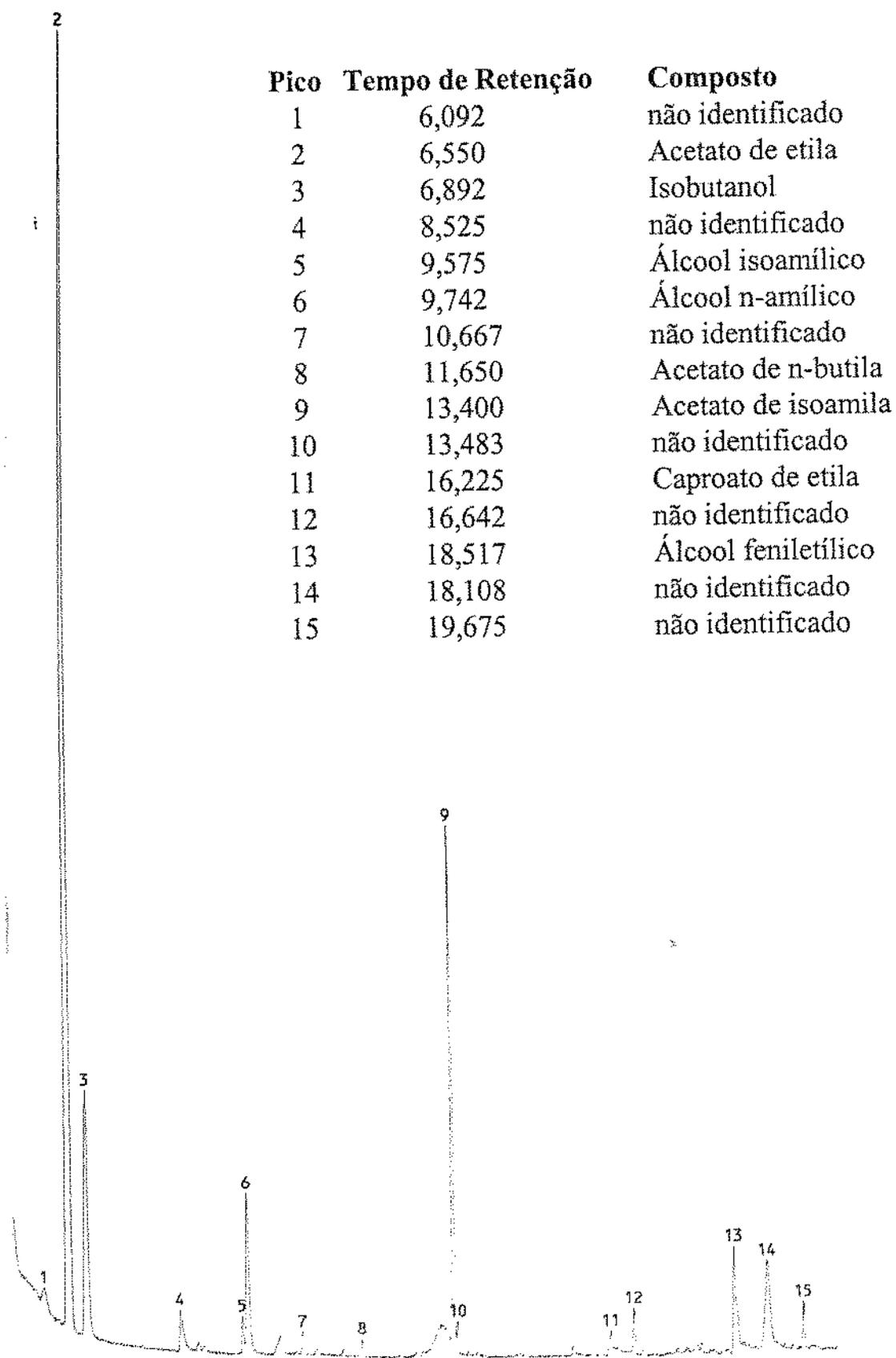
Anexo 3.2 Cromatograma de quantificação dos compostos voláteis no meio de cultura Glicose/Extrato de levedura após 48 horas, à temperatura de 20°C.



