UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

Produção de gama-decalactona (GDL) através da biotransformação de ácidos graxos por linhagens de *Geotrichum fragans* e *Geotrichum sp*

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Roseli de Sousa Neto

Bióloga

Mestre em Ciências de Alimentos

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore

Orientadora

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Para obtenção do título de Doutor em Ciências de Alimentos

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Roseli de Sousa Neto**, aprovada pela Comissão Julgadora em 16 de setembro de 2003.

Campinas, 16 de setembro de 2003.

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
Presidente da Banca

Campinas - SP
Julho, 2003

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE BC
Nº CHAMADA UNICAMP
So 85 p
V EX
TOMBO BC/ 56163
PROC. 16-124/03
C D
PREÇO R$ 11,00
DATA 11/20/03
Nº CPD

CM00190398-3

Bib id. 302188

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

S085p

Sousa Neto, Roseli de
Produção de gama-decalactona (GDL), através da biotransformação de ácidos graxos por linhagens de *Geotrichum fragans* e *Geotrichum sp.* / Roseli de Sousa Neto. – Campinas, SP:[s.n.], 2003.

Orientador: Gláucia Maria Pastore
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Ácidos graxos. 2.Biotransformação. 3.*Geotrichum sp.* 4.Biotecnologia. I.Pastore, Gláucia Maria. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
(orientadora)

Prof. Dr. Hiroshi Aoyama
(membro)

Profa. Dra. Hilary Castle de Menezes
(membro)

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato
(membro)

Profa. Dra. Jane Gonçalves Menegaldo Snow
(membro)

Prof. Dr. Yong Kun Park
(suplente)

Profa. Dra. Gabriela Alves Macedo
(suplente)

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

000332024

"Digno és, Senhor de receber glória e honra, e poder; porque tu criaste todas as coisas, e por tua vontade são e foram criadas" (Ap. 4 vs11)".

À Deus que me cingiu de forças, me deu Graça e ungiu as minhas mãos para que este trabalho fosse concluído, Dedico"

"Esperei com paciência no Senhor, e ele se inclinou para mim e ouviu meu clamor. Tirou-me dum lago horrível, dum charco de lodo, pôs os meus pés sobre uma rocha, firmou os meus passos" (slamo 40, vs 1e2)

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais biológicos João e Creuza (*in memorium*) por ter me permitido vir ao mundo.

Aos meus pais adotivos Benedito (*in memorium*) e Hermantina por mais esta realização profissional, pela educação que me deram e pelos exemplos de vida, ensinando sempre que é possível obter o que se quer através de muito trabalho e do respeito para com todas as pessoas. E para você minha mãe, que pela Graça de Deus, sobreviveu àquele triste acidente, dedico.

Aos meus irmãos Ivan, Rogéria, Rosângela e minhas sobrinhas Bianka, Brunna, Élida e Elisângela que sempre me incentivaram a prosseguir por mais difíceis e muitas vezes injustas que fossem, as pedras espalhadas pelo caminho. Esta "conquista" também pertence a vocês!

À Joaquim Francisco Prado (Faculdade de Ciências Médicas–UNICAMP) e família, pela valiosa amizade e apoio nos momentos mais difíceis desta caminhada.

À Dionir Jeremias Baptista (Núcleo de Microbiologia-ITAL) amiga desde o período de graduação pelo incentivo e apoio.

À Profa. Eliane Maria Ferrarezzo pela amizade, carinho e apoio nos momentos mais difíceis, uma pessoa sempre pronta a me ajudar, em todos os momentos. Sempre serei eternamente agradecida!

À Sandra Lúcia Pereira (Faculdade de Ciências Médicas-UNICAMP) pela amizade e auxílio.

À Profa. Maria Aparecida Pretti e colegas do Colégio Politécnico "Bento Quirino" pela amizade e pelo respeito com que sempre fui tratada. Obrigado!

Aos amigos Marjorie e Francisco Santucci, Valéria e Luciano, Roseli Muniz e Leonard, João e Adenilda, Ana Maria e José Roberto (DTA) e Ana, Jane, Marcos, Diego e Taís pelo carinho e apoio em todos os momentos.

Aos amigos e funcionários do Hospital das Clínicas (HC-UNICAMP) em especial à equipe de enfermagem da Enfermaria de Emergência, local da minha primeira experiência profissional, pelos anos de convívio, amizade, respeito e incentivo desde o período da graduação. Vocês fizeram parte do início da minha vida profissional nesta instituição de ensino e pesquisa e estarão sempre no meu coração! Muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra Gláucia Maria Pastore pela orientação deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Profa. Dra. Hélia Harumi Sato, Profa. Dra. Hilary C. de Menezes, Profa. Dra. Jane Menegaldo Snow, Prof. Dr. Hiroshi Ayoama, Prof. Dr. Yong K. Park e Profa. Dra. Gabriela Alves Macedo pela dedicada atenção e auxílio na elaboração final deste trabalho.

Aos técnicos do Laboratório de Bioquímica de Alimentos: Dora, Paulo, Marcelo, Beatriz e Guilherme pelo auxílio na realização deste

À Joaquim Gilberto de Oliveira pela amizade e pelo valioso auxílio durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro na etapa inicial desta pesquisa.

Aos amigos e funcionários da Secretaria do Departamento de Ciência de Alimentos pela amizade e auxílio.

Aos funcionários da Biblioteca da FEA, Creusa, Cláudia, Geraldo, José e Toninho (*in memorium*) pelo auxílio, atenção e amizade.

À Cosme Perota da Secretaria de Pós-Graduação pela amizade e auxílio.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica de Alimentos: Ivan, Severino, Mareci, Hermelinda, Márcia, Heinz, Lílian, Tatiana e Ana Maria e a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Às técnicas Adriane e Antônia do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia (IB-UNICAMP) pelo auxílio

Aos amigos e funcionários da Faculdade de Engenharia de Alimentos que contribuíram de alguma maneira, para a realização deste trabalho. Muito obrigado a todos.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

INDICE GERAL **Página**

LISTA DE TABELAS ..... **xvii**
LISTA DE FIGURAS ..... **xix**
RESUMO ..... **xxiii**
SUMMARY ..... **xxv**
1. INTRODUÇÃO **1**
2.OBJETIVOS **3**
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **4**
3.1 Considerações gerais sobre lipases 4
3.2 Estudos realizados utilizando lipases microbianas 6
3.3 Considerações Gerais sobre Aromas 15
3.4 Fatores que influenciam a aplicação industrial de aromas produzidos por biotecnologia 16
3.5 Produção de aromas 17
3.6 Produção de lactonas por microrganismos 24
3.6.1 Lactonas produzidas por síntese de novo 24
3.6.2 Lactonas produzidas por biotransformação 27
3.6.3 Estudos de produção de lactonas por microrganismos 33
3.7 O substrato óleo de mamona 52
3.7.1 Características e aplicação do óleo de mamona 52
4. MATERIAIS E MÉTODOS **55**
4.1 Materiais 55
4.2 Métodos 58
I. Estudo da habilidade de hidrolisar óleo de mamona e diferentes substratos pelas lipases microbianas **58**
4.2.1 Seleção de Lipases 58
4.2.2 Produção e determinação da atividade enzimática das lipases 58
4.2.2.1 Produção da lipase de *Alcaligenes sp* 54
4.2.2.2. Determinação da atividade de lipase da preparação enzimática da linhagem de *Alcaligenes sp* 59
4.2.2.3 Produção da lipase de *Geotrichum sp* 59

4.2.2.4 Determinação da atividade de lipase da preparação enzimática da linhagem de *Geotrichum sp*.....60
4.2.2.5 Produção das lipases de *Aspergillus sp* linhagens 1099 e 1068.....60
4.2.2.6 Determinação da atividade de lipase das preparações enzimáticas obtidas das linhagens de *Aspergillus sp* 1068 e 1099 61
4.2.2.7 Produção da lipase de *Rhizopus sp*.....61
4.2.2.8 Determinação da atividade de lipase da preparação enzimática obtida da linhagem de *Rhizopus sp* em óleo de oliva.....62
4.2.3 Determinação da concentração de proteínas.....62
4.2.4. Estudo do efeito do tempo de reação na porcentagem de hidrólise de diferentes substratos pelas lipases obtidas.....63
4.2.4.1 Relação entre o tempo de reação e porcentagem de hidrólise de diferentes substratos *pela lipase de Alcaligenes sp*.....63
4.2.4.2 Relação entre o tempo de reação e porcentagem de hidrólise de diferentes substratos pelas lipases das linhagens de *Aspergillus sp* (1068 e 1099).....63
4.2.4.3. Relação entre o tempo de reação e porcentagem de hidrólise pela lípase de *Rhizopus sp* em diferentes substratos.....64
4.2.4.4 Relação entre o tempo de reação e porcentagem de hidrólise pela lipase de *Geotrichum sp*.....64
4.2.5 Determinação do número de saponificação.....64
4.2.6 Cromatografia em camada delgada dos produtos de hidrólise em diferentes substratos pela lípase de *Alcaligenes sp*.....65
II- Utilização dos ácidos graxos liberados através da reação de hidrólise obtidos na etapa I da metodologia como precursores na produção de gama-decalactona em processo fermentativo.....66
Fluxograma de produção da gama-decalactona.....66
4.2.7 Produção de gama-decalactona através da biotransformação dos ácidos graxos liberados da reação de hidrólise do óleo de mamona e diferentes substratos.....67
4.2.7.1 Seleção de microrganismos produtores de gama-decalactona.....67
4.2.7.1.1 Produção do pré-inóculo para fermentação.....67
4.2.7.2 Estudo da Produção de gama-decalactona utilizando óleo de mamona hidrolisado, rico

ácido ricinoléico, como precursor.....67
4.2.7.3 Método de extração da gama-decalactona.....68
4.2.7.4 Condições de análise por Cromatografia Gasosa.....68
4.2.7.5 Condições de análise por espectrometria de massas.....68
4.2.7.6 Cálculo da concentração de gama-decalactona no meio de cultura.....69
4.2.7.7 Efeito da composição do meio de cultura na produção de gama-decalactona pelas linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans*.....69
4.2.7.8 Efeito da fonte de nitrogênio na produção de gama-decalactona pelas linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans*.....70
4.2.7.9 Efeito do pH na taxa de reconversão de gama-decalactona pelas linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans*.....70
4.2.7.10 Relação entre a porcentagem de hidrolisado de mamona e produção de gama-decalactona.....71
4.2.7.11 Relação entre o tempo de fermentação e a produção de gama-decalactona.....71
4.2.7.12 Efeito da temperatura na produção de gama-decalactona.....71
4.2.7.13 Efeito do pH inicial do meio de cultura na produção de gama-decalactona.....72
4.2.7.14 Efeito da concentração dos ácidos ricinoléico, linoléico, oléico, esteárico e palmítico na produção de gama-decalactona.....72
4.2.7.15 Efeito da concentração de metil ricinoleato na produção de gama-decalactona pelas linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans*.....73
4.2.7.16 Estudo do efeito dos óleos hidrolisados de mamona, soja, milho, girassol e oliva na produção de gama- decalactona.....73
4.2.7.17 Estudo do tempo de fermentação e produção de gama-decalactona pelas linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans* utilizando os óleos hidrolisados de milho, soja, oliva, girassol e mamona.....73
4.2.7.18 Análise morfológica das linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans* através de elétron-micrografia de varredura.....74
4.2.7.18.1 Preparo das amostras para análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV).....74

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 77

5.1.1 Relação entre o tempo de reação e porcentagem de hidrólise de diferentes substratos pela lipase de *Aspergillus sp*, linhagens 1068 e 1099 77

5.1.2 Relação entre o tempo de reação e porcentagem de hidrólise de diferentes substratos pela linhagem de *Rhizopus* substratos 81

5.1.3 Relação entre o tempo de reação e porcentagem de hidrólise de diferentes substratos pela lipase da linhagem de *Geotrichum sp* 83

5.1.4 Relação entre o tempo de reação e porcentagem de hidrólise de diferentes substratos pela lipase de *Alcaligenes sp* 85

5.1.5 Relação entre o tempo de reação e porcentagem de hidrólise de óleo de mamona pelas lípases das linhagens de *Aspergillus sp* 1068 e 1099, *Geotrichum sp*, *Rhizopus sp* e *Alcaligenes sp* 89

5.2 Produção de gama-decalactona através da biotransformação de ácidos graxos obtidos através da ação hidrolítica da lipase de *Acaligenes* 99

5.2.1 Seleção de Microrganismos produtores de gama-decalactona 99

5.2.2 Estudo dos parâmetros de produção de gama-decalactona pelas linhagens de *Geotrichum fragans e Geotrichum sp* 109

5.2.2.1 Estudo da composição do meio de cultura na produção de gama-decalactona pela linhagem de *Geotrichum sp* 109

5.2.2.2 Estudo da composição do meio de cultura e produção de gama-decalactona pela linhagem de *Geotrichum fragans* 111

5.2.2.3 Efeito da fonte de nitrogênio na produção de gama-decalactona pela linhagem de *Geotrichum fragans* 113

5.2.2.4 Efeito de nitrogênio na produção de gama–decalactona pela linhagem de *Geotrichum sp* 115

5..2.2.5 Efeito do pH na taxa de reconversão total de gama-decalactona pelas linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans* 117

5.2.2.6 Efeito da temperatura na produção de gama-decalactona pelas linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans* 121

5.2.2.7 Efeito do pH inicial do meio de cultura na produção de gama-decalactona pelas linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans* 123

5.2.2.8 Relação entre a porcentagem do hidrolisado de mamona e produção de gama-decalactona pelas linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans*.....125
5.2..2.9 Efeito do tempo de fermentação na produção de gama–decalactona utilizando óleo de mamona hidrolisado como precursor pelas linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans*.....127
5.2.2.10 Estudo do efeito do tempo de fermentação na produção de gama-decalactona pelas linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans* utilizando óleo de oliva como precursor...129
5.2.2.11Estudo do efeito do tempo de fermentação na produção de gama-decalactona pelas linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans* utilizando óleo hidrolisado de girassol.....131
5.2..2.12 Estudo do efeito do tempo fermentação na produção de gama-decalactona pelas linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans* utilizando óleo de soja.....133
5.2.2.13 Estudo do efeito do tempo de fermentação na produção de gama-decalactona pelas linhagens de *Geotrichum fragans* e *Geotrichum sp* utilizando óleo de milho.....135
5.2.2.14 Efeito dos ácidos graxos: ricinoléico, linoléico, oléico, esteárico e palmítico na produção de gama-decalactona pelas linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum*.....137
5.2.2.15 Efeito da concentração do ácido ricinoléico na produção de gama-decalactona pelas linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans*.....143
5.2..2.16 Efeito da concentração de ácido oléico na produção de gama-decalactona pelas linhagens de *Geotrichum fragans* e *Geotrichum sp*.....145
5.2..2.17 Efeito da concentração do ácido linoléico na produção de gama-decalactona.....147
5.2.2.18 Efeito da concentração de metil ricinoleato na produção de gama–decalactona pelas linhagens *de Geotrichum* sp e *Geotrichum fragans*.....149
5.2.19 Identificação por Espectrometria de Massas da gama-decalactona produzida pelas linhagens de *Geotrichum fragans e Geotrichum sp*.....159
6.CONCLUSÕES..... **161**
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... **163**

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Estrutura, fórmula molecular e características de aroma das lactonas..... 19

Tabela 2. Lactonas presentes em alimentos..... 21

Tabela 3. Consumo mundial de lactonas na forma nativa e sob a forma de aditivo..... 23

Tabela 4. Microrganismos produtores de lactonas por síntese de novo..... 26

Tabela 5. Qualidade sensorial de alquil-gama-lactonas em solução aquosa de 10% de açúcar e 0,0015% de ácido cítrico..... 39

Tabela 6. Composição do óleo de mamona 54

Tabela 7. Concentração de proteínas e atividades específicas das preparações de lipases 87

Tabela 8. Produção de gama-decalactona pelos microrganismos selecionados em 72 horas de fermentação..... 99

Tabela 9. Avaliação sensorial do aroma produzido pelas linhagens selecionadas como produtoras de gama-decalactona..... 100

Tabela 10. Características morfológicas da linhagem de *Geotrichum fragans*..... 105

Tabela 11. Características morfológicas da linhagem de *Geotrichum sp.*..... 106

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Biossíntese de gama-decalactona utilizando glicose como substrato..... 25
Figura 2. Biossíntese de gama-butirolactona a partir do ácido glutâmico..... 25
Figura 3. Estrutura de gama-decalactona a partir de hidroxiácidos graxos..... 28
Figura 4. Ciclo da β-oxidação..... 29
Figura 5. Esquema geral para a produção biotcnológica de lactona a partir de hidroxiácido graxo como precursor utilizando leveduras como biocatalisador..... 31
Figura 6. Obtenção de gama-decalactona por *Yarrowia lipolítica* utilizando ácido ricinoléico..... 41
Figura 7. Via biossintética provável da produção de 6-pentil-alfa-pirona através da bioconversão do ácido linoléico..... 43
Figura 8. Porcentagem de hidrólise de óleo de mamona, oliva, soja, milho e girassol pela lipase de *Aspergillus sp* n. 1068..... 77
Figura 9. Porcentagem de hidrólise de óleo de mamona, soja, oliva, milho e girassol pela lípase de *Aspergillus sp* n 1099..... 79
Figura 10. Porcentagem de hidrólise de óleo de mamona, oliva, soja, milho e girassol pela lipase de *Rhizopus sp*..... 81
Figura 11. Porcentagem de hidrólise de óleo de mamona, oliva, soja, milho e girassol pela lipase de *Geotrichum sp*..... 83
Figura 12. Porcentagem de hidrólise de óleo de mamona, oliva, soja, milho e girassol pela lipase de *Alcaligenes sp*..... 85
Figura 13. Porcentagem de hidrólise do óleo de mamona pelas lipases microbianas..... 89
Figura 14. Cromatografia em camada delgada (CCD) dos produtos de hidrólise de óleo de oliva pela lipase de *Alcaligenes sp*..... 91
Figura 15. Cromatografia em camada delgada (CCD) dos produtos de hidrólise em diferentes substratos pela lipase de *Alcaligenes* sp..... 93
Figura 16. Fluxograma de produção da lipase de *Alcaligenes sp*..... 96

Figura 17. Crescimento da linhagem de *Alcaligenes sp*, produtora de lipase alcalina em meio de cultura sólido 97

Figura 18. Micrografia óptica da linhagem de *Alcaligenes sp* (1000x) 97

Figura 19.Colônias de *Geotrichum fragans* cultivadas em meio de cultura Yeat Malt Agar com 48 horas de crescimento 103

Figura 20. Colônias de *Geotrichum sp* cultivadas em meio de cultura Yeast Malt Agar com 48 horas de crescimento 103

Figura 21. Micrografia eletrônica de varredura da linhagem de *Geotrichum fragans* em meio Yeast Malt com 48 horas de crescimento 107

Figura 22. Micrografia eletrônica de varredura da linhagem de *Geotrichum sp* em meio Yeast Malt com 48 horas de crescimento 107

Figura 23. Estudo da composição de meios de cultura e produção de gama-decalactona pela linhagem de *Geotrichum sp* 109

Figura 24. Estudo da composição de meios de cultura e produção de gama-decalactona pela linhagem de *Geotrichum fragans* 111

Figura 25. Efeito da fonte de nitrogênio na produção de gama-decalactona pela linhagem de *Geotrichum fragans* 113

Figura 26. Efeito da fonte de nitrogênio na produção de gama-decalactona pela linhagem de *Geotrichum sp* 115

Figura 27. Efeito do pH na taxa de reconversão de gama-decalactona pelas linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans* 117

Figura 28. Efeito da temperatura na produção de gama-decalactona pelas linhagens de *Geotrichum fragans* e *Geotrichum sp* 121

Figura 29. Efeito do pH na produção de gama-decalactona pelas linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans* 123

Figura 30. Efeito da concentração do óleo hidrolisado de mamona na produção de gama-decalactona 125

Figura 31. Efeito do tempo de fermentação na produção de gama-decalactona pelas linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans* utilizando óleo de mamona hidrolisado como precursor 127

Figura 32. Efeito do tempo de fermentação na produção de gama-decalactona pelas linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans* utilizando óleo de oliva como precursor..... 129

Figura 33. Efeito do tempo de fermentação na produção de gama-decalactona pelas linhagens de *Geotrichum fragans* e *Geotrichum sp* utilizando óleo de girassol como precursor..... 131

Figura 34. Efeito do tempo de fermentação na produção de gama-decalactona pelas linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans* utilizando óleo de soja hidrolisado como precursor..... 133

Figura 35. Efeito do tempo de fermentação na produção de gama-decalactona pelas linhagens de *Geotrichum fragans* e *Geotrichum sp* utilizando óleo de milho hidrolisado como precursor..... 135

Figura 36. Estudo da produção de gama-decalactona utilizando os ácidos graxos: Palmítico, Esteárico, Oléico, Linoléico e Ricinoléico..... 139

Figura 37. Efeito da concentração de ácido ricinoléico na produção de gama-decalactona..... 143

Figura 38. Efeito da concentração do ácido oléico na produção de gama-decalactona..... 145

Figura 39. Efeito da concentração de ácido linoléico na produção de gama-decalactona..... 147

Figura 40. Estudo da produção de gama-decalactona utilizando metil ricinoleato como precursor na produção de gama-decalactona..... 149

Figura 41. Cromatograma dos padrões autênticos de gama-decalactona e delta-decalactonas em cromatografia gasosa..... 153

Figura 42. Cromatograma de quantificação da análise por cromatografia gasosa (CG) da gama-decalactona produzida pela linhagem de *Geotrichum sp*..... 155

Figura 43. Cromatograma de quantificação da análise por cromatografia gasosa (CG) da gama-decalactona produzida pela linhagem de *Geotrichum fragans*..... 157

Figura 44A Espectro de massas do composto autêntico gama-decalactona..... 159

Figura 44 B. Espectro de massas do composto gama-decalactona produzido pelas linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans* no meio de cultura contendo óleo de mamona hidrolisado..... 159

RESUMO

Foram estudadas cinco lipases de microrganismos isolados no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Engenharia de Alimentos-FEA UNICAMP sendo caracterizadas quanto à capacidade de hidrolisar óleo de mamona e diferentes substratos tais como: óleo de milho, soja, oliva e girassol e liberar ácidos graxos livres como produtos finais de reação. A lipase de *Alcaligenes sp*, foi selecionada neste estudo como a enzima de melhor capacidade hidrolítica frente aos diversos substratos utilizados.

Os ácidos graxos liberados na reação de hidrólise, foram utilizados em meio de cultivo de fermentação submersa, composto por: 1% de glicose, 1% de autolisado de levedura como precursor na síntese de γ-decalactona. As amostras de meio de cultura foram analisadas através de extração líquido-líquido, utilizando acetato de etila como solvente de extração e padrão interno β-ionona e posterior análise em cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama–FID. Duas linhagens de levedura, *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans* foram selecionadas como potencialmente produtoras de γ-decalactona e estudos em relação aos parâmetros de produção de γ-decalactona como: temperatura, pH, substratos e composição do meio de cultura foram realizados.

A linhagem de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans*, apresentou máxima produção de γ- decalactona de 370 mg/L e 650 mg/L respectivamente, quando cultivadas em meio de cultura composto por óleo hidrolisado de mamona na concentração 5% e 1% de autolisado de levedura em 96 horas de cultivo a temperatura de 30°C, com agitação de 200 rpm em pH 6,0.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

SUMMARY

Five lipases obtained from microorganisms isolated in the Biochemistry Laboratory of the Food Engineering Faculty–FEA–UNICAMP were studied and characterized for their hydrolytic capacity using castor oil and different substrates such as: corn oil, soybean, olive and sunflower releasing of free fatty acids as the final reaction products.

The lipase from *Alcaligenes sp* was selected as the enzyme that showed the best hydrolytic capacity using the different substrates evaluated.

The fatty acids released by the hydrolytic reaction were used in a culture medium for submersed fermentation with the following composition: 1% glucose, 1% yeast as precursor for gamma-decalactone synthesis.

The culture medium samples were analysed by liquid-liquid extraction using ethyl acetate as the extraction solvent and β-ionone as the internal standard, followed by gas chromatography equipped with a flame ionization detector (FID).

Two yeast strains, *Geotrichum sp* and *Geotrichum fragans* were selected as potential gamma–decalactone producers and studies related to their production parameters performed such as: temperature, pH, substrate and culture medium composition.

The strain of *Geotrichum sp* and *Geotrichum fragans*, showed maximum production of gamma–decalactone of 370 mg/L and 650 mg/L respectively, when cultivated on a culture medium containing 5% hydrolyzed castor–oil and 1% autolyzed yeast after 96 hours of cultivation at 30°C, 200 rpm and pH 6.0.

1. INTRODUÇÃO

Lipases são enzimas que pertencem ao grupo das serinas hidrolases (E.C.3.1.1.3) e catalisam preferencialmente a hidrólise de acilgliceróis na interface óleo-água. As reações hidrolíticas catalisadas pelas lipases são essencialmente reversíveis e o potencial destas enzimas em produtos e processos, particularmente na indústria de laticínios e hidrólise de óleo e gorduras. Algumas lipases microbianas com alto grau de especificidade para as posições 1,3 do triglicerídeo podem ser utilizadas na clivagem total do triglicerídeo, liberando ácidos graxos e glicerol, como também em reações de interesterificação e síntese de ésteres. Lipases têm sido utilizadas como catalisadores em reações envolvendo hidroxiácidos e derivados, na produção de compostos como lactonas. Os hidroxiácidos são moléculas multifuncionais que possuem uma grande variedade de aplicações em cosméticos, lubrificantes podendo ser encontrados na natureza com ésteres cíclicos conhecidos como lactonas. As lactonas são moléculas derivadas de uma esterificação intramolecular entre os grupos hidroxi e carboxílicos do hidroxiácido e apresentam muito interesse para a indústria de alimentos, devido ao aroma de frutas como por exemplo, o de pêssego (gama–decalactona e gama-undecalactona). Estes compostos são largamente encontrados em mais de 120 produtos alimentícios incluindo frutas, vegetais e laticínios, o que intensifica a sua importância para a indústria de aromas. A crescente procura pelo mercado consumidor por produtos de origem natural em relação aos compostos sintetizados quimicamente e a falta de seletividade e estereoseletividade dos produtos sintetizados quimicamente têm resultado no uso de processos biotecnológicos visando a produção de bioprodutos como as lactonas, principalmente para a gama-decalactona devido aos aromas de pêssego e coco.

A utilização de microrganismos ou enzimas representam uma alternativa na obtenção de aromatizantes naturais. Recentes trabalhos mostram que a tecnologia de enzimas e microrganismos que crescem em culturas submersas podem produzir compostos voláteis complexos típicos de plantas tais como: terpenos, ésteres alifáticos, fenil propanóides e lactonas. Alguns fungos, em particular, possuem diversidade metabólica, como a síntese de novo ou biotransformação, dando possibilidade de obtenção de

compostos voláteis com aplicação industrial, como por exemplo, gama-decalactona. Muitas pesquisas têm descrito a bioconversão de ácidos graxos hidroxilados como o ácido ricinoléico (ácido 12-hidroxi-9-octadecenóico), presente em cerca de 90% do óleo de mamona (*Ricinus comunis*) em gama–decalactona (4-decanolide) ou delta decalactona (5-decanolide).

A exploração da via biossintética microbiana na produção de aromas naturais têm sido realizada por ser de grande interesse industrial e econômico.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

I- Estudar a capacidade das lipases microbianas, isoladas no Laboratório de Bioquímica de Alimentos da FEA–UNICAMP, em hidolisar diferentes óleos vegetais e liberar ácidos graxos como produtos finais de reação.

II- Utilização do ácido graxo liberado no sistema de reação enzimática como precursor em fermentação submersa, na produção de gama-decalactona.

III- Extração e Identificação da lactonas produzidas e estudos de parâmetros de produção como: pH do meio de cultura, tempo de fermentação, composição do meio de cultura e outros que afetam a produção de gama-decalactona.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Considerações Gerais sobre Lipases

As lipases são enzimas responsáveis pela hidrólise de acilgliceróis; no entanto, um número de ésteres de alto e baixo peso molecular, tiol-ésteres, amidos, ésteres polióis também podem ser utilizados como substratos por esse grupo de enzimas. Lipases podem ser capazes de catalisar a reação reversa de síntese com eficiência. Segundo a revisão publicada por GANDHI, 1997, as duas principais categorias de reações as quais as lipases podem catalisar são:

1) **Hidrólise**

$RCOOR' + H_2O \Leftrightarrow RCOOH + R'OH$

2) **Síntese**

Esterificação

$RCOOH + R'OH \Leftrightarrow RCOOR' + H_20$

Interesterificação

$RCOOR' + R"COOR* \Leftrightarrow RCOOR* + R"COOR'$

Alcoólise

$RCOOR' + R"OH \Leftrightarrow RCOOR" + R'OH$

Acidólise

$RCOOR' + R"COOH \Leftrightarrow R"COOR' + RCOOH$

As reações de interesterificação, alcoólise e acidólise estão agrupadas em um único termo denominado transesterificação. A maioria das aplicações potenciais das lipases está relacionada com a área de modificação de óleos e gorduras usando reações químicas. Um processo de importância industrial é a hidrólise de óleos vegetais como óleo de oliva ou coco para a produção de ácidos graxos e glicerol de larga aplicação especialmente em sabão e detergentes, cosméticos, farmacêutica e alimentos. A produção é fisico–química e envolve pressão de 3000 – 5000 KN/m2 e temperatura de 250°C ou mais. O processo convencional envolve um alto consumo de energia e induz a uma variedade de reações indesejáveis, como a polimerização de ácidos graxos insaturados e produção de cetonas e hidrocarbonetos e alterações na cor e odor do produto final. Por outro lado, os processos envolvendo enzimas não exigem pressão, a temperatura de reação varia de 40 a 60°C, baixo consumo de energia e em geral causam baixo impacto ambiental (FREITAS *et al*, 1996). Os produtos liberados deste bioprocesso apresentam melhores características de cor e odor, apresentando maior grau de pureza em relação àqueles produzidos por processo convencional. A baixa temperatura empregada neste processo envolve mínima degradação. Na reação química de esterificação, cadeias médias de triglicerídeos são manufaturadas por esterificação de ácido graxo com glicerol a altas temperaturas (200–250°C) e pressão na presença de catalisadores inorgânicos. Esta reação química é lenta, não seletiva e consome muita energia. O produto obtido necessita ser purificado por lavagem com álcali, destilação molecular, ultrafiltração e tratamento com carvão ativado.

Aplicações das lipases

As lipases compreendem atualmente um grupo de enzimas com grande aplicação industrial. Podem ser utilizadas na produção de ácidos graxos, biosurfactantes, como princípio ativo em formulações detergentes, compostos de aromas, ésteres de aroma, ésteres e poliésteres, gorduras biomodificadas e na resolução de misturas racêmicas.

3.2 Estudos realizados utilizando lipases microbianas

YAMAMOTO *et al* (1988) estudaram a purificação e algumas propriedades de lipase de *Pseudomonas sp*, uma lipase que hidrolisa óleo de mamona como substrato. Neste experimento, cerca de 500 linhagens de bactérias foram isoladas do solo e a melhor linhagem produtora de lipase foi identificada quanto às características microbiológicas como pertencente ao gênero *Pseudomonas sp*. A lipase bacteriana foi purificada por fracionamento em sulfato de amônio e cromatografia em coluna DEAE-celulose e DEAE–Toyopearl 650 M. A enzima foi purificada 400 vezes com uma recuperação de 13%. A enzima purificada apresentou peso de 30.000 Dalton em eletroforese em gel SDS–PAGE. A temperatura e pH ótimos da atividade hidrolítica da lipase na emulsão de óleo de oliva e álcool polivinílico foram de 60°C e 7,0 respectivamente. A enzima apresentou estabilidade térmica nas temperaturas de 25–35°C em pH 7,0 por 30 minutos e também estabilidade na faixa de pH situada entre 9,0 e 10,0 a 4°C por 22 horas. A atividade foi inibida na presença de Fe^{+3}, Hg^{+2}, p-cloromercuribenzoato (pCMB) e surfactantes aniônicos e sais de bile. A lipase de *Pseudomonas sp* hidrolisou eficientemente os óleos de oliva (100%), de algodão (108%), de milho (104%) e de mamona (107%).

Uma nova enzima que hidrolisa mono e diacilglicerol produzida por *Penicillium camembertii* foi isolada e estudada quanto as suas características bioquímicas por YAMAGUCHI & MASE (1991). A lipase extracelular de *Penicillium camembertii* foi separada em 2 frações (A e B) com seus pesos moleculares de 37.000 e 39.000 Dalton respectivamente. A composição aminoacídica e a sequência terminal foram semelhantes. A lipase B, a maior fração encontrada, foi purificada aproximadamente 210 vezes com uma recuperação de 2,6%. Foi verificado que a lipase B foi específica aos substratos mono e diacilglicerol e hidrolisou mais eficientemente monoacilgliceróis de cadeia longa. Triglicerídeos foram completamente inertes como substratos para estas enzimas. Os autores observaram que no curso da hidrólise, a lipase B clivou preferencialmente a posição α do monoacilglicerol. Os íons Fe^{+3} e Hg^{+2} inibiram significativamente a lipase de *Penicillium camembertii* U-150.

ANTCZAK *et al.* (1991) investigaram a lactonização enzimática dos ácidos15–hidroxipentadecanóico e 16-hidroxihexanóico para lactonas macrocíclicas. Lactonas macrocíclicas C_{14}-C_{16} são compostos aromáticos de fragrâncias almiscaradas. Preparações enzimáticas de *Mucor javanicus L46*, *Mucor racemosus L45*, *Candida cylindracea* foram utilizadas. O sistema de reação para a síntese de lactonas em microreator hermético foi composto de um mmol de ácido ω-hidroxicarboxílico, 32 mL de solvente éter de petróleo, 640 mg ou 5 mL de preparação enzimática. O sistema de reação foi incubado a 20°C–100°C com agitação por 1 a 120 horas. A produção da monolactona obtida foi expressa em milimoles de monolactona sintetizada em 1 hora utilizando 1 mg de lipase. A monolactona produzida foi determinada quantitativamente por cromatografia gasosa. A análise quantitativa das oligolactonas foi realizada através de cromatografia em camada delgada (CCD) com sistema de eluição composto por diclorometano/etanol (20: 0.1, v/v). Dentre as preparações enzimáticas, Lipozyme IM 20 e enzimas de *Mucor javanicus L46 e Mucor racemosus L45* foram hábeis em catalisar a lactonização do ácido15-hidroxipentadecanóico e 16-hidroxihexadecanóico.

MUKESH *et al* (1993) realizaram estudos envolvendo a transesterificação de óleo de mamona catalisada por lipase, utilizando n-butanol no sistema de reação, obtendo como produtos mono e diglicerídeos e butil–ésteres. Foi verificado nesse experimento, que n-butanol teve efeito inibidor na reação e que a quantidade de solvente no sistema de reação influenciou a taxa da reação e distribuição dos produtos, porém com o aumento da taxa de reação e alteração na distribuição dos produtos.

Estudos de transesterificação de palma oleína utilizando lipases não específicas e lipases específicas de fonte microbianas foram realizados por GHAZALI *et al.* (1995). As enzimas foram inicialmente imobilizadas em Celite, liofilizadas por 4 horas e então adicionadas ao sistema de reação composto de 10% (v/v) de palma-oleína em água saturada com hexano. O perfil catalítico das enzimas na reação de transesterificação foi acompanhado através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e formação de ácidos graxos livres através de titulação. Os estudos com lipases de *Candida* rugosa mostraram um decréscimo na reação de hidrólise, em contrapartida, o processo de

transesterificação resultou na formação de PPP, um triglicerídeo não detectado em óleo e um aumento na concentração de OOO (1,3 – 2,1 vezes), OOL (1,7 – 4,5 vezes) e OLL (1,7 – 4,3 vezes), onde P, O e L são os ácidos palmítico, oléico e linoléico respectivamente.

FU *et al.* (1995) estudaram a hidrólise de óleos e gorduras por lipase de *Aspergillus sp*. Os autores obtiveram porcentagem de hidrólise de 98% para o substrato óleo de oliva, 68% para o substrato óleo de soja e 26,8% para os substratos óleo de palma e óleo de coco em 24 horas de reação. Os sistemas de reação contendo os triglicerídeos foi incubado a 37°C em pH 7,0. A enzima foi ativada por íons de Ca^{2+}, mas inativada por solventes orgânicos como propanona e isopropanol.

A síntese de monoésteres de propileno glicol derivados dos ácidos docosahexanóicos e eicosapentadenóico através de reação catalisada por lipases em solventes orgânicos foi investigada por LIU & SHAW (1995). Estes ésteres foram sintetizados enzimáticamente devido aos problemas associados com o processamento químico. Os produtos da reação foram analisados por cromatografia gasosa. A lipase de *Mucor miehei* foi a melhor enzima para síntese de propileno glico monoéster de EPA e DHA entre as nove linhagens testadas. A produção de monoéster foi também afetada pela temperatura, presença de solvente hidrofóbico, concentração de ácido graxo/propileno glicol e tempo de reação. A produção de PGMDHA e PGMEPA com 50 mM de ácido graxo e 225 mM de propileno glicol como substrato em 1 mL de solução de solvente (hexano/ álcool butílico na proporção 9:1 (v/v)), catalisada por Lipozyme IM-20 (50 mg) a 40°C por 24 horas foi de 47 e 49 mM respectivamente. A síntese de PGM através de métodos químicos como a esterificação de propileno glicol com ácidos graxos na presença de catalisador alcalino, resulta usualmente em uma mistura complexa. A conversão catalisada por enzimas é mais eficiente e seletiva.

HAYES *et al* (1996) estudaram a atividade catalítica de lipases na hidrólise de ácidos graxos hidroxilados (HFA). Os ácidos graxos hidroxilados são derivados de fontes naturais, incluindo óleo de plantas e microrganismos, podendo ser utilizados em cosméticos, lubrificantes, em tintas para revestimento e na indústria de alimentos. Lipases

podem ser empregadas para catalisar reações envolvendo hidroxiácidos na formação de compostos denominados estolides e lactonas. A formação de estolides ou lactonas é mais dependente da posição do grupo hidroxi do que do tamanho da cadeia e a concentração do hidroxiácido. Lipases de *Pseudomonas sp* e lipase de pâncreas de porco (PPL) 1,3 específicas são largamente empregadas para catalisar a formação de lactonas opticamente puras, enquanto lipases que não apresentam seletividade posicional catalisam melhor a formação de estolides.

Os estudos de localização e regulação da produção de lipases por linhagens de *Aspergillus niger* foi realizado por MACRIS *et al* (1996). A linhagem de *Aspergillus niger* produziu lipase extracelular e com alta produtividade nas condições ótimas de cultivo. A biossíntese de novo da lipase ocorreu somente na presença de lipídios e foi completamente suprimida na presença de glucose e glicerol no meio de cultura. O sistema de reação de hidrólise foi composto por solução de substrato contendo 7 mL tampão fosfato de potássio 200 mM pH 7; 0,5 mL de NaCl 3 M; 0,5 mL de $CaCl_2$ 0,075 M; 1,7 g de trioleína e 0,5 g de goma arábica emulsificados por sonicação. Para 0,5 mL da solução de substrato foi adicionado 0,05 mL da enzima e o sistema de reação foi incubado por 30 minutos em banho termostatizado a 25°C. A reação foi paralisada pela adição de 1,2 mL de etanol. Os produtos da reação, ácido oléico e glicerol, apresentaram diferentes formas de inibição durante a hidrólise de trioleína. A enzima exibiu alta especificidade contra triglicerídeos de cadeia média e para ácidos graxos insaturados com dupla ligação na cadeia carbônica. A enzima foi estável na presença de solventes orgânicos como propanol, acetona, etanol, 2-propanol ou butanol.

XIA & NNANNA em 1996, estudaram a atividade e estabilidade da lipase de *Penicillium cyclopium* em soluções surfactantes. A atividade e estabilidade da lipase alcalina de *Penicillium cyclopium var. album* (PG 37) foram estudadas em soluções surfactantes como, por exemplo,surfactantes aniônicos dodecil sulfato de sódio (Na $C_{12}SO_4^-$), alquibenzeno sulfato ($C_{12}OSO_3^-$) e $C_{11}COO^-$ (laurato) e quatro surfactantes não iônicos de C_{12}-C_{15} álcoois graxos polioxetilenados (AEO_3, AEO_5, AEO_7 e AEO_9). A atividade lipolítica da enzima foi estimulada quando a variação da concentração de dodecil

sulfato de sódio e laurato esteve na faixa entre 3,2 – 40 μM, no entanto, na concentração de 5,5 μM, linear alquil-benzeno sulfonato inibiu a atividade lipolítica de PG 37. A lipase PG 37 apresentou estabilidade na atividade lipolítica quando a concentração dos surfactantes não iônicos como AEO_5 e AEO_7 variou de 0,25–20 mM. A presença de soluções detergentes no meio promoveu um decréscimo na atividade lipolítica.

OOSTERON *et al* (1996), estudaram a acilação regioseletiva de dissacarídeos em álcool terc–butílico catalisada por lipase de *Candida antartica*. A acilação de vários dissacarídeos em etil butanoato e etil decanoato foi catalisada por lipase de *Candida antartica* em álcool ter–butílico nas faixas de temperaturas entre 40 e 82°C. A variação da atividade de vários dissacarídeos foi diretamente relativa a sua solubilidade. Os produtos primários formam monoésteres derivados da acilação dos grupos do álcool primários. Uma alta conversão de diésteres foi obtida e a variação na formação de diéster para monoéster foi marcadamente dependente da estrutura do dissacarídeo. O sistema de reação contendo o dissacarídeo maltose com etil decanoato em álcool terc-butílico produziu 6–monododecanoato com alta produtividade, no entanto, em sistema de reação contendo trealose, obteve-se a produção de 6,6' diéster. A acilação de dissacarídeo menos solúveis como sacarose e lactose foi muito baixa, mas uma produção de 37% na taxa de conversão de sacarose foi observada após tempo prolongado de reação de 168 horas. Várias lipases e proteases foram testadas, mas a lipase de *C. antartica* foi a única lipase que catalisou com eficiência a acilação de sacarose em álcool terc-butílico. É de grande interesse a produção de ésteres de ácidos graxos. Os ésteres graxos de dissacarídeos apresentam várias aplicações como, por exemplo, α,α-6,6' trealose–dialcanoato apresentam atividade anti–tumoral e antibacteriana e ésteres de ácidos graxos de sacarose são utilizados como detergentes e aditivos em gêneros alimentícios por suas propriedades emulsificantes.

SCHUEPP *et al* (1997) estudaram a produção, a purificação parcial e a caracterização de endolipases e exolipases produzidas por linhagem de *Pseudomonas fragi* CRDA 037. As lipases extracelulares e intracelulares foram obtidas utilizando meio de soro de leite, sendo parcialmente purificadas através da precipitação com sulfato de amônio nas concentrações de 20–40% de saturação para exolipases e 20–60% de saturação para as

endolipases. As frações precipitadas foram coletadas e solubilizadas em solução tampão fosfato 0,05 M pH 7,0, dialisadas e liofilizadas. A eletroforese em gel de poliacrilamida (PEG) para a exolipase apresentou uma única fração com peso molecular de 25,5 kDA, enquanto que a endolipase apresentou 3 frações com pesos moleculares de 35,5, 49 e 70 kDA. Os valores de pH ótimo para ação hidrolítica das exo e endolipases foram de 8,75 e 9,0 respectivamente. A especificidade em relação ao substrato foi determinada utilizando trioleína, tributirina, trimistirina e triacetina. A lipase extracelular e endolipase demonstraram alta especificidade para trimistirina com valor de K_m de 5,11 e 3,24 mM respectivamente. Reagentes químicos como desoxicolato de sódio, cloreto férrico e N-bromosuccinimida e ácido 2-nitrobenzóico apresentaram efeitos inibidores para as lipases extracelulares e endocelulares de *Pseudomonas fragi* CRDA 037.

CHEN *et al* (1998) estudaram as condições de cultivo para a produção da lipase extracelular da linhagem bacteriana do gênero *Acinetobacter radioresistens*. Para a produção da lipase foi utilizado meio basal composto por 10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 10 g de NaCl e 1 g de NH_4Cl. Durante a fermentação, o meio de cultura foi suplementado com concentrações variadas de óleo de oliva e n-hexadecano. A enzima apresentou atividade ótima em pH 10 e uma estabilidade na faixa de 6-10, indicando um grande potencial para aplicação em sistemas detergentes. A temperatura e pH ótimo para a fermentação, formação de protease, estabilidade e reatividade da lipase foram de 30°C e 7,0 respectivamente. Alta produção de lipase pode ser obtida durante o tempo de cultivo prolongado na presença de n-hexadecano. Entretanto, a produção da lipase diminuiu com o aumento da concentração do óleo de oliva. Um aumento na variação da formação de lipase na presença de óleo de oliva e n-hexadecano foi observado. Este aumento segundo os autores pode ser devido à emulsificação de n-hexadecano pelos produtos; mono e diglicerídeos; liberados através da reação de hidrólise do óleo de oliva.

A produção de lipídios estruturados através da reação de interesterificação catalisadas por lipases em reatores equipados com membranas de ultrafiltração foi estudada por Xu *et al* (2000). Neste estudo, foram utilizadas membranas de ultrafiltração na produção de lipídios estruturados na reação entre triacilgliceróis de cadeia média (MCT) e

n-3 ácidos graxos polinsaturados presentes em óleo de peixe. A reação foi catalisada por Lipozyme IM. A incorporação de ácidos graxos polinsaturados em MCT aumentou cerca de 15% após 80 horas de reação com separação simultânea do ácido graxo liberado comparado com o sistema de reação de controle sem a membrana de ultrafiltração.

BRAUN *et al* (2001) estudaram a atividade de lipases de bactérias em temperaturas de refrigeração. Duas linhagens de *Pseudomonas aeruginosa*, duas linhagens de *Pseudomonas fluorences*, três linhagens de *Aeromonas hydrofila*, uma linhagem de *Aeromonas caviae*, duas linhagens de *Staphylococcus aureus* e duas linhagens de *Serratia marcescens* foram testadas quanto à sua habilidade de hidrolisar tributirina em temperaturas na faixa de –2°C a + 7°C por um período de 38 dias utilizando um método modificado de ágar difusão. A hidrólise foi observada em todas as temperaturas investigadas, com exceção para a lipase de *Serratia marcescens* a –2°C. Um decréscimo na temperatura de armazenagem foi associada com uma redução significativa na atividade enzimática mas não foi suficiente para inativar a enzima. Os autores concluíram neste experimento que durante o armazenamento de produtos em refrigeração, a atividade lipolítica pode ocorrer porque a síntese de enzimas lipolíticas é realizada antes do resfriamento iniciar.