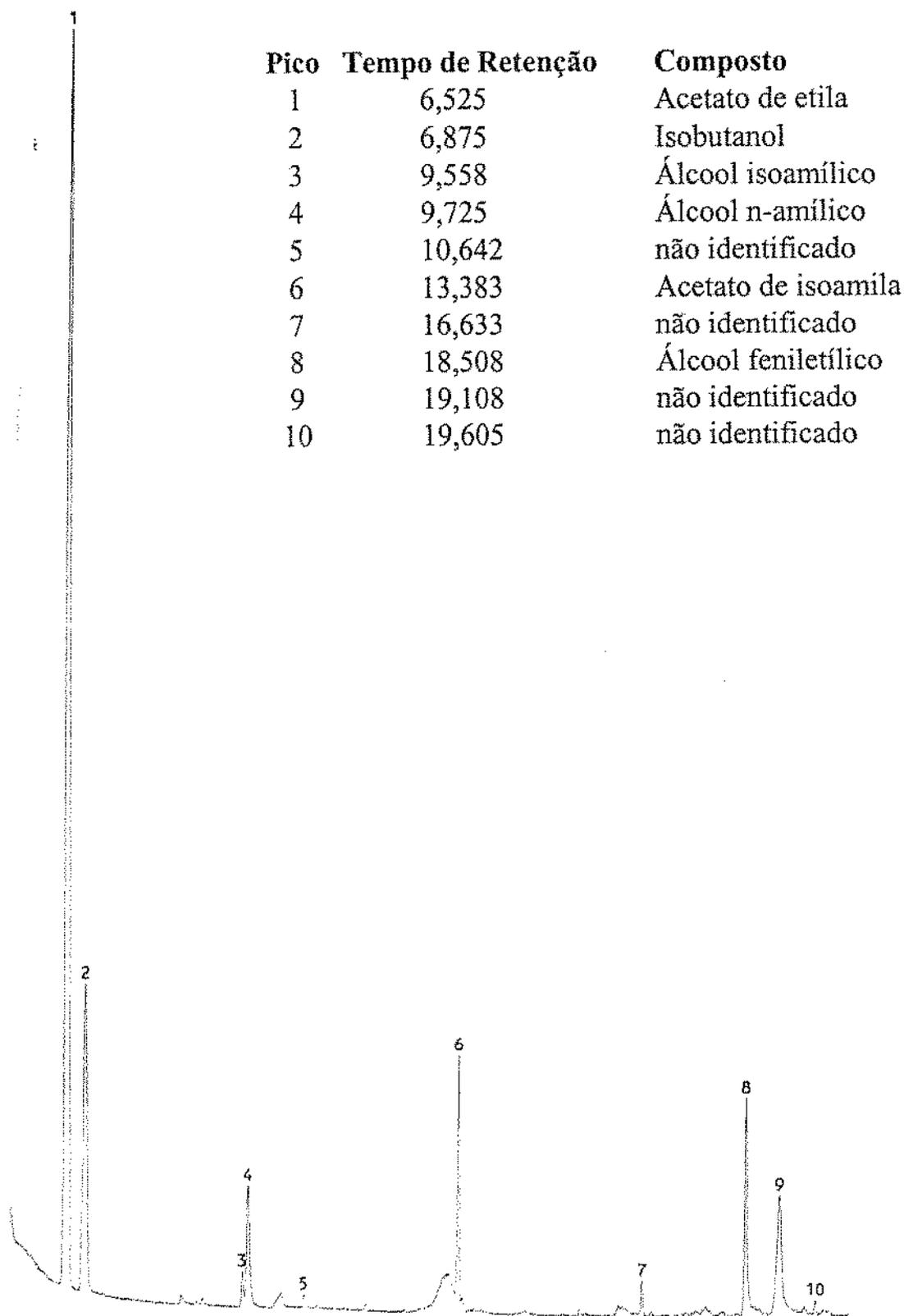
Anexo 3.3 Cromatograma de quantificação dos compostos voláteis no meio de cultura Frutose/Autolisado de levedura após 48 horas, à temperatura de 20°C.



Anexo 3.4 Cromatograma de quantificação dos compostos voláteis no meio de cultura Frutose/Extrato de levedura após 48 horas, à temperatura de 20°C.



Anexo 3.5 Cromatograma de quantificação dos compostos voláteis no meio de cultura Manose/Autolisado de levedura após 48 horas, à temperatura de 20°C.



Anexo 3.6 Cromatograma de quantificação dos compostos voláteis no meio de cultura Manose/Extrato de levedura após 48 horas, à temperatura de 20°C.

Pico	Tempo de Retenção	Composto
1	6,558	Acetato de etila
2	6,875	Isobutanol
3	9,583	Álcool isoamílico
4	9,733	Álcool n-amílico
5	10,658	não identificado
6	13,400	Acetato de isoamila
7	13,475	não identificado
8	16,650	Caproato de etila
9	18,525	Álcool feniletílico