KRISHNA *et al* (2001) estudaram a síntese de isoamil butirato por lipase de *Rhizomucor miehei*, Lipozyme IM-20, através da esterificação do ácido isobutírico com o álcool isoamílico. Para este estudo, 04 variáveis foram empregadas: concentração enzima/substrato, concentração do substrato, tempo de reação e temperatura. A porcentagem de conversão mais eficiente foi quando a faixa de variação da concentração de ácido butírico foi de 0,5-2,5 e quando uma pequena variação E/S (5 g/mol) foi empregada e em temperaturas variando de 30–40°C. O tempo de reação apresentou um efeito insignificante na produção do éster. As condições ótimas encontradas para a produção máxima de éster (2,2 M) foram: 19,6 g/mol; concentração do substrato, 2,5 M; tempo de reação de 18 horas e temperatura de 26,5°C.

Estudos sobre a utilização de lipases em resoluções racêmicas foram relatados em revisão realizada por MURALIDHAR *et al* (2001). Segundo os autores, a maior dificuldade na síntese de compostos químicos é a produção de compostos opticamente ativos. A importância dessa área é explicada pelo aumento de compostos quirais dos quais somente um dos enantiômeros é biologicamente ativa. A maioria desses compostos é utilizada como racematos embora a atividade biológica esteja presente em apenas um dos enantiômeros. Lipases são enzimas capazes de realizar a resolução de misturas racêmicas para compostos biologicamente ativos devido a sua conformação funcional. O centro ativo desta enzima constitui um ambiente distinto que é capaz de distinguir entre os enantiômeros. As lipases podem catalisar reações pertencentes a três categorias denominadas hidrólises assimétricas, esterificação assimétrica e transesterificação assimétrica.

A lipase extracelular da linhagem termofílica identificada como *Bacillus sp.* RSJ–1 foi estudada por SHARMA *et al* (2002). A lipase extracelular foi purificada através do fracionamento com sulfato de amônio, diálise e cromatografia de troca iônica em Q-Sepharose e filtração em gel Sephacril S-200. A enzima foi purificada 201 vezes com 19,7% de recuperação. O peso molecular estimado em 37 kDa foi determinado por eletroforese em gel de SDS-PAGE.A enzima purificada exibiu atividade máxima de 50°C e pH ótimo situado na faixa entre 8,0 e 9,0. A lipase mostrou-se estável a 50°C por 60 minutos, reteve mais de 90% de atividade após tratamento a 50°C por 120 minutos e permaneceu estável na faixa de pH entre 8,0 e 9,0 por 120 minutos. Um aumento da atividade enzimática foi observado na presença de íons como Ca^{2+}, Na^{+}, Mg^{2+} e Ba^{2+}, porém, a enzima foi inibida na presença de íons Cs^{+}, K^{+}, Co^{2+} e Zn^{2+}.

ABDOU (2003) estudou a purificação e a caracterização parcial da lipase de *Serratia marcescens*. A lipase extracelular foi obtida através do cultivo do microrganismo em meio contendo caldo nutriente e soro de leite. O sobrenadante do meio de cultivo foi utilizado como preparação enzimática bruta. A lipase foi purificada por cromatografia de troca iônica e filtração em gel. O peso molecular da lipase purificada foi estimado em 52 kDA através de eletroforese em gel de SDS-PAGE. A lipase purificada exibiu pH ótimo na faixa entre 8,0 e 9,0. A enzima mostrou-se estável em pH 8,0 perdendo 30% da atividade

quando incubada em pH 6,6 por 24 horas a 4°C. A temperatura ótima da lipase foi de 37°C, porém, a atividade também foi observada a 5°C. A lipase purificada de *Serratia marcescens* reteve apenas 15% da atividade quando incubada a 80°C e foi completamente inativada após aquecimento a 90°C por 5 minutos. A constante de Michaelis-Menten da lipase para o substrato tributirina foi de 1,35 mM.

3.3 Considerações Gerais sobre Aromas

Cerca de 84% de todos os compostos de aromas existentes são produzidos por síntese química. Os obstáculos da síntese química desses aromas incluem a formação de uma mistura racêmica e o aumento da preferência pelos consumidores por produtos naturais. Estes fatores contribuíram para o aumento do interesse das companhias de aroma no desenvolvimento de aromas de origem biológica.

Compostos de aroma e fragrâncias são extremamente importantes para as indústrias de alimentos, cosméticas e farmacêuticas. Mundialmente estes compostos representam um faturamento de quase 7 bilhões U$/ ano (JANSSENS *et al*, 1992).

Por muitos anos, as plantas foram utilizadas como única fonte de compostos de aroma e a maioria destes compostos era extraída a partir dos óleos essenciais. Porém, os componentes sensorialmente ativos, freqüentemente estão presentes em pequenas quantidades ou quantidades traços, o que torna o seu isolamento difícil. Por outro lado, muitos óleos essenciais e compostos de aroma na sua forma pura são avaliados a preço de mais de 5.000U$/kg. Um exemplo significativo é a gama–decalactona (4-decanolide), composto característico do aroma de pêssego que na sua forma sintética custa 150 U$/kg, enquanto que a mesma substância extraída de fonte natural têm o seu valor estimado em 6.000U$ / kg (JANSSENS *et al*, 1992).

A desvantagem da utilização de plantas como única fonte de extração de compostos de aroma é a dependência de fatores climáticos e o risco de exposição a fitopatógenos, os quais são de difícil controle (BELIN *et al*, 1992). Alternativas promissoras para a produção de compostos de aroma são os avanços de métodos biotecnológicos e o uso de biocatálise para a sua síntese: células vegetais e culturas de tecidos, microrganismos e enzimas (WELSH *et al*, 1989; HERRÁIZ, 1990; BELIN *et al*, 1992; VANDAMME *et al*, 2002).

3.4 Fatores que Influenciam a Aplicação Industrial de Aromas Obtidos por Biotecnologia

Muitos bioprocessos envolvendo microrganismos têm sido descritos na produção de aromas de interesse, no entanto, o número de aplicações industriais ainda é limitado. Isto é devido a fatores tais como:

1) Pequena produção do composto pelo microrganismo, geralmente em mg/mL o que resulta na baixa recuperação do produto final após a extração e um alto custo do processo. No entanto, este fator pode ser compensado pelo fato que o preço de mercado para os aromas naturais pode ser de 10 a 100 vezes maior comparado aos aromas sintéticos (HERRÁIZ, 1990; JANSSENS *et al*, 1992).

2) A volatilidade e a baixa solubilidade em água dos compostos de aroma produzidos sendo necessária a concentração do produto final no meio fermentativo até o limite em que este composto não cause a inibição e toxicidade à célula microbiana. Neste caso, a extração contínua com solvente apolar pode ser realizada. Outro método que permite a remoção contínua do produto final apolar é o uso de resinas apolares como Amberlite XAD2 (BELIN *et al*, 1992).

3) A comercialização destes compostos de aromas produzidos por via biotecnológica necessita de regulamentação legal. Nos E.U.A a regulamentação legal para novos produtos é de responsabilidade do Food and Drug Administration (FDA). Compostos podem receber o status de GRAS (Geralmente Reconhecidos como Seguros) se forem produzidos por processos microbianos ou enzimáticos.

De acordo com HERRÁIZ (1990), os fatores que justificam a necessidade de obtenção de aromas através de processos biotecnológicos são: 1) Maior conhecimento do metabolismo microbiano; 2) Incremento no rendimento do produto obtido; 3) Desenvolvimento de processos de recuperação mais eficazes; 4) Seleção entre substrato e microrganismos de baixo custo.

3.5 Produção de Aromas

Aromas e fragrâncias químicas, utilizadas em alimentos, cosméticos e indústria de alimentos formam uma área de produtos de grande interesse comercial.

Enquanto a maioria das fragrâncias produzidas atualmente é obtida por síntese química, uma pequena quantidade de produtos é ainda obtida por extração vegetal. A produção agrícola de fragrâncias tem uma importante vantagem devido ao uso de recursos naturais renováveis. No entanto, também podem apresentar desvantagem como: **1)** a variação sazonal; **2)** os produtos podem variar em qualidade e consistência; **3)** o suplemento pode ser dependente de fatores, político e econômico (SCHINDLER & SCHIMID, 1982; JANSSENS *et al*, 1992).

O uso de técnicas de biocatálise na produção de compostos de aromas naturais oferece uma interessante alternativa para a síntese de fragrâncias por transformação estereoespecífica com qualidade e produtividade constante aliada ao aumento da procura pelo mercado consumidor por produtos naturais (WELSH *et al*.,1989; HERRÁIZ, 1990; JANSSENS *et al*, 1992). A maioria dos compostos de aromas foi identificada devido à introdução de várias técnicas instrumentais de análises em química orgânica como cromatografia gasosa e espectrometria de massas. A transformação microbiana de precursores em fragrâncias químicas e compostos de aromas como terpenos e lactonas têm sido objeto de intensas pesquisas porque os produtos obtidos são considerados naturais e devido ao grande interesse econômico em vários casos.

Lactonas estão associadas com aroma de frutas, coco, manteiga, doce e nozes. (MAGA, 1976; WANIKAWA *et al*, 2000), e devido a essa característica, podem ser utilizadas como aditivos em alimentos (MAGA, 1995; DUFOSSÉ *et al*, 1994). Estas moléculas estão presentes em diversos vegetais como pêssego, damasco, abacaxi, morango, nozes e tomate e em alimentos de origem animal como carne, leite e derivados (MAGA, 1976; SPENCER *et al*, 1978; DUFOSSÉ *et al*, 1994). São largamente produzidas quimicamente mas o uso de microrganismos pode ter algumas vantagens em comparação à síntese química, especialmente para lactonas quimicamente ativas (WELSH *et al*, 1989). A produção microbiana destas lactonas por síntese de novo ou biotransformação é de grande interesse alternativo à síntese química. As diferenças estruturais (número de carbono no

anel e na cadeia lateral, insaturação e quiralidade) influenciam na qualidade aromática da molécula (PITTET & KLAIBER, 1975; MAGA, 1976; MONSANDL & GÜNTHER, 1989; DUFOSSÉ *et al*, 1994). A tabela 1 ilustra aa estruturas das principais lactonas. As tabelas 2 e 3 mostram as lactonas presentes em alimentos e o consumo mundial de lactonas (kg/ano) respectivamente.

Tabela 1. **Estrutura, fórmula molecular e característica de aroma das lactonas.**

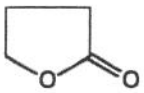
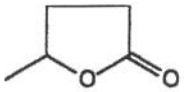
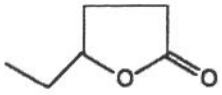
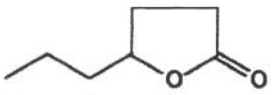
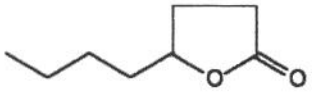
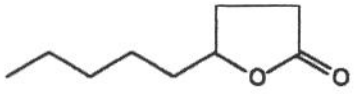
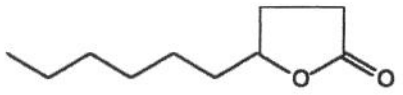
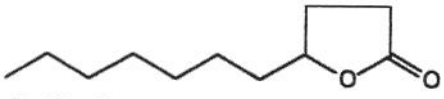
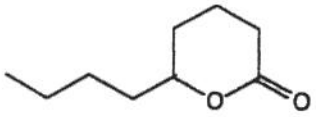
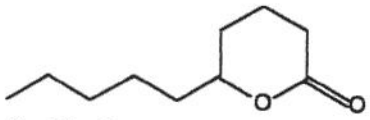
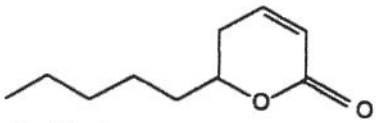
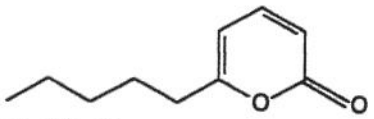
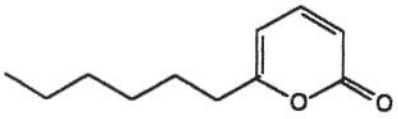
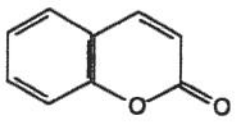
Estrutura e fórmula molecular	Nome usual*	Características de aroma
 $C_4H_6O_2$	Gama-butirolactona* 4-butanolide	Manteiga (Maga,1976)
 $C_5H_8O_2$	Gama-pentalactona* 4-pentanolide	Herbáceo, doce (Dufossé, 1994)
 $C_6H_{10}O_2$	Gama-hexalactona* 4-hexanolide	Aroma de caramelo, doce, herbáceo (Maga, 1976)
 $C_7H_{12}O_2$	Gama-heptalactona* 4-heptanolide	Caramelo, herbáceo, malte (Maga, 1976)
 $C_8H_{14}O_2$	Gama-octalactona* 4-octanolide	Frutal, coco (Maga,1976)
 $C_9H_{16}O_2$	Gama-nonalactona	Creme, manteiga (Dufossé, 1994) Coco, pêssego (Maga, 1976)
 $C_{10}H_{18}O_2$	Gama-decalactona 4-decanolide	Pêssego, damasco (Maga, 1976, 1995)

Tabela 1. **Estrutura, fórmula molecular e características de aroma das lactonas (cont.)**

 $C_{11}H_{20}O_2$	Gama-undecalactona* "Aldeído C_{14}"	Pêssego (Maga, 1976)
 $C_9H_{16}O_2$	Delta-nonalactona*	Creme, manteiga (Pittet & Klaiber, 1975)
 $C_{10}H_{18}O_2$	Delta–decalactona* 5-decanolide	Pêssego, coco (Maga, 1976) Pêssego (Dufossé, 1994)
 $C_{10}H_{16}O_2$	2-deceno-δ-lactona*	Coco, manteiga (Dufossé, 1994)
 $C_{10}H_{14}O_2$	6-pentil-α-pirona*	Coco (Colins, 1972)
 $C_{11}H_{16}O_2$	6-hexil-α-pirona*	Doce, coco, aroma de champignon (Pittet & Klaiber, 1975)
 $C_9H_6O_2$	Coumarina*	Apimentado, verde (Dufossé, 1994)

Adaptado de Dufossé *et al*, 1994; MAGA, 1976

Tabela 2. **Lactonas presentes em Alimentos.**

Vegetais	Lactonas
Damasco	Gama-hexalactona
	Gama-octalactona
	Delta-octalactona
	Gama-decalactona
	Gama-dodecalactona
Pêssego	Gama-pentalactona
	Gama-hexalactona
	Gama-heptalactona
	Gama-octalactona
	Gama-nonalactona
	Gama-decalactona
	Gama-dodecalactona
	6-pentil-alfa-pirona
Abacaxi	Gama-butirolactona
	Gama-hexalactona
	Gama-Ocatalctona
	Delta-Octalactona
Morango	Gama-Hexalactona
	Delta-Heptalacatona
	Gama-Octalactona
	Delta-Octalactona
	Gama-Decalactona
Suco concentrado de laranja	Gama-Decalactona
Framboesa	Delta–lactona
Coco	Delta-decalactona
	Delta-Undecalactona
	Delta-ocatalactona

Tabela 2. **Lactonas presentes em alimentos (continuação).**

Bebidas	**Lactonas**
Café	Gama-butirolactona,
	Gama-pentalactona
Chá preto	Gama-butirolactona
	Gama-pentalactona
	Gama-hexalactona
	Gama-heptalactona
Vinho	Gama-butirolactona
Produtos lácteos	
Margarina	Delta-hexalactona
	Gama-octalactona
	Delta-ocatalcatona
	Gama-nonalactona
	Gama-decalactona
	Delta-decalactona
	Gama-undecalactona
	Gama-dodecalactona
Blue Cheese	Delta-octalactona
	Gama-decalactona
	Delta-decalactona
	Gama-dodecalactona
	Delta-dodecalactona
Cheddar	Delta-octalactona
	Gama-decalactona
	Delta-decalactona
	Gama-dodecalactona
	Delta-dodecalactona

Fonte: Adaptado de MAGA, 1976.

Tabela 3. **Consumo mundial de lactonas na forma nativa e sob a forma de aditivo (kg/ano).**

	Molécula	Forma nativa no alimento	Forma de aditivo
γ-Lactonas	γ- C4	44710	149
	γ-C5	34954	81
	γ-C6	829	104
	γ-C8	4438	770
	γ-C9	8537	3112
	γ-C10	3257	647
	γ-C11	57	3089
	γ-C12	609	385
δ-Lactonas	δ-C6	964	42
	δ-C8	1740	49
	δ-C9	17	23
	δ- C10	5619	4801
	δ-C11	138	616
	δ-C12	10200	5753
	δ-C14	8970	1

Fonte: DUFOSSÉ *et al*, 1994.

3.6 Produção de Lactonas por Microrganimos

3.6.1. Produção de Lactonas por Síntese de Novo

Alguns microrganismos são hábeis em sintetizar lactonas a partir de substrato simples como a glicose, como metabólitos secundários, os quais não são necessários para o desenvolvimento celular e são acumulados durante a fase de crescimento estacionário (COLLINS & HALIN, 1972; BERGER *et al*, 1987; BELIN *et al*, 1992). Aminoácidos como o ácido glutâmico, por exemplo, podem formar lactonas em bebidas como vinho (WURZ *et al*, 1988), mas a rota mais freqüente da síntese de lactonas envolve intermediários do metabolismo de lipídios devido à similaridade das lactonas com a estrutura dos ácidos graxos (DUFOSSÉ *et al*, 1994). As figuras 1 e 2 mostram a biossíntese de lactonas a partir de glicose e ácido glutâmico respectivamente. A tabela 4 ilustra exemplos de microrganismos produtores de lactona por síntese de novo.

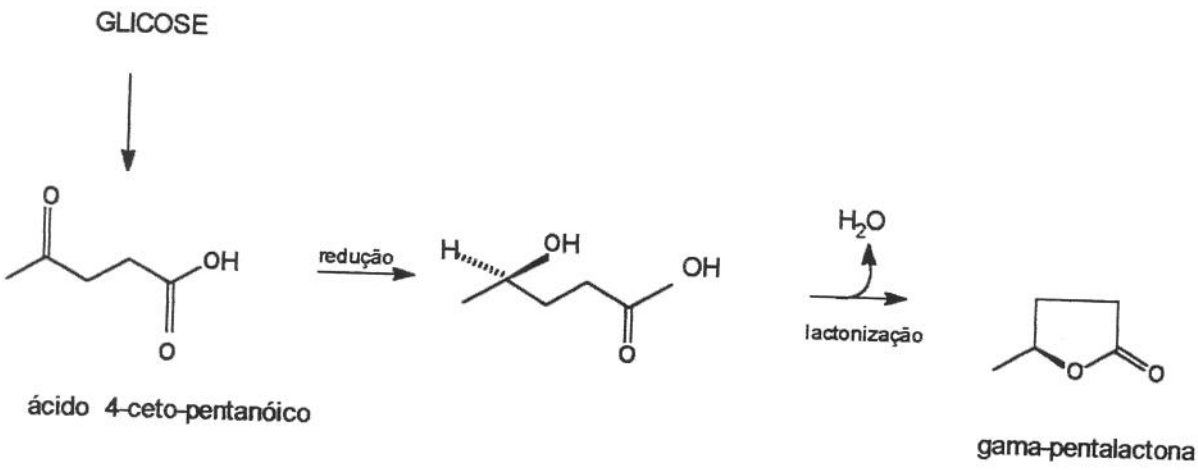


Figura 1. Biossíntese de gama-lactona utilizando glicose como substrato.
Fonte: DUFOSSÉ *et al.*, 1994.

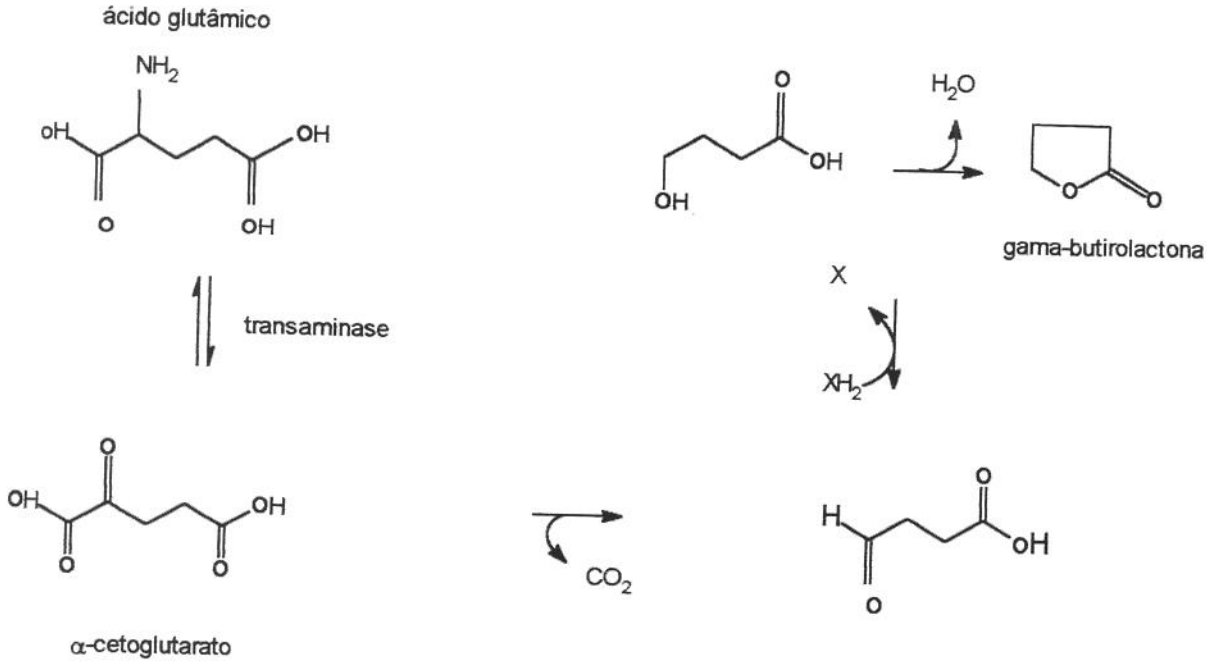


Figura 2. Biossíntese de gama-butirolactona a partir do ácido glutâmico.
Fonte: DUFOSSÉ *et al*, 1994.

Tabela 4. **Microrganismos produtores de lactonas por síntese de novo.**

Microrganismo	Produto	Concentração (mg/L)
Bjerkandera adusta	4-hexanolide	0.6
	4-octanolide	0.1
	4-decanolide	0.3
	5- hexanolide	3.2
	5-octanolide	0.3
	5-decanolide	0.1
Poria aurea	4-butanolide	0.03
	4-octanolide	0.09
	2-octen-4-olide	0.48
Tyromyces sambuceus	4-butanolide	0.03
	4-pentanolide	0.02
	4-octanolide	0.6
	4-decanolide	2.2
Polyporus durus	4-octanolide	100
	2-octen-4-olide	>100
Ischnoderma benzoinum	2-octen-4-olide	56

Fonte: (BELIN *et al*, 1992).

3.6.2 Síntese de Lactona por Biotransformação

Poucos estudos têm sido descritos em relação à via metabólica envolvida na formação de lactonas insaturadas, derivadas de ácidos graxos. Alguns ácidos graxos de cadeia longa (oléico, linoléico e ricinoléico) podem ser transformados em 6-pentil-α-pirona por linhagens de *Trichoderma*. Em estudos reportados por SERRANO-CARREON *et al* (1993), o ácido linoléico pode originar 6 pentil-α-pirona, uma lactona insaturada, sintetizada por fungos do gênero *Trichoderma* e fungos do gênero *Penicillium roqueforti* pode produzir lactonas insaturadas como cis-6-dodecen-4-olide através da bioconversão do ácido linoléico e 4-decanolide (gama-decalactona; lactona saturada) a partir do ácido oléico (CHARLIER & CROUZET, 1992). Precursores diretos de lactonas são os hidroxiácidos, estas moléculas podem ser sintetizadas por microrganismos a partir de ácidos graxos com ou sem um grupamento hidroxi ou cetona.

Hidroxiácidos naturais como o ácido ricinoléico, presente em cerca de 80% do óleo de mamona, podem ser transformados por microrganismos através da via da β-oxidação e convertido em γ-decalactona (ENDRIZZI *et al*, 1996). Linhagens de levedura do gênero *Candida* podem converter o ácido ricinoléico em gama-decalactona. A levedura pode lipolisar o óleo de mamona e liberar ácido ricinoléico e subseqüentemente metabolizar esse ácido pela via da β-oxidação e convertê-lo em ácido 4-hidroxidecanóico e finalmente em γ-decalactona (GATFIELD, 1998). A figura 3 ilustra a formação de gama e delta lactona a partir dos seus respectivos hidroxiácidos.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

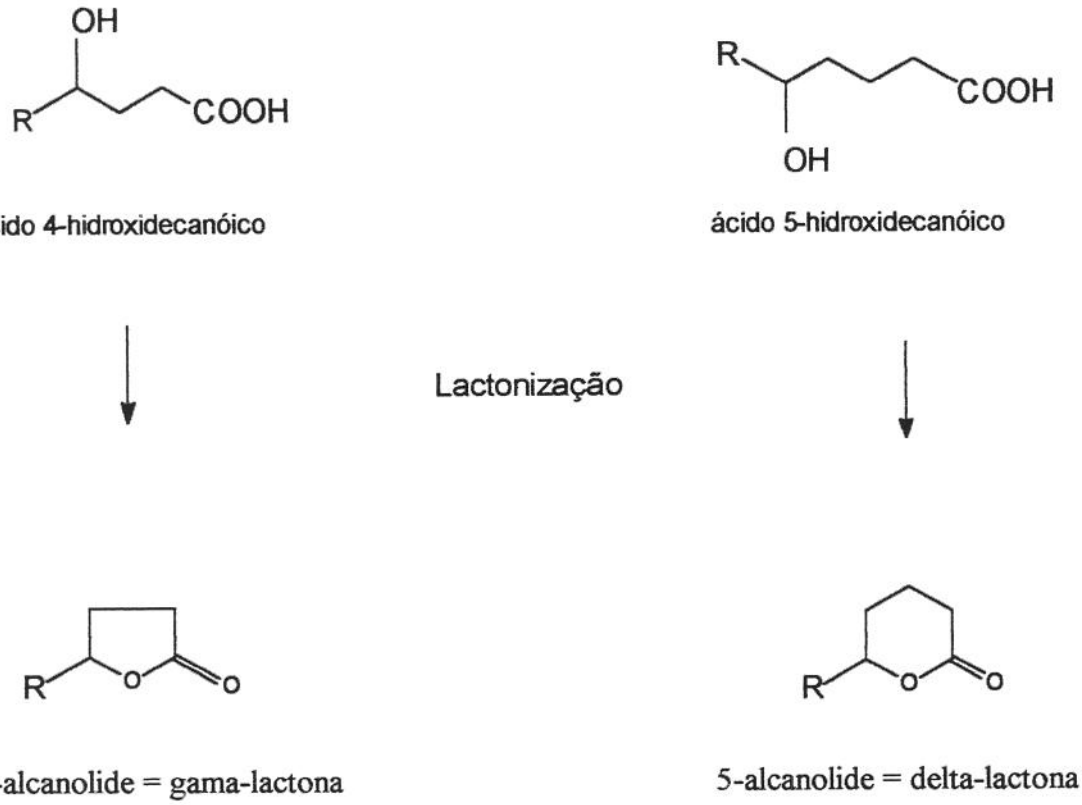


Figura 3: Estrutura de gama e delta-lactona a partir de hidroxiácidos graxos.
Fonte: ENDRIZZI *et al*, 1996.

β- oxidação

A β-oxidação é um sistema cíclico de oxidação de ácidos graxos na posição beta e consiste de quatro importantes reações: 1) **desidrogenação**, liberação de trans 2,3 enoil-CoA; 2) **hidratação** da insaturação, liberação de 3-hidroxiacil-CoA; 3) **oxidação**; formação de 3-cetoacil CoA ; 4) **liberação** de Acetil-CoA e acil-CoA sem 2 carbonos. A figura 4 ilustra o ciclo da β- oxidação.

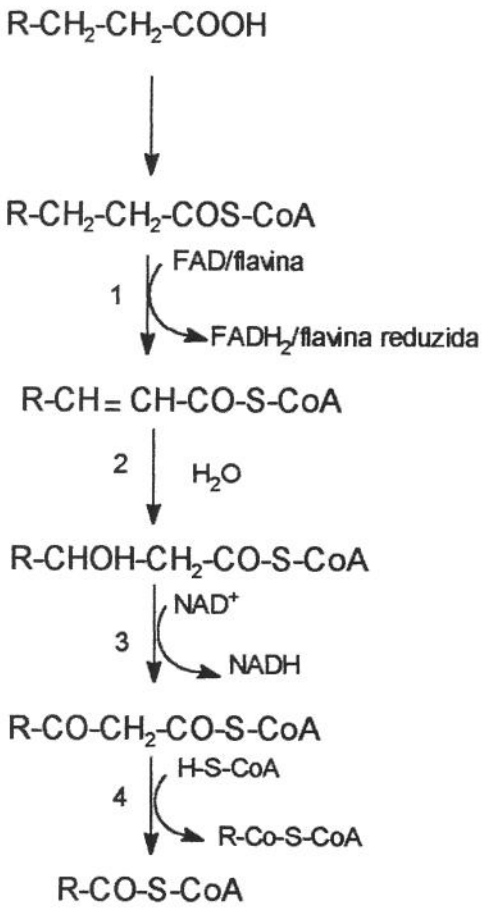


Figura 4. Ciclo da β-oxidação. Reações enzimáticas: 1. Acil–CoA-desidrogenase (mitocôndria) ou oxidase (em peroxissomos): 2. 2,3 enoil CoA hidrolase; 3. 3-hidroxiacil CoA-desidrogenase; 4. 3-oxoacil-CoA-tiolase.

Fonte: FERON *et al*, 1996.

Nas células eucarióticas, como dos fungos filamentosos e leveduras, dois compartimentos subcelulares, mitocôndrias e peroxissomos, são hábeis em realizar a β-oxidação de ácidos graxos. A figura 5 ilustra a produção de lactonas em compartimentos celulares das leveduras utilizando um hidroxiácido graxo como precursor.

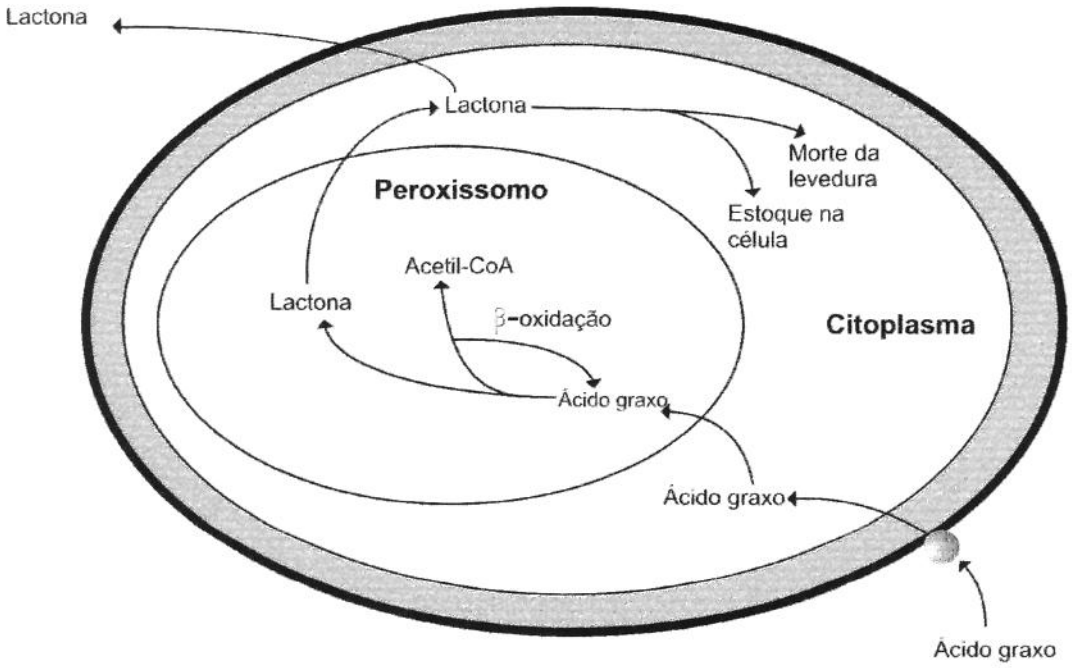


Figura 5. Esquema geral para a produção biotecnológica de lactona a partir de hidroxiácido graxo como precursor utilizando leveduras como biocatalisador.
Fonte: (FERON *et al*, 1996)

3.6.3 Estudos da Produção de Lactonas por Microrganismos

COLLINS & HALIN (1972) reportaram a produção de 6–pentil-α-pirona *Trichoderma viride,*um fungo obtido do solo capaz de produzir lactonas em meio de cultura padrão, como o ágar batata dextrosado (BDA) como fonte de carbono, desprovido de substratos especiais ou precursores. O composto volátil foi obtido por destilação do meio de cultura e continha acima de 90% de 6-pentil-α-pirona, composto responsável pelo aroma característico de coco.

TAHARA *et al* (1972) estudaram a produção de gama-decalactona por linhagem de *Sporobolomyces odorus* em meio de cultura sintético constituído por 10% de glicose, 0,3% de $MgSO_4$ $7.H_2O$, 0,1% de K_2HPO_4 e água deionizada. Os frascos contendo meio de cultura esterilizados foram inoculados com a linhagem de *Sporobolmyces odorus* e incubados por 5-6 dias a 25°C. Cerca de 15 litros do meio de cultura com aroma característico de pêssego foi centrifugado e extraído com éter dietílico purificado. O extrato etílico foi lavado com pequeno volume de 2% de solução de carbonato de sódio desidratado e sulfato de sódio anidro. O extrato foi evaporado para aproximadamente 20 mL do volume por destilação e concentrado para 0,5 mL com gás nitrogênio. A solução resultante foi analisada por CG em coluna de 1,5 m por 4,5 mm, 10% de PEG–polietileno glicol–20M com fase líquida de celite 545 AW (60-80) a 190°C. Na análise por CG, dois picos (I e II) foram isolados. O pico I, correspondente à gama-decalactona foi identificado através do tempo de retenção do composto autêntico e espectrometria de massas. O composto I apresentou o pico *m/e* 85, formado pela ruptura da ligação entre a cadeia lateral e o anel da molécula de gama-decalactona, sendo esta característica observada em gama-lactonas de cadeia alifáticas com cadeia carbônica entre C6-C8.

Os efeitos da fonte de carbono e fonte de nitrogênio na qualidade do aroma e crescimento de culturas de *Ceratocystis moniliformes* foram investigados por LANZA *et al* (1976). Experimentos preliminares demonstraram que o crescimento de *Ceratocystis moniliformes* em meio de cultura contendo dextrose-uréia foi mais rápido e esta cultura apresentou aroma predominante semelhante à banana. Quando carboidratos como

galactose, frutose, sacarose, xilose e ribose foram utilizados, uma variedade de aromas semelhantes a frutas foi obtida, porém nenhum aroma de frutas foi produzido quando a fonte de carbono utilizada foi o ácido oléico. A intensidade do aroma foi geralmente relacionada com o crescimento, com exceção de etanol e ácido palmítico, os quais produziram bom crescimento microbiano, mas não aroma intenso de frutas. A variação na fonte de nitrogênio também afetou a qualidade e a intensidade do aroma produzido. As fontes de nitrogênio isoleucina, leucina ou norleucina promoveram intenso aroma de banana similar ao aroma produzido quando uréia foi utilizada como fonte de nitrogênio. Aroma de abacaxi, limão, foi obtido quando a fonte de nitrogênio utilizada foi glicina e o aroma de batata foi encontrado quando a fonte de nitrogênio utilizada foi metionina. *C. moniliformes* apresentou bom crescimento em fonte inorgânica de nitrogênio tais como nitrato de sódio e sulfato de amônio, mas nenhum aroma foi produzido.

LABOWS *et al* (1979) estudaram a produção de gama-decalactona por leveduras do gênero *Pityrosporum*. O gênero *Pityrosporum* é compreendido por quatro espécies: *Pityrosporum ovale*, *Pityrosporum.orbiculare*, *Pityrosporum. canis* e *Pityrosporum pachydermatis*. *Pityrosporum ovale* e *Pityrosporum orbiculare* é encontrado na pele humana em regiões ricas em glândulas sebáceas como a face, pescoço e no couro cabeludo. Neste estudo, as linhagens do gênero *Pityrosporum* (*P. ovale*, linhagem ATCC 24047, 12078 e 14521, *P. pachydermatis*, ATCC 2022, *P. canis* ATCC 14522, *P. orbiculare* ISG 6331), *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula rubra* e *Torulopsis glabrata* produziram compostos voláteis em meio de cultura Saboraud–dextrose contendo 1% de Tween 80 e incubados a 37°C por 7 dias. *Pityrosporum ovale* também foi cultivado em meio de cultura composto por YNB (Yeast Nitrogen Base) com 1,5% de ágar suplementado com 1% de L-α-lecitina, 1% de ácido oléico, trioleína ou 1% de sebo humano. Alta produção de compostos voláteis foi obtida tanto no cultivo em meio de cultura sólido quanto em meio de cultura líquido. Os voláteis foram separados e identificados por CG/MS em coluna CG (30,5 m por 2mm) Pyrex e 20M Carbowax com temperatura programada de 70 a 210°C (4°C/min). As condições da análise dos voláteis por espectrometria de massas incluem as condições de voltagem de ionização de 70 eV, temperatura de 200°C e a temperatura de interface de CG foi de 260°C. Os componentes voláteis individuais foram identificados

pela comparação dos tempos de retenção dos etil–ésteres dos ácidos graxos e o tempo de retenção e dados do espectro de massas com padrões autênticos. Uma série homóloga de γ-lactonas foi obtida; γ-octalactona, γ-nonalactona, γ-decalactona, γ-undecalactona foram obtidas por *P. ovale* em meio de cultura YNB suplementado com lecitina. Todos os meios de cultura inoculados com linhagens de *Pityrosporum* produziram octa, nona e gama-decalactona. Lactonas foram produzidas na presença de ácido oléico, trioleína ou sebo humano. Os compostos voláteis isopentanol, hexanol, álcool benzílico e 2-feniletanol foram identificados nos meios de culturas inoculados com linhagens de *S. cerevisiae*, *Rhodotorula rubra*, *Candida albicans* e *Torulopsis glabrata*.

Em patente publicada em 1983, FARBOOD *et al* relatam a produção de gama–decalactona por linhagens de levedura do gênero *Candida* em meio de cultura contendo óleo de mamona como única fonte de carbono. O ácido graxo formado, 4-hidroxidecanóico, foi convertido em gama-decalactona através de etapas essenciais no processo de conversão como o aquecimento à ebulição e a acidificação do meio de cultura até pH 1,5 por um período de 10 minutos. A lactona produzida foi isolada através de extração por solvente orgânico. Uma produção de 5 g/L de gama-decalactona foi obtida após a extração.

YONG et *al* (1985), estudaram o efeito da fonte de nitrogênio na produção de aroma pela linhagem de *Trichoderma viride*. O composto de aroma característico de coco, uma lactona saturada identificada como 6- pentil-α-pirona foi obtido. A variação da fonte de nitrogênio afetou a quantidade da lactona produzida, mas a qualidade do aroma produzido não foi alterado. Os meios de cultura contendo aminoácidos como fonte de nitrogênio: histidina, isoleucina, metionina e triptofano não produziram o aroma de coco, enquanto que nos meios de cultura contendo fenilalanina foi observado o aroma característico de coco com uma leve nota de mel.

SARRIS & LATRASSE (1985) estudaram a produção de lactonas em meio de cultura líquido contendo extrato de malte por linhagem de *Fusarium poae*. O meio de cultura contendo extrato de malte apresentou um forte aroma de frutas devido à presença

das lactonas: gama-pentalactona, gama-hexalactona, gama-heptalactona, gama-octalactona, gama–nonalactona, gama-decalactona, gama-undeclactona, cis-6-dodecen-olide e delta decalactonas. As lactonas produzidas foram identificadas por cromatografia gasosa e espectometria de massas por comparação do tempo de retenção com o padrão autêntico do composto. A lactona mais abundante (2 mg/L) foi cis-6–dodecen-4-olide, que é responsável pelo aroma de pêssego em conserva.

A produção biotecnológica de compostos aromáticos utilizando linhagem de *Ischnoderma benzoinum* foi estudada por BERGER *et al* (1987). Neste estudo, foi realizada a seleção de 30 linhagens de fungos pertencentes à classe dos basidiomicetos, dente a linhagens testadas, uma linhagem identificada como *Ischnoderma benzoinum* foi selecionada por produzir grande quantidade de metabólitos voláteis como os álcoois alifáticos: 1-pentanol, 2-heptanol, 2-octanol; terpenos como linalol; lactonas como: 4-pentanolide, 4-butanolide, 4-hexanolide, 2-hexen-4-olide, 4-heptanolide, 4-octanolide e 2 octen-4–olide, compostos aromáticos como benzaldeído, 3-fenil propanol e fenil etanol. Para a produção dos metabólitos voláteis, a linhagem foi inoculada em frascos contendo meio de cultura YM (Yeast Malt) e meio de cultura composto por glicose, asparagina e sais minerais. Os meios de cultura foram suplementados ou não com Migliol 812, fração do óleo de coco, correspondendo com 56% de ácidos graxos C_8, 42% de C_{10} e $\angle$ 2% de C_{12}. Para a análise dos compostos voláteis, os meios de cultura foram destilados e o pH do líquido destilado foi ajustado para 8, e os padrões internos metil heptanoato, metil decanoato e metil tridecanoato foram adicionados. A solução foi extraída com solução de pentano: diclorometano na proporção de 2:1 (v/v) e os extratos orgânicos concentrados em coluna Vigreux e analisados através de CG/MS.

KAPFER *et al* (1989) estudaram a produção de 4-decanolide (gama-decalactona) por sistema de fermentação semicontínua pela linhagem de fungo do gênero *Tyromyces sambuceus*. A linhagem de *Tyromyces sambuceus* foi cultivada em reator em sistema de fermentação semicontínua por 70 dias em meio de cultura composto por: glicose monohidratada 20 g, peptona 6,0 g, KH_2PO_4, 1,5 g, $MgSO_4$ 0,5 g, tiamina, 0,002 g. Em um litro de meio de cultura foi adicionado 2 mL de Tween-80 e 1 mL de uma solução contendo

os elementos traços: $FeCl_3$. $6H_2O$, 0,4g/ L, $ZnSO_4.7H_2O$, 0,45 g, $MgSO_4.H_2O$ 0,152 g, $CuSO_4$. 5 H_2O , 0,025 g/L sendo o pH ajustado para 6,0 com NaOH 1N. Durante o tempo de fermentação, a produção de gama–decalactona foi acompanhada, sendo obtido um valor de 220 e 330 mg/L de decalactona. Após a dispersão do micélio, um único pico do composto foi obtido na concentração de 880 mg/L.

A influência da atividade de água no crescimento e produção de gama-decalactona foi estudada por GERVAIS & BATTUT (1989). A influência da atividade de água (a_w) na produção de gama decalactona pela levedura *Sporidiobolus salmonicolor*, cultivada em meio líquido composto por: 30 g/ L de glicose, 3,5 g de Bacto peptona, 2 g de KH_2PO_4, 3g de $MgSO_4$. 7 H_2O e 0,13 g de $CaCl_2$. H_2O em um litro de água destilada. O pH foi ajustado para 6,0 e a produção do composto foi acompanhada pela análise em cromatografia gasosa. A máxima produção extracelular de gama-decalactona ocorreu em atividade de água com valor de 0,99.

CHARLIER & CROUZET (1992) estudaram a produção de lactonas por linhagem de *Penicillium roqueforti*, através da bioconversão de óleo hidrolisado de soja como precursor. As lactonas produzidas foram identificadas como 4-dodecanolactona e cis-dodecen-4-olide e 4-hexanolide por Cromatografia Gasosa/Espectometria de Massas e tempo de retenção dos padrões autênticos do composto. A presença de cis-6–dodecen–4-olide no extrato aromático obtido do meio de bioconversão contendo óleo de soja hidrolisado, pode ser explicado pela bioconversão do ácido linoléico pelos esporos de *Penicillium roqueforti.* Por outro lado, lactonas saturadas como 4-dodecanolide pode ser formada pela gama–hidroxilação do ácido saturado correspondente. A formação de 4-decanolide pode ser explicada pela via da β-oxidação do ácido oléico em ácido 3-dodecanóico, seguido pela lactonização deste hidroxiácido.

A estereoquímica da biogeração de gama-decalactona e gama-dodelactona por linhagens de *Yarrowia lipolytica* e *Pichia ohmeri* através da degradação de hidroxiácidos racêmicos de cadeia carbônica C_{16}–C_{18}, foi estudada por ERCOLI *et al* (1992). Neste estudo, as linhagens de *Y. lipolytica* e *P. ohmeri*, foram cultivadas em 100 mL de meio de

cultura líquido composto por 0,5% de extrato de carne, 0,01% de Tween 80 e 1 g do hidroxiácido precursor. Após 48 horas de cultivo, os meios de cultura foram acidificados e extraídos com diclorometano (2 x 20 mL). Para a análise da composição de enantiômeros, foi utilizada cromatografia gasosa com megadex (coluna capilar permetilada de β-ciclodextrina sílica fundida). Foram utilizadas as seguintes condições cromatográficas: temperatura do detector de 240°C, temperatura do injetor de 250°C e gás hélio como gás de arraste na vazão de 1mL/min. A temperatura de análise foi de 110°C por 3 minutos, aumentando de 1/min até 200°C. As formas enantioméricas das lactonas produzidas foram identificadas por comparação das amostras com o padrão autêntico dos compostos.

Numerosos compostos enantiômeros têm sido isolados e/ou sintetizados e suas propriedades sensoriais intensamente investigadas. As propriedades sensoriais de uma série de compostos aromáticos enantiômeros, entre eles γ-decalactona, foram relatados por BOELENS (1993). Gama-lactonas opticamente ativas são encontradas em muitas frutas como morangos, pêssego, damasco, mangas, mamão e frutas maduras. Delta lactonas quirais estão geralmente presentes em baixas concentrações como compostos voláteis de frutas, mas são constituintes de aromas de produtos derivados do leite, como cremes, manteiga e queijo. A tabela 5 mostra a qualidade sensorial de γ-alquil-γ-lactonas em solução aquosa de 10% de açúcar e 0,0015% de ácido cítrico.

Tabela 5. **Qualidade sensorial de alquil-γ-lactonas em solução aquosa de 10% de açúcar e 0,0015% de ácido cítrico.**

γ- lactona substituinte	Odor	Aroma característico
(R) - (+) – metil	Manteiga; doce	Doce, caramelo, picante
(S) - (-) – metil	Sem odor (?)	Doce, caramelo. picante
(R) - (+) – etil	Manteiga, coco, herbáceo	Herbáceo
(S) - (-) – etil	Doce, creme, coco	Herbáceo
(R) - (+) - propil	Doce, pimenta, herbáceo	Coco, doce amanteigado Nozes
(S) - (-) propil	Manteiga, coco, frutal doce	Coco, doce, nozes
(R) - (+) – butil	Pimenta verde, coco	Coco, extremamente doce
(S) - (-) – butil	Gordura, coco Menos intenso que R	Coco, extremamente doce
(R) - (+) – pentil	Doce, coco	Coco
(S) - (-) – pentil	Gordura Menos intenso que R	Coco
(R) - (+)- hexil	Caramelo, frutal doce, amanteigado	Creme, pêssego
(S)- (-) –hexil	Coco doce, frutal	Creme, pêssego
(R)- (+)-heptil	Pêssego, floral, doce amanteigado	Doce, caramelo
(S)- (-) heptil	Nota de doce amanteigado + aldeído	Doce, caramelo
(R) – (+) octil	Frutal doce, floral, aspecto amdeirado	Frutal doce, pêssego, damasco
(S) – (-) – octil	Frutal – amanteigado	Frutal doce

ESAKI *et al* (1993) estudaram a biotransformação do ácido oléico por linhagem de *Alcaligenes* 5-18. Foram isoladas do solo 160 linhagens de bactéria, as quais foram tolerantes a altas concentrações de ácido oléico. As linhagens foram testadas quanto à sua habilidade de transformar ácido oléico em novos derivados de ácidos graxos. Uma das linhagens isoladas, *Alcaligenes sp* 5-18, produziu entre outros compostos derivados do ácido oléico o ácido 3-hidroxioléico, ácido 3-hidróxi-hexadecanóico e ácido tetra decanóico. Estes compostos são intermediários da via da β-oxidação do ácido oléico e sua acumulação é provavelmente devido a via da β-oxidação do ácido oléico por microrganismos. Nenhum outro hidroxiácido derivado de ácido graxo com cadeia carbônica menor que 14 foi produzido.

De acordo com a revisão realizada por FRONZA *et al* (1993) existe uma grande dificuldade na biogeração de precursores de aromas naturais, cuja origem biossíntética não é bem conhecida. Este é o caso de C_6-C_{12} gama e delta lactonas, componentes de aromas em frutas como pêssego, damasco, morango, produtos derivados de leite e alimentos fermentados em quantidades traços. A geração de aromas em frutas, usualmente começa no amadurecimento do fruto, quando os processos catabólicos estão prevalentes. No entanto, o mecanismo pelo quais estes processos são ativados ainda é obscuro. Processos degradativos incluem a β-oxidação de intermediários oxigenados os quais podem ser opticamente ativos como os envolvidos na cascata da lipoxigenase ou aqueles formados na hidratação enzimática de metil–ácidos graxos polinsaturados ou racêmicos como os compostos formados na foto ou autooxidação. Os autores estudaram a habilidade de vários microrganismos como *Yarrowia lipolítica* e *Pichia ohmeri* para degradar hidroxiácidos graxos naturais e compostos estruturais análogos à gama e delta lactonas, com ênfase especial no aspecto estereoquímico do processo. A figura 6 mostra a obtenção de gama-decalactona a partir do ácido ricinoléico.

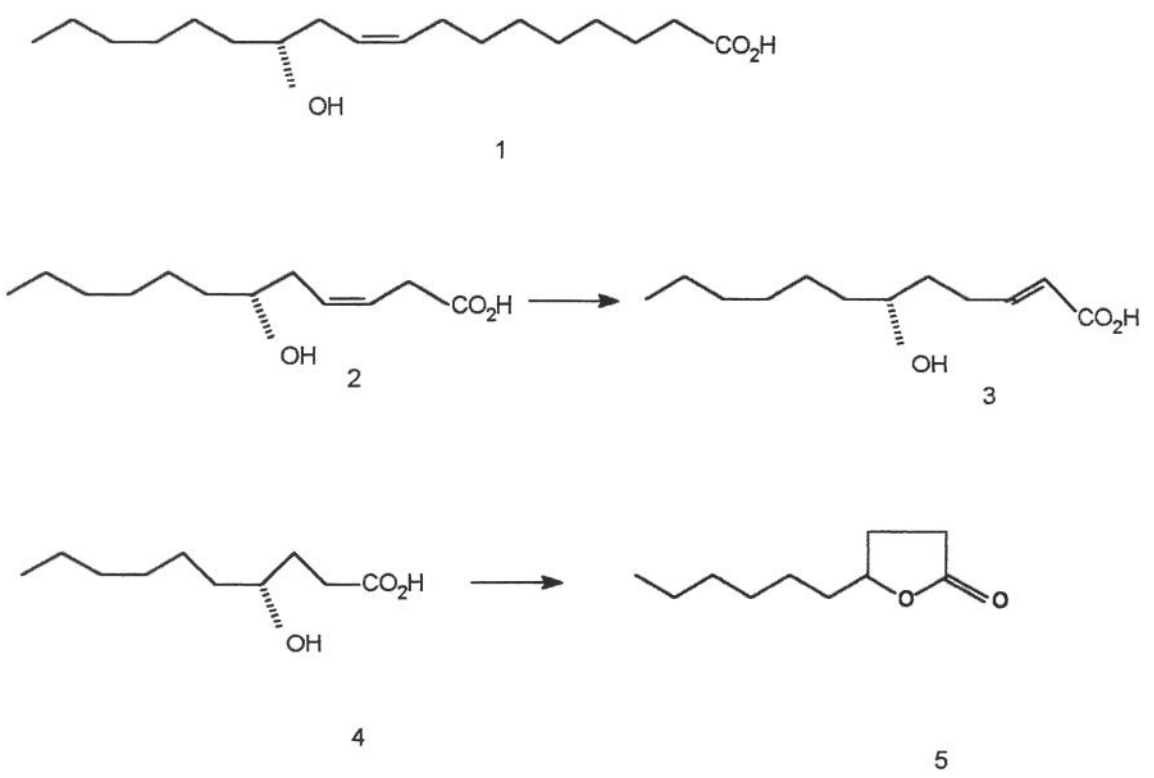


Figura 6. Obtenção de gama–decalactona por *Yarrowia lipolitica* utilizando ácido ricinoléico. 1) β-oxidação na presença de uma isomerase atuando no intermediário C_2; 2) transformação em 3; 4) 4-(R) ácido 4-hidroxidecanóico, a forma aberta da lactona; 5) gama-decalactona.

NAGO *et al* (1993) estudaram a via de degradação de 2-deceno-δ-lactona por linhagem fúngica do gênero *Fusarium solane*. A via degradativa de 5-alcanolide (alcano–delta-lactona) e 2-deceno-δ-lactona por linhagens de *Fusarium solane* PM-1 um fungo produtor de massoialactona foi investigada. Os compostos (+/-) alcanos-δ-lactonas foram primeiramente degradados para uma forma de metilcetona; 4-hidroxi–2–alcanona após hidroxilação. A molécula de 4-heterose–2-alcanona foi então convertida para 2,4 alcadiol, o que sugere um ciclo de degradação sucessiva por uma via de β-oxidação modificada. Para o estudo de degradação de 2-deceno-δ-lactonas, o fungo foi inoculado em placas de Petri contendo meio de cultura ágar batata dextrose (BDA) e incubados a 25°C por três dias. Na superfície de cada cultura, 20 mg de lactonas (octano, decano, undecano e dodecano-δ-lactonas) foram espalhadas. As placas foram incubadas por vários dias. Após esse período, os compostos foram extraídos e secos em sulfato de amônio. Os produtos da degradação foram analisados por cromatografia gasosa.

SERRANO–CARREON *et al* (1993) reportaram estudos envolvendo o metabolismo de ácido linoléico ou mevalonato na biossíntese de 6-pentil-α-pirona por espécies de fungos do gênero *Trichoderma*, através da incorporação de ácido linoléico marcado com (U–^{14}C) nas células fúngicas. A incorporação de ácido linoléico marcado com (U^{14}C) por *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma viride* foi monitorado por 48 horas. A figura 7 ilustra a provável via biossíntética na produção de 6PP a partir do ácido linoléico.

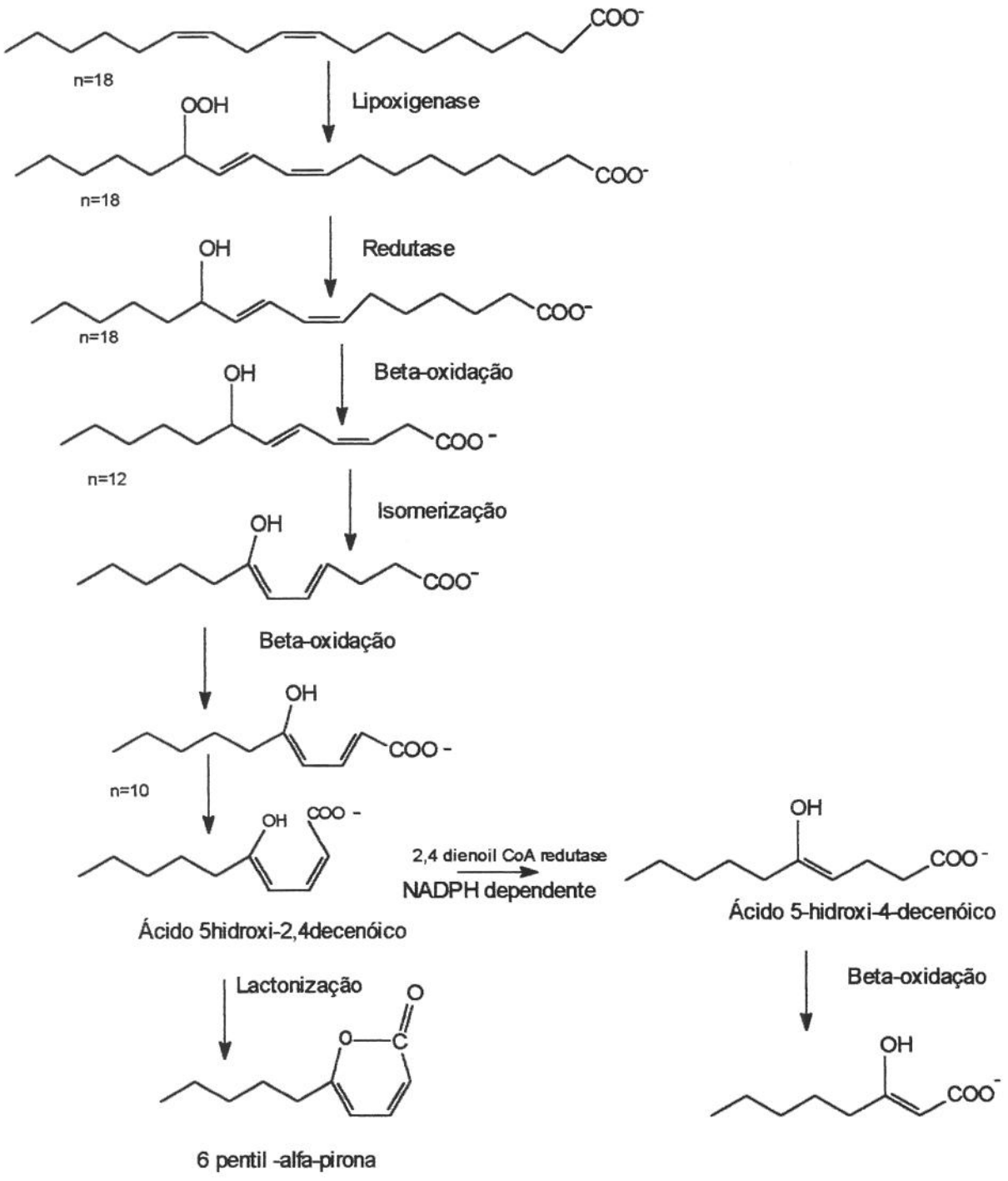


Figura 7. Via biossintética provável da produção de 6-pentil-alfa-pirona através da bioconversão do ácido linoléico.

LEE *et al* (1994) estudaram a produção de gama-decalactona e cis–6–dodecen-4-olide na presença de ácidos graxos. O crescimento e a produção de gama-decalactona por *Sporobolomyces odorus* foram investigados. Foi verificado que a adição de ácido decanóico ou dodecanóico no meio de cultura reduziu o crescimento e produção de gama-decalactona. Um aumento da produção de gama-decalactona para 8,62 mg/L foi obtida quando 3% de óleo de mamona foi adicionado após 24 horas de cultivo.

GATFIELD *et al* (1995) relatam a obtenção de gama-decalactona através de processo fermentativo, utilizando a via da β-oxidação do óleo de mamona pela levedura do gênero *Candida lipolytica*. Na bioconversão de óleo de mamona obteve-se uma produção de 5 g/L após um período de incubação de 50 horas. Após esse período, um declínio na produção ocorreu como resultado da conversão do ácido 4-hidroxidecanóico (forma intermediária da gama–decalactona) para ácido 3,4 dihidroxidecanóico. Este último composto é ciclizado para 3-hidroxidecalactona, que não possui nenhuma característica de aroma.

FERON *et al* (1996) estudaram a produção, a identificação e a toxicidade de gama-decalactona e ácido 4–hidroxidecanóico das linhagens de levedura do gênero *Sporiodiobolus ruinenii* e *Sporidiobolus salmonicolor* em meio de cultura composto por 15 g de glicose, 0,5 g/L de bacto triptona, 1 g de extrato de levedura, 1 g de extrato de malte, 2 g de casaminoácidos, 2 g de KH_2PO_4 e 0.13 g de $MgSO_4.7\ H_2O$. O meio de cultura esterilizado foi inoculado com suspensão de leveduras contendo 6 x 10^8 células/mL e incubados em fermentador a 250 rpm de agitação e aeração de 1 volume de ar/volume de meio de cultura/minuto. O pH do meio de cultura foi ajustado para 6,0 com 2,5 N de NaOH ou 2,5 N de HCl. Após 24 horas de incubação, 5% de ricinoleato de metila foi adicionado ao meio de cultivo. A produção de gama-decalactona começou imediatamente após a adição do substrato ricinoleato de metila e a produção máxima obtida foi de 500 mg/L em130 horas de incubação, sendo a extração do composto realizada após a acidificação do meio de cultura para pH 2,0 para a linhagem de *Sporiodiobolus salmonicolor*. Para a linhagem de *S. ruinenii* a máxima produção de gama-decalactona obtida foi de 1,6 g/L em 216 horas de incubação, após a acidificação do meio de cultura

para 2,0 antes da extração do composto. A acidificação da cultura para pH 2,0 antes da extração do composto volátil aumentou a concentração de gama-decalactona em cerca de 2,5 vezes para a linhagem de *Sporodiobolus ruinenii*, no entanto, não produziu nenhum aumento na produção de gama-decalatona pela linhagem de *S. salmonicolor*. Segundo os autores, esta diferença na porcentagem de reconversão da lactona em pH 6,0 e pH 2,0 deve ser devido à presença de ácido 4-hidroxidecanóico, a forma aberta da lactona, que não é ciclizada em pH 6,0 e convertida em gama-decalactona, a forma cíclica do ácido 4-hidroxidecanóico. Análises em espectrometria de massas foram realizadas. Neste experimento, dois picos relevantes foram identificados. O primeiro pico, foi identificado como pertencente à molécula de gama-decalactona devido ao íon característico *m/z* 85 atribuído ao anel da lactona. O segundo pico, descreveu um espectro de massas similar ao espectro de massas do metil éster do ácido 4-hidroxidecanóico. O efeito da toxicidade da gama–decalactona e o ácido 4-hidroxidecanóico no crescimento das linhagens de *S. salmonicolor* e *S. ruinenii* foi investigado. A presença de lactonas durante o crescimento das linhagens resultou em aumento da fase lag e em uma inibição significativa no crescimento específico para ambas espécies. Nenhuma multiplicação celular foi observada em concentrações de lactonas superiores a 100 mg/L para *S. salmonicolor* e na concentração de lactona maior que 300 mg/L para a linhagem de *S. ruinenii*, que apresentou ser mais tolerante à presença de lactona. A concentração mínima inibitória (MIC) para *S. salmonicolor* esteve entre 100 e 200 mg/L e a MIC para *S. ruinenii* entre 200 e 300 mg/L. A linhagem de *S. salmonicolor* foi capaz de crescer na presença do ácido 4-hidroxidecanóico em concentrações variando de 100 a 500 mg/L, porém, uma redução no crescimento da cultura foi observado na concentração de 500 mg/L. Por outro lado, o crescimento da linhagem de *S. ruinenii* não foi afetado na presença de 4-hidroxidecanóico nas concentrações de 100 a 500 mg/L.

O efeito de vários ácidos graxos componentes do óleo de mamona no crescimento e produção de gama-decalactona por linhagem de *Sporobolomyces odorus* foi estudado por LIN *et al* (1996). O crescimento de *Sporobolomyces odorus* no meio de cultura contendo 0,06% dos ácidos graxos palmítico, esteárico e oléico foi similar ao meio sem ácidos graxos. A adição de ácido palmítico, esteárico, oléico ou linoléico no meio de cultura,

reduziu a produção de gama-decalactona após 216 horas de cultivo, no entanto, um aumento significativo de 71,8 mg/L aproximadamente 25 vezes (3,5 mg/L) foi obtido no meio de cultura contendo ácido ricinoléico quando comparado com o meio controle. A concentração do ácido ricinoléico e o tempo de adição foram também observados por afetar a quantidade de gama-decalactona produzida por *S. odorus*. Quando 0,06% de ácido ricinoléico foi adicionado no meio de cultura, no início do processo fermentativo, a máxima produção de gama-decalactona obtida foi de aproximadamente 134, 4 mg/L após 216 horas de cultivo.

HAFFER & TRESSEL (1996) estudaram o efeito da adição de ácido oléico marcado com 9,10 dois H^2 em meio de cultura na formação de R-gama–decalactona e enantiômeros de (z)–6-gama–dodecalactona e gama dodecalactona pela linhagem de levedura de *Sporobolomyces odorus*. Neste estudo, os autores verificaram a forte evidência do ácido oléico ser um genuíno precursor da gama-decalactona e uma nova via biossintética foi proposta, iniciando uma estrita enantioseletividade R-12 hidroxilação do ácido oléico como passo inicial, seguido da β-oxidação até a formação da lactona.

PAGOT *et al* (1996) estudaram o metabolismo de ácidos graxos e produção de lactona pela levedura *Pichia guilliermondii* e a influência da enzima carnitina octanoil–transferase no metabolismo dos ácidos graxos. Após o cultivo da levedura em meio de cultura contendo metil ricinoleato como única fonte de carbono, foi verificado que a β-oxidação mitocondrial não foi responsável pela biotransformação. O efeito da clorpromazina, um inibidor da enzima octanoil-transferase da via da β-oxidação peroxisomal, na produção de lactona e o acúmulo de lipídios pela levedura foi observado. A presença de clorpromazina causou redução na produção do composto de aroma e esta redução foi inversamente proporcional a quantidade de clorpromazina presente no meio de cultura. Um considerável acúmulo de derivados do metil ricinoleato também foi observado. Os autores concluíram que o metabolismo responsável pela bioconversão foi a β-oxidação peroxisomal.

A produção de gama–decalactona por *Trichoderma harzianum* foi estudada por SERRANO–CARREON *et al* (1997). A linhagem de *Trichoderma harzianum* produziu 260 mg/L de gama-decalactona após 7 dias de inoculação utilizando meio de cultura contendo óleo de mamona como única fonte de carbono e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio. A produção de gama-decalactona foi significativa, embora não associada com o crescimento do microrganismo. Durante as primeiras 96 horas de cultivo, a produção de gama-decalactona foi de 0,275 mg (L. h), enquanto que nas 72 horas de fermentação a produção do metabólito aumentou significativamente para 3,3 mg (L.h).

Um total de 108 linhagens de fungo pertencente ao gênero *Trichoderma sp*, foram analisadas quanto à habilidade em produzir, 6-pentil-α-pirona (6PP), composto responsável pelo aroma característico de coco a partir de óleos vegetais e reportados por BONARME *et al* (1997). Dentre elas, uma linhagem identificada como *Trichoderma viride* TSP2, demonstrou a capacidade de produzir 6PP de vários óleos vegetais comerciais tais como o óleo de mamona (C18:1= 89,3%), óleo de semente de uva (C18: 1= 78,6%), óleo de linhaça (C18:3 = 46,6%). O aumento da concentração dos óleos de 5 a 20% em meio de cultura composto por: $NaNO_3$, 2g/L, KH_2PO_4 1 g/L, KCl 0,5 g/L, $MgSO_4.7H_2O$ 0,5g/L, $CaCl_2.6H_2O$ 8mg/L, $ZnSO_4.7H_2O$ 1 mg/L, $FeSO_4.7\ H_2O$ 10 mg/L, extrato de levedura 1 g/L, peptona 2 g/L em pH 6,0, uma produção de 6PP de 1,2 g/L foi encontrada após 144 horas de incubação. Por outro lado, quando se utilizou glicose na concentração de 20 g/L como fonte de carbono, uma produção de 80 mg/L foi obtida.

DUFOSSÉ *et al* (1998) estudaram a produção de gama-decalactona e ácido 4-hidroxi-decanóico por leveduras do gênero *Sporiodiobolus*. Neste estudo, a bioconversão do ricinoleato de metila para lactona foi verificada em 4 linhagens de levedura do gênero *Sporiodiobolus*: *S. salmicolor*, *S. ruinenii*, *S. jonhsonii* e *S. pararoseus*. Em bioreator contendo 4,1 g/L de metil ricinoleato, somente as linhagens de *S. salmonicolor* e *S. ruinenii*, produziram 12 mg/L e 40m/L de gama-decalactona após 72 horas de bioconversão. As linhagens de *S. jonhsonii* e *S. pararoseus* não produziram nenhuma forma de lactona apesar do consumo do precursor. As quatro linhagens apresentaram diferentes sensibilidades para lactona. Durante quatro cultivos sucessivos em batelada em bioreator,

5,5 g/L de gama-decalactona foi produzida por *S. ruinenii* em 10 dias de fermentação. Neste mesmo trabalho, o efeito do pH durante a extração de gama-decalactona foi verificado. Vários trabalhos e patentes descrevem a acidificação e o aquecimento do meio de cultura como procedimentos necessários para promover a reconversão total de lactonas. Isto significa que em pH neutro, parte da lactona não é extraída em solvente orgânico, proporcionando assim uma baixa concentração e perda de um microrganismo produtor de lactona. Para as três linhagens de *Sporiodiobolus* (*S. salmonicolor, S. johnsonii e S. pararoseus*), a acidificação mostrou pequeno acréscimo na taxa de reconversão total de gama-dacalactona em pH 2,0. No entanto, para a linhagem de *S. ruinenii*, a acidificação permitiu uma taxa de reconversão de gama-decalactona seis vezes mais em pH 2,0. Estes resultados implicam na presença de um precursor de gama-decalactona no meio de cultura. Este precursor, segundo os autores, corresponde ao ácido graxo 4-hidroxidecanóico. Em pH 2,0, este ácido graxo é ciclizado espontaneamente e é conseqüentemente melhor reconvertido nesta forma de lactona.

De acordo com trabalhos relatados por WACHÉ *et al* (1998) sobre o metabolismo de ácido graxo pelo gênero de levedura *Yarrowinia lipolitica*, a enzima acil-CoA oxidase no processo de β-oxidação de ácidos graxos, é fundamental na produção de gama–decalactona. A β-oxidação é um sistema cíclico de oxidação de ácidos graxos, o qual consiste em 4 reações significativas catalisadas por três enzimas, dentre elas, a acil–CoA oxidase tem papel principal.

LEE *et al* (1998) estudaram a produção de gama-decalactona a partir de ácido ricinoléico por células de *Sporiodiobolus salmonicolor*, CCRC 21975 imobilizadas em K-carragena, frutosana e agarose ou alginato de cálcio. Devido aos efeitos da alta temperatura durante os processos de gelificação da k-carragena e agarose como também a toxicidade da quitosana para o organismo em teste, a imobilização de células de *Sporidiobolus salmonicolor* com essas matrizes para a produção de gama-decalactona foi inadequada. Nenhuma célula viável e nenhuma produção de gama-decalactona puderam ser detectadas no meio de cultura após quatro dias de cultivo de *Sporidiobolus salmonicolor* imobilizada com k-caragena ou quitosana. Poucas células viáveis e pequena produção de gama-

decalactona foram encontradas em meio contendo células imobilizadas em agarose. Por outro lado, nenhuma redução significativa na população viável foi observada durante imobilização em alginato de cálcio. As células de *S. salmonicolor* imobilizadas em alginato de cálcio apresentou menor susceptibilidade à toxicidade do ácido ricinoléico e produziu maior quantidade de gama-decalactona que as células livres. Os estudos do efeito do tempo e a produção de gama-decalactona foram realizados tanto para as células imobilizadas quanto para as células livres. Foi verificado que as células imobilizadas produziram máximo de 138 mg/L após cinco dias de fermentação e as células livres produziram máximo de 107 mg/L.

Os efeitos de alguns fatores físicos, tempo de pré-cultura e pH inicial do meio de cultura na produção de gama-decalactona por células imobilizadas da levedura *Sporidiobolus salmonicolor* CCR 21975 com alginato de cálcio também foram investigados por LEE *et al* (1999). Após quatro dias de incubação, nenhuma diferença significativa no número final de células viáveis dentro ou fora do gel foi notada em relação ao tempo inicial de pré–cultura. Isto pode ser devido à deficiência de nutrientes que inibe a divisão celular. A concentração de gama-decalactona no meio de cultura YNB (Bacto Yeast Nitrogen Base) sem aminoácidos e sulfato de amônio, suplementado com 3 % de manitol e 0,1% de asparagina foi determinada após 96 horas de cultivo, foi maior com o aumento do tempo da pré-cultura. O aumento na produção inicial de gama-decalactona pode ser devido ao aumento inicial da população celular ou do metabolismo microbiano. O efeito do pH inicial do meio de cultura no crescimento e produção de gama-decalactona foi investigado. Nenhuma diferença significativa na população celular dentro ou fora do gel foi observada após 96 horas de incubação nos meios de cultura com pH inicial variando entre 4 e 8. A produção de gama-decalactona apresentou uma variação de cerca de 75,0 a 114,7 mg/L pelas células imobilizadas de *S. salmonicolor* após 96 horas de incubação em meio de cultura com vários valores de pH inicial. Células imobilizadas e células livres produziram máximo de gama-decalactona em meio de cultura com pH inicial 4,0. No entanto, a máxima quantidade de gama-decalactona produzida foi maior com células imobilizadas (114,7mg/L) que com as células livres (62,6 mg/L).

BAGNON *et al* (2000), investigaram a produção de 6–pentil-α-pirona (6PP) por linhagem de *Trichoderma harzianum* em meio de cultura líquido e meio de cultura sólido, utilizando bagaço de cana como suporte. A linhagem de *Trichoderma harzianum* foi inoculada em meio de cultura líquido composto por 7,0 g/L KH_2PO_4, 2,0 g/L Na_2SO_4, 1,5 g/L $MgSO_4.7\ H_2O$, 0,1 g/L $CaCl_2.6H_2O$, $FeCl_3.6H2O$ 0,0008 g/L, 0,0001 g/L $ZnSO_4.7\ H_2O$, 30 g/L e 0,94 g/L NH_4SO_4 e 30 g/L glicose. O meio sólido foi composto de bagaço de cana impregnado com 75% de umidade com a solução nutriente utilizada para o meio líquido. Os meios foram autoclavados e inoculados com o micélio e incubados a 25°C sem agitação. O pH inicial da cultura foi 5,6. Após o tempo de incubação, os compostos de aroma presentes no meio de cultura sólido e no meio de cultura líquido foram extraídos com 10 mL de hexano. Os compostos voláteis foram identificados por técnicas de CG/MS. A produção máxima em meio sólido com bagaço de cana foi de 28 mg/g de massa seca, equivalente a 0,9 g/L. Para o meio de cultura líquido, a produção de 6PP obtida foi de 55 mg do quarto ao sétimo dia de incubação, no entanto um decréscimo para 28 mg/L foi observado após 10 dias de incubação. A lactona saturada (6PP) possui um aroma característico de coco e sua produção por síntese química requer várias etapas com alta temperatura (490°C), tornando o processo difícil e de alto custo. Por essa razão, a produção de 6PP produzido por processos fermentativos pode ser uma alternativa de grande interesse em relação à síntese química.

A importância das enzimas envolvidas na via da β-oxidação na produção de gama-decalactona pela levedura *Yarrowia lipolítica* foi investigada por WACHÉ *et al* (2001). Alguns microrganismos podem transformar ricinoleato de metila em gama-decalactona, mas a produção é baixa devido: i) a conversão incompleta do ricinoleato (C_{18}) para C_{10}, precursor de gama-decalactona, ii) acúmulo de outras lactonas (3-hidroxi-gama-decalactona e 2-3-decen–4-olide) e iii) consumo da gama decalactona pelo microrganismo. A atividade da Acil coenzima A (Acil CoA) oxidase em leveduras do gênero *Yarrowia lipolytica* foi observada em mutantes para o genes POX. Linhagens mutantes sem atividade de acil CoA oxidase não podem consumir a gama-decalactona produzida e em linhagens mutantes com a disrupção do gene POX3, que codifica a cadeia curta de acil CoA oxidase, o consumo é mais lento.

OKAMOTO *et al* (2002) investigaram a produção de gama-lactonas pela linhagem do basidiomiceto *Piptoporus soloniensis*. A linhagem produziu aroma frutal, semelhante a frutas tropicais quando incubada em meio de cultura (MGY) composto por 1% de extrato de malte, 0,4% de extrato de levedura e 0,4% de glicose a 30°C. Para a extração do composto de aroma, 50 mL do meio de cultura foi filtrado e tratado com solução de hexano e diclorometano na proporção 2:1 (v/v). A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 e as análises quantitativas e de identificação das gama-lactonas foram realizadas por cromatografia gasosa equipada com detector de ionização de chama e espectrômetro de massas. Na análise por cromatografia gasosa dois compostos principais foram obtidos e identificados como gama-decalactona e gama-octanolactona. O efeito da adição de ácidos graxos no meio de cultura no crescimento e produção de gama-decalactona foi investigado. A adição dos ácidos 12-hidroxiesteárico e ácido ricinoléico promoveram um aumento na produção de gama-decalactona de 7,9 mg/mL para 16 mg/L e 14 mg/L respectivamente. Por outro lado, a adição dos ácidos mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0) e ácido oléico (C18:1) no meio de cultura, promoveu um aumento na produção de gama-octanolactona de 0,8 mg/L para 1,4 mg/L. Os ácidos hexanóico (C6:0), octanóico (C:8), decanóico (C10:0), láurico (C12:0), linoléico (C18:2) adicionados ao meio de cultura, inibiram acentuadamente o crescimento microbiano, o que pode ser devido à atividade antimicrobiana desses ácidos graxos.

3.7 O substrato óleo de mamona (óleo de rícino)

3.7.1Características e aplicações do óleo de mamona

O óleo de mamona é extraído da semente oleaginosa madura do *Ricinus communis* Linné (família Euphorbiacea), a mamona. Em climas temperados essa planta é anual, mas nos trópicos é uma árvore perene que pode atingir até quinze metros de altura. São várias as suas formas, com variações no formato das folhas, bem como na cor, no tamanho e nas características das sementes. O fruto é uma cápsula espinhosa tricelular, e cada célula contém uma semente albuminosa oval. (ROBBERS *et al*, 1997). A planta é nativa do leste da África. No Egito antigo e no Oriente, o óleo era utilizado para tratamento de pele, das feridas, do cabelo, assim como para fins técnicos (TURATTI *et al*, 2002). É muito cultivada na Índia, no Brasil e em outros países da América Central e do Sul e em várias regiões da África, do sul da Europa e do sul dos Estados Unidos. A mamona é atualmente utilizada na sua totalidade; as folhas podem ser utilizadas para alimento do bicho da seda e a haste, além de celulose própria para a fabricação de papel, fornece matéria-prima para a produção de tecidos grosseiros (ABOISSA, 2002).

O óleo é o mais importante constituinte da mamona, sendo o ácido ricinoléico o seu maior componente, cerca de 85%, o que confere ao óleo suas características singulares como a alta viscosidade, por exemplo, possibilitando ampla gama de utilização industrial. (MAMONA, 2002). Praticamente toda a produção da mamona é industrializada, obtendo-se como produto principal o óleo e como subproduto a torta de mamona, que têm grande capacidade de restauração de terras esgotadas.

Extração do óleo

As sementes de mamona contêm de 45 a 55% de óleo fixo; cerca de 20% das substâncias protéicas são constituídas por globulina, albumina, nucleoalbumina, glicoprotéinas e ricina (lectina tóxica ou hemaglutina). A ricina não é retirada na extração do óleo de rícino, mas fica na torta. É venenosa para o gado, mas não afeta as aves domésticas.

O bagaço da semente da mamona contém um alérgeno que causa reações em indivíduos hipersensíveis. Esse poderoso agente alergênico fica na fração protéico-polissacarídica atóxica.

A desativação das substâncias tóxicas e a retirada da fração alergência são problemas que devem ser solucionados na produção do óleo de rícino.

Para a extração do óleo da semente completa ou da baga o método utilizado pode ser prensagem, a frio ou a quente, ou extração por solventes. Na prensagem do óleo a quente, a semente é processada por vapor para destruir as albuminas, é filtrado e branqueado.

A produção por "prensagem a frio", em que o óleo é separado por prensagem hidráulica ou contínua, representa 60% do total e rende um óleo de cor clara e de boa qualidade. O restante do óleo é extraído por solventes, rendendo um produto mais escuro e de pior qualidade.

Características do óleo de mamona

O óleo de mamona é amarelo-claro ou quase incolor, transparente e viscoso. Tem odor fraco e característico gosto delicado.

É composto por uma mistura de triacilgliceróis, cerca de 85% dos quais triricinoloilgliceróis. O restante é constituído por diricinoleoilgliceróis, com terceiro grupo acila, representando o ácido oléico, linoléico ou diidroxiesteárico ou ácido saturado (palmítico ou esteárico). A tabela 6 ilustra a composição do óleo de mamona.

Tabela 6. **Composição do óleo de mamona.**

Ácidos graxos	Porcentagem
Ácido ricinoléico	85%
Ácido palmítico	1,5%
Ácido esteárico	1,5%
Ácido oléico	4,5%
Ácido linoléico	5,0%
Outros	2,5%

* Dados obtidos: CERALIT/ S. A.

Aplicações do óleo de mamona

De acordo com ABOISSA (2002), o óleo de mamona pode ser utilizado na fabricação de tintas e isolantes, como lubrificante na aeronáutica, na manufatura de cosméticos e de muitos tipos de drogas farmacêuticas. O óleo de mamona também é empregado em vários processos industriais, como na fabricação de corantes, anilinas, desinfetantes, germicidas, óleos lubrificantes de baixa temperatura, colas e aderente como base para fungicidas e inseticidas, em tintas de impressão e na elaboração de matéria plástica.

Na área médica é utilizado como laxante, devido ao seu efeito catártico e também como vermífugo (ROBBERS *et al*, 1997).

Recentemente, na área biotecnológica, o óleo de mamona tem sido utilizado como substrato de baixo custo econômico em estudos de bioconversão do ácido ricinoléico no composto aromatizante gama-decalactona (LEE *et al*, 1998; LIN *et al*, 1996; PAGOT & BELIN, 1996).

4. MATERIAIS e MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Reagentes e Materiais Específicos

Reagentes químicos: ácidos, bases, sais minerais, solventes orgânicos (Merck, Riedel, Ecibra ou equivalente).

Reagentes específicos: acetato de etila (Merck), padrões autênticos de gama-decalactona e delta-decalactona (Sigma), padrão interno β-ionona, (Sigma), soroalbumina (Merck), azul de fenol, fenolftaleína.

Ácidos graxos: linoléico, oléico e ricinoléico (Sigma) metil ricinoleato (Sigma).

Glicerídeos: 1 (3) monoléina, 1,2 (1,3) dioléina, trioleína, e ácido oléico (Padrões para Cromatografia em Camada Delgada-CCD) Sigma. Óleo de oliva extra virgem e óleos de soja, girassol e milho de marca comercial. Óleo de mamona (CERALIT/S.A).

Placas de vidro para cromatografia em camada delgada (CCD) 20 x 20 cm, sílica gel G–60, Merck.
Aplicador Desaga para preparo de placas para cromatografia em camada delgada.

Meios de cultura: ágar, peptona, extrato de levedura (Difco), ágar nutriente (Merck), corn steep liquor (água de maceração de milho).

Reagentes e materiais específicos para microscopia eletrônica:

- glutaraldeído
- Tetróxido de Ósmio (OsO_4)
- Álcool etílico nas concentrações de 30, 50, 70 90 e 100%.
- Porta Espécimen (Stub) metálico de 12-13 mm (1/2 pol.).

Enzimas: Lipases microbianas: *Alcaligenes sp* (LB 212), *Rhizopus sp*, *Aspergillus sp* (LB 1099), *Aspergillus sp* (LB 1068), *Geotrichum sp*, obtidas no Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos.

Culturas: *Geotrichum sp*, *Geotrichum fragans*, *Pichia membranaefaciens*, 146, 430, 552, linhagens de leveduras isoladas no Laboratório de Bioquímica de Alimentos e pertencentes à coleção de cultura do Laboratório de Bioaromas.

Equipamentos

Estufas Bacteriológicas Fanem.

Espectrofotômetro Beckman DU –70

Banhos de água de temperatura controlada, Fanem

Potenciômetro Digimed TE – 902

Centrífuga refrigerada Beckman, mod J –21

Balança analítica Mettler, mod. H-10

Câmara refrigeradora, Gilson

Cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama Chrompack CP 9001 com integrador software MOSAIC.

Cromatógrafo a gás CG–17 acoplado com espectrômetro de massa QP–5000 Shimadzu

Microscópio Eletrônico de Varredura JSM–5800 LV. Laboratório de Microscopia Eletrônica –Instituto de Biologia–IB/ UNICAMP

Outros materiais

- Colunas Capilares para Cromatografia gasosa
- CP WAX 52 CB; 30 m x 0,32 μm 0,2 mm
- Coluna Varian, VA-WAX: 30 m x 0,25 μm x 0,25 mm
- Microseringas Hamilton 10μ L
- Micropipetas

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

4.2 MÉTODOS

I-ESTUDO DA HABILIDADE DE HIDROLISAR ÓLEO DE MAMONA E DIFERENTES SUBSTRATOS PELAS LIPASES MICROBIANAS.

4.2.1 Seleção de lipases

O objetivo desse estudo foi verificar a habilidade das lipases microbianas produzidas e previamente caracterizadas no laboratório de Bioquímica de Alimentos da FEA-UNICAMP em hidrolisar diversos óleos vegetais. As lipases microbianas utilizadas foram isoladas dos microrganismos: *Geotrichum sp, Alcaligenes sp, Aspergillus sp* (LB 1099 e 1068), *Rhizopus sp.*

4.2.2 Produção e determinação da atividade enzimática das lipases microbianas

4.2.2.1 Produção da lipase de *Alcaligenes sp* (SOUSA NETO & PASTORE, 1996)

Em frascos Erlenmeyer de 50 mL, foi adicionado 20 mL de meio de cultivo composto de 1% de água de maceração de milho (corn steep liquor), 0,5% de fosfato bibásico de potássio, 2% de farinha de soja torrada em água destilada. O meio de cultura foi ajustado para pH 9,0 com 0,2% de carbonato de sódio. Os frascos foram esterilizados em autoclave à temperatura de 121°C e 1 atm de pressão por 15 minutos e inoculados com 0,5 mL de suspensão bacteriana e posteriormente incubados por 72 horas em agitador rotatório a temperatura de 30°C com agitação de 200 rpm. Após o tempo de fermentação, os meios foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos a 10°C. O precipitado foi descartado e o líquido sobrenadante coletado e adicionado em um único recipiente. Ao líquido sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio em quantidade suficiente para atingir 80 % de saturação. A mistura foi mantida em refrigeração por 24 horas a 10°C para total precipitação enzimática. Após esse período, a mistura foi centrifugada a 10.000 rpm e dialisadas contra água destilada por 48 horas e contra tampão Tris – HCl 0,2 M pH 9,0 por 24 horas. A atividade lipolítica foi determinada na solução enzimática dialisada.

4.2.2.2 Determinação da atividade de lipase da preparação enzimática obtida.

Em Erlenmeyer de 125 mL foram acondicionados 1 g de óleo de oliva, 4 mL de tampão Tris–HCl pH 9,0 na concentração de 0,2M, 1 mL de solução de $CaCl_2$ 110 mM e 1 mL de solução enzimática contendo 10 mg/ mL. O sistema de reação foi incubado a 40°C por 60 minutos em banho termostatizado com agitação de 130 oscilações por minuto. A reação foi paralisada pela adição de 20 mL de solução de acetona/ etanol (1:1 v/v). Os ácidos graxos livres liberados foram titulados contra solução de KOH 0,05M, utilizando azul de timol como indicador.

Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de ácido graxo nas condições descritas acima.

4.2.2.3 Produção da lipase de *Geotrichum sp* (MACEDO & PASTORE, 1995)

Frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo meio de cultura composto por 1% de farinha de soja desengordurada, 1% de farelo de trigo, 0,25% de nitrato de amônio e 3% de extrato de levedura, previamente esterilizados, foram inoculados com 0,5 mL de suspensão da linhagem de *Geotrichum sp*, preparada com água destilada estéril. Os frascos foram incubados em agitador rotatório à temperatura de 30°C com agitação de 200 rpm. Após 48 horas de fermentação, os meios foram centrifugados a 4000 rpm por 25 minutos e líquido sobrenadante foi coletado. Ao extrato aquoso enzimático recolhido, foi adicionado sulfato de amônio em quantidade suficiente para atingir 80 % de saturação. O sal foi adicionado lentamente com agitação branda e a mistura permaneceu por 24 horas a 5°C, para precipitação da enzima. A mistura foi centrifugada a 4.000 rpm por 20 minutos sob refrigeração. O precipitado foi dialisado contra tampão fosfato 0,01 M pH 7,0 por 48 horas a 5°C. Após a diálise, o material foi congelado e liofilizado. O pó obtido foi denominado preparação enzimática bruta onde foi medida a atividade enzimática e concentração protéica.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

4.2.2.4 Determinação da atividade da lipase de *Geotrichum sp*

A atividade lipolítica da preparação enzimática obtida de *Geotrichum sp* foi medida em sistema de reação composto por: 5 mL de emulsão de goma arábica e óleo de oliva na proporção 75%:25% respectivamente; 2 mL de tampão fosfato pH 7,0 0,01M e 1 mL da solução enzimática na concentração de 10 mg/mL de enzima. O sistema foi incubado a 40°C por 60 minutos em banho termostatizado com agitação de 130 oscilações por minuto. A reação foi paralisada pela adição de solução de acetona etanol (1:1 v/ v) e os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de KOH 0,05 M aquosa usando fenolftaleína como indicador. Uma unidade de atividade de lipase foi definida como a quantidade de lipase necessária para liberar 1μmol de ácido graxo por minuto, nas condições descritas acima.

4.2.2.5 Produção das lipases das linhagens de *Aspergillus* sp n° 1099 e 1068 (COSTA & PASTORE, 1996)

O meio de cultura para a produção da lipase foi composto de farelo de trigo e água na proporção de 1: 1 (p/p). Frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 20 g de farelo de trigo / água esterilizados por 15 minutos a 121°C com 1 atm de pressão foram inoculados com 1mL de suspensão de esporos, preparada com esporos da cultura com 96 horas de crescimento em meio de ágar batata dextrosado (BDA). Os frascos foram incubados a 30°C por 72 horas. Após a incubação foram adicionados 100 mL de água destilada em cada frasco. Os meios de cultura foram homogeneizados com bastão de vidro e deixados em repouso por 1 hora para extração. Após esse período, o meio foi filtrado em papel Whatmam n° 1. Ao filtrado foi acrescentado sulfato de amônio em quantidade suficiente para atingir 80 % de saturação. O sal foi adicionado lentamente e a mistura permaneceu por 24 horas a 5°C para precipitação completa da enzima. A mistura foi centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos a 10°C. O líquido sobrenadante foi descartado e o precipitado foi coletado e dialisado contra água destilada por 48 horas a 5°C. Após a diálise o material foi congelado e liofilizado. O pó obtido foi denominado preparado enzimático bruto, onde se determinou a atividade lipolítica e a concentração de proteínas.

4.2.2.6 Determinação da atividade da lipase das preparações enzimáticas obtidas das linhagens de *Aspergillus sp* n °1068 e 1099.

A atividade de lipase das preparações enzimáticas das linhagens de *Aspergillus* (1068 e 1099) foi realizada utilizando sistema de reação composto por um g de óleo de oliva extra virgem, 4 mL de tampão acetato pH 5,6 na concentração de 0,05M e 4 pérolas de vidro ao qual foi adicionado 1 mL solução enzimática bruta contendo 10 mg/mL. O sistema de reação enzimática foi incubado a 40°C em banho termostatizado com agitação de 130 oscilações por minuto por 60 minutos. A reação foi paralisada com a adição de 20 mL de solução de acetona/etanol (1:1 v/v) e os ácidos graxos liberados foram titulados contra solução de KOH 0,05 M utilizando fenolftaleína como indicador. Para cálculo dos resultados de atividade foi utilizado curva padrão de ácido oléico x mL de KOH 0,05 M.

Uma unidade de atividade de lipase é definida como a quantidade de lipase necessária para liberar 1 µmol de ácido graxo por minuto, nas condições descritas.

4.2.2.7 Produção da lipase de *Rhizopus* sp (COSTA & PASTORE, 1997)

Para a produção da lipase de *Rhizopus sp*, foi utilizado meio de cultura composto por farelo de trigo e água na proporção de 40% de água e 60 % de farelo de trigo (p/p). Os frascos Erlenmeyer contendo 20 g do meio de cultura foram esterilizados por 15 minutos a temperatura de 121°C a 1 atm de pressão e posteriormente inoculados com 1 mL de suspensão de esporos, preparada com água destilada esterilizada e com esporos de cultura de 96 horas de crescimento em meio inclinado ágar batata dextrosado (BDA). Os frascos foram incubados a 30°C por 120 horas. Após a incubação foram adicionados 100 mL de água destilada em cada frasco. Os meios de cultura foram homogeneizados com bastão de vidro e após permanecerem em repouso por 1 hora com agitação ocasional, foram filtrados com papel de filtro Whatmam n° 1 e coletados em recipiente único. Foi acrescentado sulfato de amônio ao filtrado em quantidade suficiente para atingir 80% de saturação. A mistura permaneceu por 24 horas a 5°C, para precipitação completa da enzima. A mistura foi centrifugada a 7000 rpm por 15 minutos sob refrigeração. O precipitado foi dialisado contra água destilada por 48 horas a 5°C. Após a diálise o material foi congelado e

liofilizado. O pó obtido foi denominado de preparação enzimática bruta, onde foi medida a atividade lipolítica e a concentração de proteínas.

4.2.2.8 Determinação da atividade da lipase da preparação enzimática obtida da linhagem de *Rhizopus sp* em óleo de oliva

A atividade da lipase da linhagem de *Rhizopus sp* foi realizada utilizando sistema de reação composto por 1 g de óleo de oliva extra virgem, 4 mL de tampão fosfato 0,05 M pH 6,0 e 4 pérolas de vidro ao qual foi adicionado 1 mL da solução enzimática bruta contendo 10 mg/mL. O sistema de reação foi incubado a 40°C em banho termostatizado com agitação de 130 oscilações /min por 60 minutos. A reação foi paralisada com a adição de 20 mL de solução de acetona/etanol (1:1 v/v). Os ácidos graxos livres foram titulados contra solução de KOH 0,05M utilizando fenolftaleína como indicador. Para o cálculo dos resultados de atividade foi utilizada curva padrão de ácido oléico x mL de KOH 0,05 M.

Uma unidade de atividade de lipase é definida como a quantidade de lipase necessária para liberar 1μmol de ácido graxo por minuto, nas condições descritas.

4.2.3 Determinação da concentração de proteínas.

As concentrações de proteínas das soluções enzimática das linhagens de *Aspergillus sp* (1068 e 1099), *Geotrichum sp*, *Rhizopus sp* e *Alcaligenes sp* foram determinadas de acordo com o método de Lowry (LOWRY *et al*, 1951).

4.2.4 Estudo do efeito do tempo de reação na porcentagem de hidrólise de diferentes substratos pelas lipases obtidas

4.2.4.1 Relação entre tempo de reação e porcentagem de hidrólise de diferentes substratos pelas lipase de *Alcaligenes sp.*

Para o estudo do efeito do tempo de reação na porcentagem de hidrólise foram utilizados os substratos: óleo de oliva, óleo de mamona, óleo de girassol, óleo de milho e óleo de soja. Os sistemas de reação enzimática foram preparados de acordo com o item 4.2.2.2. As respectivas misturas foram incubadas a temperatura de 40°C nos seguintes intervalos de tempo: 1, 4, 24, 48, 72 e 96 horas de incubação. Após estes intervalos de tempo as reações foram paralisadas pela adição de 20 mL de solução de acetona/ etanol (1: 1 v/v). Os ácidos graxos liberados foram titulados contra solução de KOH 0,05 M aquosa, utilizando azul de timol como indicador. A porcentagem de hidrólise foi calculada considerando o número de saponificação.

% de Hidrólise = mL de KOH 0,05 M / n de saponificação x 100

Foram retiradas alíquotas dos sistemas de reação para análise dos produtos de hidrólise através de Cromatografia em Camada Delgada (CCD).

4.2.4.2 Relação entre o Tempo de Reação e porcentagem de hidrólise de diferentes substratos pelas lipases das linhagens de *Aspergillus sp* (1068 e 1099).

Os sistemas de reação para os substratos óleo de mamona, óleo de soja, óleo de milho, óleo de girassol e óleo de oliva foram preparados de acordo com o item 4.2.2.5 e incubados nos intervalos de tempo de 1, 4, 24, 48, 72 e 96 horas. A reação foi paralisada pela adição de 20 mL de solução de acetona-etanol (1:1 v/v) e alíquotas de cada intervalo e tempo, foram recolhidas para posterior análise em CCD. Os ácidos graxos liberados foram titulados contra solução de KOH 0,05 M aquosa, utilizando fenolftaleína como indicador.

4.2.4.3 Relação entre o tempo de reação e porcentagem de hidrólise pela lipase de *Rhizopus sp* em diferentes substratos.

Para o estudo de tempo de reação e porcentagem de hidrólise pela lipase de *Rhizopus sp* utilizando os substratos óleo de mamona, óleo de soja, óleo de girassol, óleo de milho óleo de oliva, os sistemas de reação foram preparados de acordo com o item 4.2.2.8 e incubados nos intervalos de tempo de 1, 4, 24, 48, 72 e 96 horas. A reação foi paralisada de acordo com o item 4.1.2.8 e as alíquotas foram recolhidas para análise em CCD. Os ácidos graxos liberados foram titulados contra solução de KOH 0,05 M, utilizando fenolftaleína como indicador.

4.2.4.4 Relação entre o tempo de reação e porcentagem de hidrólise pela lipase de *Geotrichum sp.*

O estudo do tempo de reação e porcentagem de hidrólise de diferentes substratos pela lipase de *Geotrichum sp.* foi realizado nos intervalos de tempo de 1, 4, 24, 48, 72 e 96 horas, utilizando sistema de reação conforme descrito no item 4.2.2.4. Nestes intervalos de tempo as reações foram paralisadas pela adição de 20 mL de solução de acetona/ etanol (1: 1 v/v). Os ácidos graxos liberados foram titulados contra solução de KOH 0,05 M aquosa, utilizando fenolftaleína como indicador.

4.2.5 Determinação do número de saponificação

A 1 g de óleo foram acrescentados 4 mL de tampão Tris – HCL 0,2 M pH 9,0 e 25 mL de solução de KOH alcoólica na concentração de 5,6%.

A mistura de reação foi aquecida à ebulição por 40 minutos e após esse período, a solução de KOH remanescente foi titulada contra solução de HCl 0,05 M utilizando-se fenolftaleína como indicador.

4.2.6 Cromatografia em Camada Delgada (CCD) dos produtos de hidrólise em diferentes substratos pela lipase de *Alcaligenes sp.*

A Cromatografia em Camada Delgada (CCD) foi realizada preparando-se placas de Sílica Gel–60 com 45 g de sílica e 90 mL de solução 0,3 M de Ácido Bórico. A mistura foi aplicada em placas de vidro 20 x 20 com aplicador Desaga. O sistema de solventes (fase móvel) utilizado para a cromatografia foi composto por: éter de petróleo, éter etílico e ácido fórmico na proporção 210: 90: 0,4 (v/v) respectivamente, à temperatura de 25°C. O tempo de desenvolvimento da cromatografia foi de aproximadamente de 45 minutos a 25°C. Foram utilizados como padrões de cromatografia trioleína, dioleína 1,2 (2,3), monoleína 1 (3) e ácido oléico (99% de pureza–Sigma) na concentração de 1%, diluídos em solução de acetona: etanol 1:1 (v/v).

A revelação do cromatograma foi feita incubando-se a placa de cromatografia em cuba de Iodo sublimado, a 110°C por 1 hora.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

II - Utilização dos ácidos graxos liberados da reação de hidrólise obtidos na etapa I da metodologia como precursores na produção de gama-decalactona em processo fermentativo.

O fluxograma abaixo ilustra a produção da gama-decalactona por processo fermentativo.

Fluxograma de produção de gama-decalactona

Hidrólise enzimática do óleo de mamona

Sistema de reação enzimática

⇓

Liberação dos ácidos graxos no sistema de reação enzimática

⇓

O conteúdo dos frascos foi adicionado ao meio de cultura composto de 1% de glicose e 1% de autolisado de levedura

⇓

Ajuste do pH para 6,0 com HCl 1M

⇓

Esterilização do meio de cultura a 121°C por 15 min

⇓

Inoculação do meio de cultura com 1 mL de suspensão microbiana

⇓

Incubação em agitador rotatório a 30°C por 72 horas a 200 rpm

⇓

Centrifugação a 10.000 rpm por 10 min

⇓

Acidificação do líquido sobrenadante do meio de cultura para 2,0 com HCl 1 M

⇓

Extração da gama-decalactona do líquido sobrenadante com solução de acetato de etila contendo o padrão interno β-ionona

⇓

Análise por Cromatografia Gasosa

4.2.7 Produção de gama-decalactona através da biotransformação dos ácidos graxos liberados da reação de hidrólise do óleo de mamona e diferentes substratos.

4.2.7.1 Seleção de microrganismos produtores de gama-decalactona.

4.2.7.1.1 Preparo do pré inóculo para a fermentação

As linhagens selecionadas *Geotrichum fragans* e *Geotrichum sp*, *Pichia membranaefaciens*, 146, 552 e 430, foram cultivadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura inclinados Yeast Malt composto por 1% de glicose, 0,5% de peptona, 0,3% de extrato de malte e 0,3% de extrato de levedura 72 horas a 30°C. Após o período de incubação as culturas foram transferidas para Erlenmeyer contendo 20 mL do Yeast Malt líquido com auxílio de alça de platina estéril. Os frascos foram incubados por 24 horas a 30°C e as culturas foram utilizadas como pré-inóculo.

4.2.7.2 Estudo da Produção de gama-decalactona utilizando óleo de mamona hidrolisado, rico em ácido ricinoléico, como precursor.

Frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 15 mL de meio de cultura composto por 5% de óleo hidrolisado de mamona (p/v) como indutor, 1% de glicose como fonte de carbono e 1% de autolisado de levedura como fonte de nitrogênio e pH ajustado para 6,0 com HCl 1 M, previamente esterilizados foram inoculados com 1 mL de pré-inóculo obtido como descrito no item 4.2.7.1.1. Os frascos foram incubados em agitador rotatório à temperatura de 30°C com agitação de 200 rpm. Após 72 horas de incubação, a análise dos compostos voláteis produzidos no meio de cultivo foi realizada com painel não treinado e os meios de cultura centrifugados a 10 000 rpm por 10 minutos a 10°C. O líquido sobrenadante foi coletado em tubo coletor, selado e armazenado em freezer para posterior análise quantitativa da gama-decalactona produzida.

4.2.7.3 Método de extração de gama-decalactona.

As amostras do líquido sobrenadante obtido no item anterior foram descongeladas, acondicionadas em frascos Erlenmeyer, saturadas com NaCl, sendo o pH ajustado para 2,0 com HCl 1 M e aquecidas à temperatura de 40°C. As amostras foram resfriadas à temperatura ambiente e lavadas duas vezes com 5 mL com solução de acetato de etila e β-ionona utilizado como padrão interno na concentração de 25 mg/250 mL de acetato de etila em funil de separação. A fase orgânica foi filtrada e secada com Na_2SO_4 anidro e acondicionadas em frascos selados até a análise quantitativa por cromatografia gasosa.

4.2.7.4 Condições de análise por Cromatografia Gasosa.

Foi utilizado Cromatógrafo gasoso Chrompack CP 9001 com detector de ionização de chama e uma coluna de separação CP–WAX 52 CB (30 m x 0,32 mm x 0,25 μm). As análises foram realizadas utilizando a temperatura inicial da coluna de 50°C por 2 minutos, aumentando gradativamente 10°C por minuto até temperatura de 230°C onde permaneceu por 3 minutos. A temperatura do detector foi fixada em 250°C, a temperatura do injetor de 220°C empregando gás hélio como gás de arraste na vazão de 1mL/minuto em sistema de injeção splitless por 1 minuto.

4.2.7.5 Condições de Análise por CG-MS.

Foram realizadas análises utilizando-se cromatógrafo gasoso acoplado a um detector seletivo de massa Shimadzu, modelo QP5000. A coluna de separação foi VA-WAX (30m x 0,25mm x 0,25 μm), utilizando as mesmas condições cromatográficas referidas no item 4.2.7.4. Os espectros de massas de cada amostra foram comparados com o padrão autêntico do composto e com dados da biblioteca do aparelho.

4.2.7.6 Cálculo da concentração de gama decalactona no meio de cultura.

Para o cálculo de gama decalactona foi utilizada uma curva padrão de padrão autêntico de gama decalactona x padrão interno, β-ionona em solvente acetato de etila nas concentrações de 0,25 mg, 0,5 mg, 1 mg, 1,25 mg, 2,5 mg, 5, 0 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg e 25 mg. Um microlitro (μL) de cada amostra foi injetada em cromatógrafo a gás nas condições previamente descritas no item 4.2.7.4, estabelecendo a razão padrão externo/ padrão interno (PE/PI), que foi utilizada no cálculo para determinar as concentrações de gama decalactona produzidas no processo fermentativo.

4.2.7.7 Estudo da composição do meio de cultura na produção de gama-decalactona pelas linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans.*

Foram estudadas as seguintes composições de meios de cultura:

Meio de cultura 01: óleo hidrolisado de mamona 5%, autolisado de levedura 1% e glicose 1%.

Meio de cultura 02: glicose 20 g/L, peptona 6 g/L, $MgSO_4$ 0,5 g/L, KH_2PO_4 1,5 g/L e 1 mL dos elementos traços $FeCl_3$ 0,4 g/L, $ZnSO_4$ 0,45 g/L, $MgSO_4$ 0,15 g/L, $CuSO_4.5H_2O$ 0,025 g/L emulsificados com 20 mL de Tween 80 (polioxietileno sorbitan monoestearato), (KAPFER *et al*,1989).

Meio 03: glicose 20 g/L, $NaNO_3$ 0,6 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, KCl 0,5 g/L, $MgSO_4$ 0,5 g/L, 8 mg/L de $CaCl_2$, 1 g/L de extrato de levedura, 2g/L de peptona e 1% de óleo de mamona hidrolisado (BONARME *et al*, 1997).

Meio de cultura 04: $(NH_4)_2 SO_4$ 9,5 g/L, KH_2PO_4 7,8 g/L, Na_2HPO_4 2,2 g/L, $MgSO_4$. 7 H_2O, $CaCl_2$, 6 H_2O 0,11g/L, $ZnSO_4.7H_2O$ 0,0001 g/L e óleo de mamona hidrolisado 1% (SERRANO-CARREON *et al*, 1997).

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Meio de cultura 05: glicose 15 g/L, triptona 0,5 g/L, extrato de levedura 1,0 g/L, extrato de malte 1,0 g/L, casaminoácidos 0,2 g/L, KH_2PO_4 2,0 g/L, de $CaCl_2$ $2H_2O$ 0.13 g/L, $FeSO_4$. 7 H_2O 0,1 g/L, $MgSO_4$ 3 g/L e metil ricinoleato 0,1% (FERON *et al*, 1996).

O pH dos meios foi ajustado para 6,0 com HCl 1M quando necessário. Os frascos foram esterilizados e inoculados com 1 mL de suspensão de células das linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans* contendo 10^6 UFC (unidades formadores de colônia), respectivamente. Após 96 horas de incubação, a análise quantitativa da gama-decalactona produzida foi realizada como descrito nos itens 4.2.7.3 e 4.2.7.4.

4.2.7.8 Efeito da fonte de nitrogênio na produção de gama–decalactona pelas linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans*.

O efeito da fonte de nitrogênio na produção de gama-decalactona pelas linhagens de *Geotrichum fragans* e *Geotrichum sp* foi realizada em meio de cultura composto por 1% de glicose, 5% de óleo hidrolisado de mamona e 1% das fontes de nitrogênio: peptona, uréia, extrato de levedura, autolisado de levedura ou sulfato de amônio. Os frascos contendo o meio de cultivo foram esterilizados em autoclave a 121°C a 1 atm de pressão. Os meios de cultivo foram inoculados com 1 mL de suspensão microbiana preparada conforme método descrito no item 4.2.7.1.1. Após 96 horas de incubação a análise quantitativa da gama-decalactona produzida foi realizada como descrito nos itens 4.2.7.3 e 4.2.7.4.

4.2.7.9 Efeito do pH na taxa de reconversão de gama decalactona pelas linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans*.

Para o estudo da influência do pH na taxa de reconversão de gama-decalactona, 15 mL do meio de cultivo composto por: 5% de hidrolisado de óleo de mamona, 1% de autolisado de levedura e 1% de glicose foram centrifugados e ajustados o pH para 2,0 e 6,0 com HCl 1M. As amostras foram aquecidas a temperatura de 40°C por 30 minutos. Após esse período de tempo a gama-decalactona foi extraída de acordo com o item 4.2.7.3 em seguida de análise por Cromatografia Gasosa como descrito no item 4.2.7.4.

4.2.7.10 Relação entre a porcentagem de hidrolisado de mamona e produção de gama-decalactona.

A 15 mL do meio de cultivo composto por: 1% de glicose e 1% de autolisado de levedura foram adicionadas diferentes concentrações de óleo hidrolisado de mamona nas seguintes concentrações: 1%, 2%, 3%, 4% e 5% (p/v). Os meios foram esterilizados a 121°C a 1 atm de pressão por 15 minutos e inoculados com 1mL de suspensão das linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans* contendo 10^6 U.F.C. Os frascos foram incubados em agitador rotatório por 96 horas a 30°C a 200 rpm. Após esse período, as amostras foram recolhidas e analisadas quanto à produção de gama decalactona de acordo com o item 4.2.7.3 e 4.2.7.4.

4.2.7.11 Relação entre o tempo de fermentação e a produção de gama decalactona.

Frascos de Erlenmeyer contendo 15 mL de meio de cultivo composto por 1% de glicose, 1% de autolisado de levedura e 5% de hidrolisado de óleo de mamona, foram esterilizados a 121°C por 15 minutos e inoculados com 1 mL de suspensão das linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans*. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 30°C a 200 rpm nos intervalos de tempo: 24, 48, 72 e 96 horas. A cada intervalo de tempo as amostras foram recolhidas e a análise sensorial foi realizada. Os meios foram centrifugados a 10.000 rpm a 10°C, acondicionadas em frascos de vidro selados com septo de borracha e armazenados em freezer a –10°C para posterior extração da gama decalactona e análise quantitativa em CG, conforme descrito nos itens 4.2.7.3 e 4.2.7.4.

4.2.7.12 Efeito da temperatura na produção de gama-decalactona

No estudo da influência da temperatura na produção de gama-decalactona, foi utilizado meio de cultura composto por 1% de glicose, 1% de autolisado de levedura e 5% de hidrolisado de óleo de mamona. Os frascos foram esterilizados a 121°C e 1 atm de pressão. Os meios foram inoculados com 1 mL de suspensão das linhagens de *Geotrichum fragans* e *Geotrichum sp* e incubados em agitador rotatório a 200 rpm nas temperaturas:

20°C, 25° C, 30°C e 40°C. Após esse período as amostras foram centrifugadas e acondicionadas em freezer a –10°C até a análise quantitativa em cromatografia gasosa.

4.2.7.13 Efeito do pH inicial do meio de cultura na produção de gama-decalactona

Para o estudo do pH foi utilizado meio de cultura composto por 1% de glicose e 1% de autolisado de levedura e 5% de hidrolisado de óleo de mamona, sendo o pH ajustado para 4,0, 5,0, 6,0 e 7,0 com HCl 1M ou NaOH 1M. Os frascos foram esterilizados a 121°C a 1 atm de pressão por 15 minutos. Os meios foram inoculados com 1 mL de suspensão das linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans* e incubados em agitador rotatório a 30°C por 96 horas a 200 rpm. Após 96 horas de incubação, o conteúdo dos frascos foi centrifugado a 10.000 rpm. No líquido sobrenadante foi medido o pH final, sendo após acondicionadosem frascos de vidro com septo de borracha e armazenados em freezer a –10°C até extração da gama-decalactona e posterior análise quantitativa por cromatografia gasosa de acordo com os itens 4.2.7.3 e 4.2.7.4.

4.2.7.14 Efeito da concentração dos ácidos ricinoléico, linoléico, oléico, esteárico e palmítico na produção de gama decalactona.

Em frascos Erlenmeyer de 50 mL, contendo 15 mL de meio de cultura composto por 1% de glicose e 1% de autolisado de levedura foi adicionado o ácido ricinoléico nas diferentes concentrações: 0,1%, 0,3%, 0,7% do volume total do meio de cultura. Os meios foram esterilizados e inoculados com 1mL de suspensão das linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans*. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 30°C por 96 horas a 200 rpm. Após 96 horas o conteúdo dos frascos foi centrifugado a 10.000 rpm a 10°C por 10 minutos, o líquido sobrenadante foi acondicionado em frascos de vidro, selados para posterior extração e análise quantitativa em cromatografia gasosa.

4.2.7.15 Efeito da concentração de metil ricinoleato na produção de gama decalactona pelas linhagens *de Geotrichum sp e Geoptrichum fragans.*

Em frascos Erlenmeyer contendo 15 mL do meio de cultivo composto por 1% de glicose, 1% de autolisado de levedura foram adicionadas alíquotas de ricinoleato de metila na proporção de 0,1%, 0,3% e 0,7% em relação ao volume final do meio. Os meios foram inoculados com 1 mL de suspensão das linhagens de *Geotrichum fragans* e *Geotrichum sp* e os frascos incubados em agitador rotatório por 96 horas a 30°C. Após esse intervalo de tempo, as amostras foram analisadas quanto `a produção de gama-decalactona de acordo com os itens 4.2.7.2 e 4.2.7.4.

4.2.7.16 Estudo do efeito dos óleos hidrolisados de mamona, soja, milho, girassol e oliva na produção de gama decalactona.

Para este estudo, diferentes óleos hidrolisados pela lipase de *Alcaligenes sp* foram utilizados na concentração de 5% em meio de cultivo composto por 1% de glicose e 1% de autolisado de levedura. Os frascos foram esterilizados e inoculados com 1mL de suspensão das linhagens de *Geotrichum fragans* e *Geotrichum sp*. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 30°C a 200 rpm por 96 horas. Após 96 horas, o conteúdo dos frascos foi centrifugado a 10 000 rpm a 10°C por 10 minutos. O líquido sobrenadante foi recolhido em frascos de vidro com septo de borracha e armazenado em freezer até a extração e análise quantitativa por cromatografia gasosa.

4.2.7.17 Estudo do Efeito do tempo de fermentação na produção de gama decalactona pelas linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans* utilizando os óleos hidrolisados de milho, soja, oliva, girassol e mamona.

Foi realizado o estudo do tempo de fermentação pelas linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans*, utilizando hidrolisados enzimáticos de óleo de soja, oliva, milho, mamona na concentração de 1% como indutores na produção de gama decalactona em meio de cultura composto de 1% de glicose e 1% de autolisado de levedura. Os meios

foram esterilizados e inoculados com suspensão das linhagens de levedura. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 30°C a 200 rpm nos intervalos de tempo de 24, 48, 72 e 96 horas. Após esse período, os frascos foram recolhidos e o conteúdo dos frascos foi centrifugado a 10.000 rpm a 10°C por 10 minutos. O liquido sobrenadante das amostras foi acondicionado em frascos de vidro selados com septo de borracha e armazenados em freezer até a extração e análise quantitativa por cromatografia gasosa (CG).

4.2.7.18 Análise morfológica das linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans* através de elétromicrografia de varredura.

4.2.7.18.1 Preparo das amostras para análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV) (KITAJIMA *et al*, 1999).

Pequenas porções de amostras das culturas de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans* cultivadas em meio de cultura Yeast Malt sólido, cortadas em quadrados de 1 cm de espessura foram preparadas para observação em MEV de acordo com os itens descritos abaixo:

1) Fixação em glutaraldeído

Para a fixação das amostras, foi utilizada uma solução de glutaraldeído dissolvida em tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 7,0. As amostras permaneceram submersas nessa solução à temperatura ambiente por 24 horas.

2) Pós-fixação em Tetróxido de Ósmio (OsO_4)

As amostras pré-fixadas em glutaraldeído foram lavadas por 10 minutos em tampão fosfato de sódio 0,05M e em seguida, imersas em uma solução de Tetróxido de Ósmio a 1% dissolvidos em tampão fosfato de sódio 0,05M pH 7,0 durante 1 hora à temperatura de 25° C em capela.

3) Desidratação

As amostras fixadas em OsO4 foram lavadas com água destilada e a seguir passadas em soluções de concentrações crescentes de álcool etílico (30, 50, 70, 90 e 100%) permanecendo cerca de 10 minutos em cada uma. Na solução a 100% as amostras foram passadas 3 vezes. Ao término da desidratação, as amostras foram submetidas à secagem em Ponto Crítico.

4) Secagem das amostras em Ponto Crítico (PC)

Para se proceder a secagem ao PC, as amostras imersas em etanol foram colocadas em cestos que por sua vez são posicionados no interior de uma câmara hermeticamente fechada, dotada de janela de observação e resfriada por volta de 5 – 6°C. Essa câmara é dotada de um manômetro que têm conexão regulada por uma válvula a um tanque de CO_2 e outra com o meio exterior, também controlado por uma outra válvula. Os resíduos dos solventes foram removidos através de enxágües. Parte do CO_2 foi removido o suficiente para manter as amostras ainda mergulhadas no líquido, acionou-se a válvula e a seguir completou-se de novo o reservatório com CO_2 líquido. A operação foi repetida até assegurar-se que não havia mais resíduos de etanol. A câmara foi novamente cheia com o gás carbônico e a seguir aqueceu-se a câmara. Quando a temperatura atingiu cerca de 30°C ocorreu o PC. Esperou-se a temperatura atingir cerca de 40°C quando então o gás foi eliminado lentamente por cerca de 20 a 30 minutos para a secagem das amostras.

As amostras secas ao PC foram imediatamente aderidas nos "stubs" (porta – espécimen metálico) e cobertas com ouro, para evitar reidratação. As amostras foram analisadas quanto às características morfológicas em Microscópio Eletrônico de Varredura modelo JSM-5800 LV.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudos do Tempo de Reação e Hidrólise dos Diferentes Substratos pelas Lipases das Linhagens de *Rhizopus sp*, *Aspergillus* 1068 e 1099, *Geotrichum sp* e *Alcaligenes sp.*

5.1.1 Relação entre o tempo de reação e porcentagem de hidrólise de diferentes substratos pelas lipases das linhagens de *Aspergillus sp* n°1068 e n°1099.

Para o estudo do tempo de reação e porcentagem de hidrólise de diferentes substratos pelas lipases das linhagens de *Aspergillus sp* n°1068 e n°1099, foram utilizados sistemas de reação contendo os substratos: óleo de soja, óleo de oliva, óleo de milho, óleo de mamona e óleo de girassol preparados como descritos no item 4.2.4.2. O efeito do tempo de reação na porcentagem de hidrólise dos substratos foi acompanhado, incubando-se os sistemas de reação descritos no item 4.2.2.6 por períodos de 1, 4, 24, 48, 72 e 96 horas. As figuras 8 e 9 ilustram os resultados obtidos.

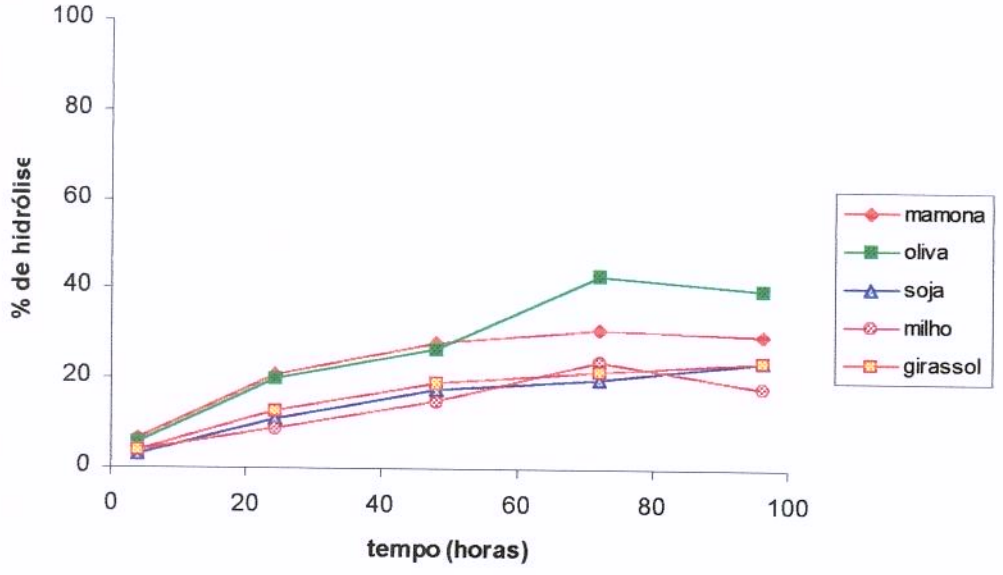


Figura 8. Porcentagem de hidrólise de óleo de mamona, oliva, soja, milho e girassol pela lipase de *Aspergillus sp* n° 1068.

A lipase de *Aspergillus sp* n°1068 apresentou 43,3% de hidrólise no sistema de reação contendo óleo de oliva após 72 horas de incubação a 40°C pH 5,6. A hidrólise máxima no sistema de reação contendo óleo de mamona foi de 31,2% em 96 horas de incubação a 40°C. Nos sistemas de reação contendo óleo de soja e óleo de girassol, a máxima porcentagem de hidrólise obtida foi de 24% após 96 horas de reação. Para o sistema de reação contendo óleo de milho, a porcentagem máxima de hidrólise obtida foi de 18% após 96 horas de incubação.

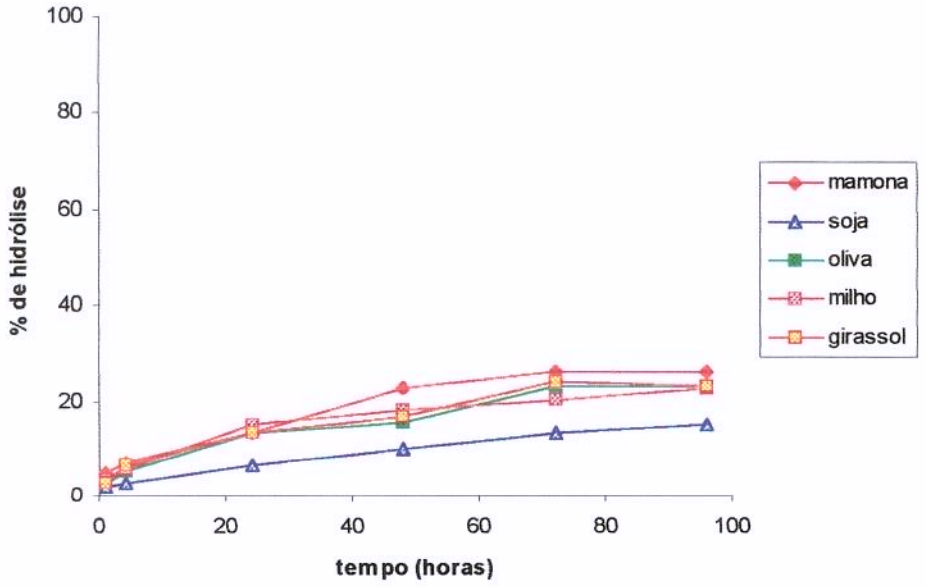


Figura 9. Porcentagem de hidrólise de óleo de mamona, soja, oliva, milho e girassol pela lipase de *Aspergillus sp* n° 1099.

A lipase produzida pela linhagem de *Aspergillus sp* n° 1099 apresentou máxima porcentagem de hidrólise de 26% em óleo de mamona após 72 horas de incubação. Nos sistemas de reação contendo óleo de oliva e girassol, obteve-se porcentagem de hidrólise máxima de 24% e 23% respectivamente após 72 horas de incubação a 40°C. A máxima porcentagem de hidrólise obtida no sistema de reação contendo óleo de soja foi de 12% após 96 horas de incubação.

5.1.2 Relação entre o tempo de reação e porcentagem de hidrólise de diferentes substratos pela linhagem de *Rhizopus sp.*

O estudo do tempo de reação e porcentagem de hidrólise dos substratos óleo de oliva, óleo de soja, óleo de girassol, óleo de mamona, óleo de milho pela lipase de *Rhizopus sp* preparados de acordo com o método descrito no item 4.2.2.8. A figura 10 ilustra os resultados obtidos

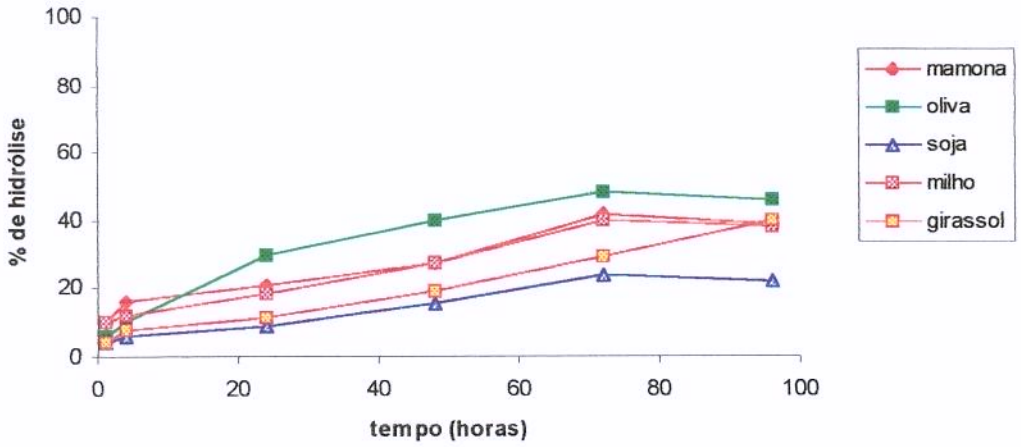


Figura 10. Porcentagem de hidrólise de óleo de mamona, oliva, soja, milho e girassol pela lipase de *Rhizopus sp.*

Neste experimento, podemos verificar que a porcentagem de hidrólise máxima de 50% foi obtida em sistema de reação contendo óleo de oliva após 72 horas de incubação. Nos sistemas de reação contendo óleo de mamona e óleo de milho, foi obtido total de 47% e 42,4% de hidrólise após 72 horas de incubação a 40°C, pH 6,0. Para os óleos de soja e girassol, a porcentagem de hidrólise foi de 24,4% e 40,3% respectivamente.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

5.1.3 Relação entre o tempo de reação e porcentagem de hidrólise de diferentes substratos pela lipase da linhagem de *Geotrichum sp.*

O estudo do tempo de reação e porcentagem de hidrólise de diferentes substratos pela lipase da linhagem de *Geotrichum sp* foi acompanhado incubando–se os sistemas de reação preparados conforme descrito no item 4.2.4.4. A figura 11 ilustra os resultados obtidos.

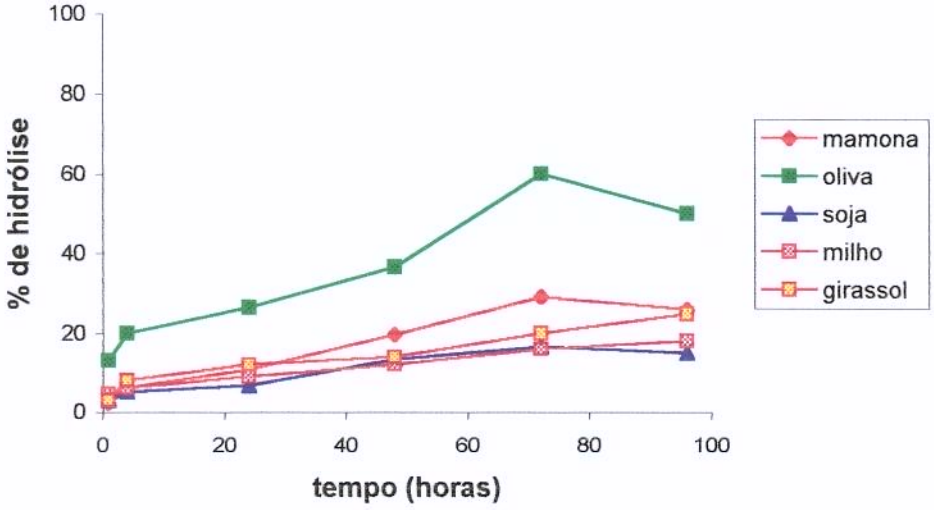


Figura 11. Porcentagem de hidrólise de óleo de mamona, oliva, soja, milho e girassol pela lipase de *Geotrichum sp.*

A porcentagem máxima de 62% de hidrólise obtida neste experimento foi no sistema de reação contendo óleo de oliva. Em sistema de reação contendo óleo de mamona como substrato, foi obtido 27% de hidrólise após 72 horas de incubação a 37°C, pH 7,0. No sistema de reação contendo óleo de milho, a porcentagem máxima de hidrólise obtida foi de 18,1% após 96 horas de incubação. Os sistemas de reação contendo óleo de girassol e óleo de soja apresentaram máxima porcentagem de hidrólise de 25,5% e 16,6% após 72 horas de incubação a 37°C.

5.1.4. Relação entre o tempo de reação e porcentagem de hidrólise de diferentes substratos pela lipase de *Alcaligenes sp.*

O estudo do tempo de reação e porcentagem de hidrólise dos substratos óleo de milho, óleo de girassol, óleo de oliva, óleo de mamona e óleo de soja pela linhagem de *Alcaligenes sp*, foi realizado de acordo com o método descrito no item 4.2.4.1.
A figura 12 ilustra os resultados obtidos.

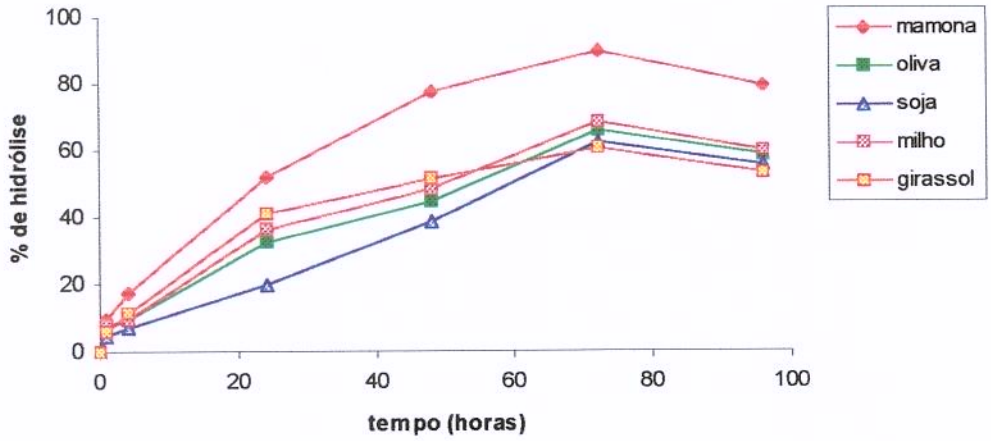


Figura 12. Porcentagem de hidrólise de óleo de mamona, oliva, soja, milho e girassol pela lipase de *Alcaligenes sp.*

Pode-se verificar que o sistema de reação contendo óleo de mamona apresentou porcentagem de hidrólise máxima de 89,5% após 72 horas de reação a 40°C e pH 9,0. Para os sistemas de reação contendo óleo de girassol e óleo de milho, foi obtida hidrólise máxima de 67% após 72 horas de incubação. No sistema de reação contendo óleo de oliva, obteve-se hidrólise máxima de 66%. A máxima porcentagem de hidrólise obtida em sistema de reação contendo óleo de soja, foi de 50% após 96 horas de reação a 40°C.

A tabela 7 mostra a concentração de proteínas obtidas pelo método de Lowry (LOWRY *et al*, 1951) e a atividade específica das lipases estudadas.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRA
SEÇÃO CIRCULANTE

Tabela 7. **Concentração de proteínas e atividades específicas das preparações de lipases.**

Preparações de Lipases	**Concentração de proteína (mg/mL)**	**Lipase Atividade específica (U/mg proteína)**
Aspergillus sp 1068	23	0,28
Aspergillus sp 1099	27	0,18
Rhizopus sp	5,3	1,30
Geotrichum sp	12,6	0,68
Alcaligenes sp	5,6	1,60

5.1.5 Relação entre o tempo de reação e porcentagem de hidrólise de óleo de mamona pelas lipases de *Aspergillus sp* 1068, *Aspergillus sp* 1099, *Geotrichum sp*, *Rhizopus sp* e *Alcaligenes sp*.

O estudo da relação entre o tempo de reação e porcentagem de hidrólise de óleo de mamona das lipases microbianas foi realizado como descrito nos itens 4.2.4.1 a 4.2.4.4. A figura 13 ilustra os resultados obtidos.

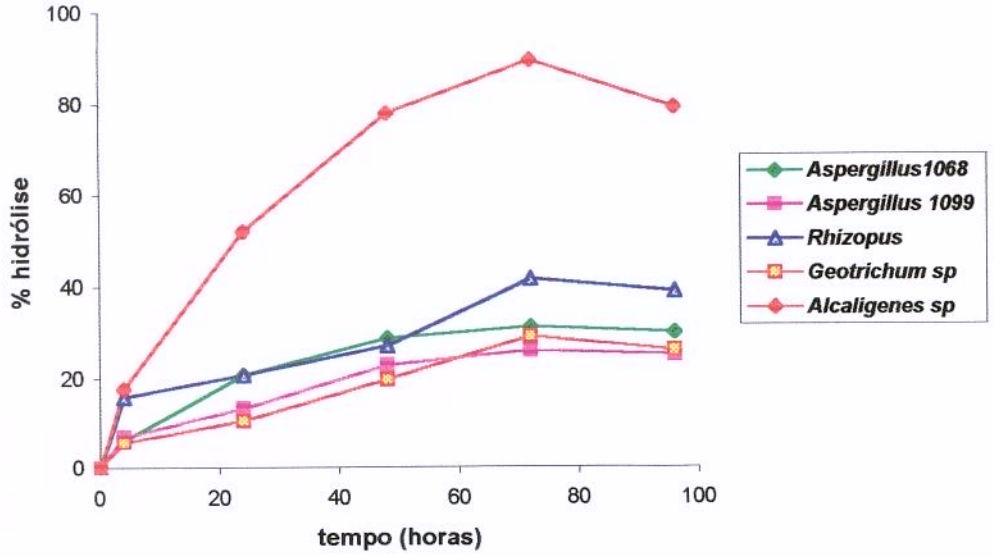


Figura 13. Porcentagem de hidrólise do óleo de mamona pelas lipases microbianas.

Observou-se neste experimento que entre as lipases microbianas testadas em sistema de reação enzimática contendo óleo de mamona como substrato, a lipase de *Alcaligenes sp* apresentou máxima porcentagem de hidrólise de 89,5% sendo escolhida, portanto para o estudo de utilização do hidroxiácido graxo liberado da reação de hidrólise catalisada por esta lipase bacteriana no substrato óleo de mamona e dos ácidos graxos liberados da reação de hidrólise dos substratos óleo de milho, óleo de oliva, óleo de girassol e óleo de soja na biossíntese do composto de aroma gama–decalactona. A figura 14 mostra a cromatografia em camada delgada (CCD) dos produtos de hidrólise de óleo de oliva pela lipase de *Alcaligenes sp,* enquanto que a figura 15 mostra a hidrólise dos substratos óleo de girassol, óleo de milho e óleo de mamona.

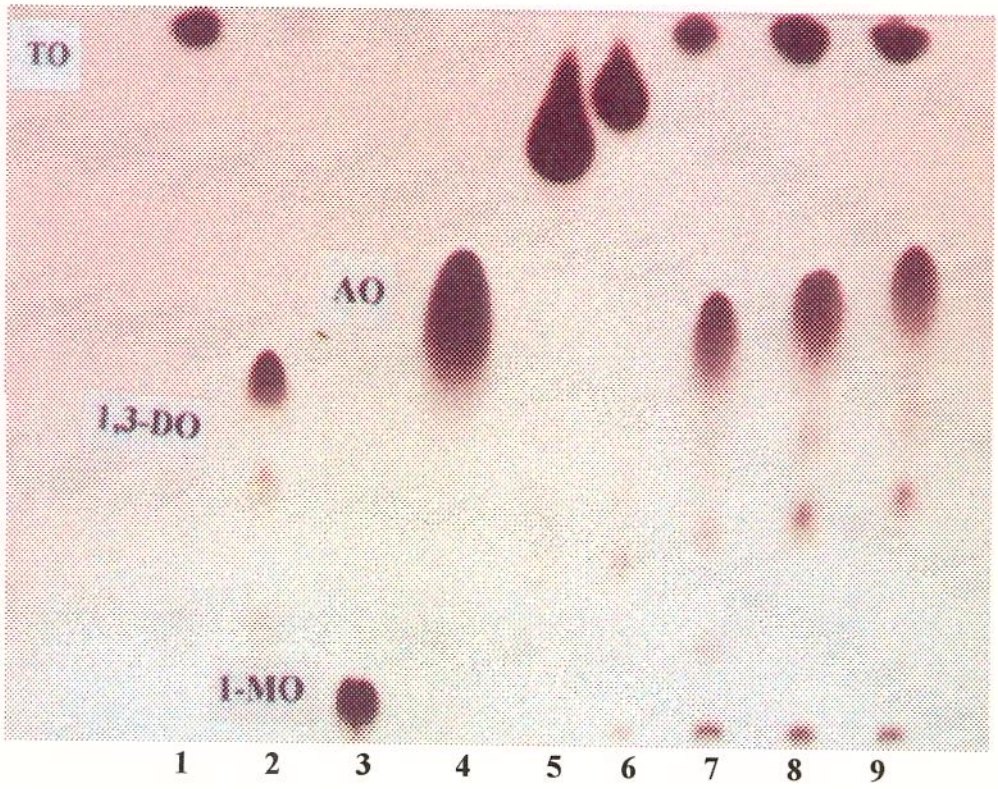


Figura 14. Cromatografia em Camada Delgada (CCD) dos produtos de hidrólise de óleo de oliva pela lipase de *Alcaligenes sp*

(1) Trioleína
(2) Dioleína
(3) (1) -Monoleína
(4) Ácido Oléico

5- 0 hr de reação
6- 6 horas de reação
7- 24 horas de reação
8- 48 horas de reação
9-72 horas de reação

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

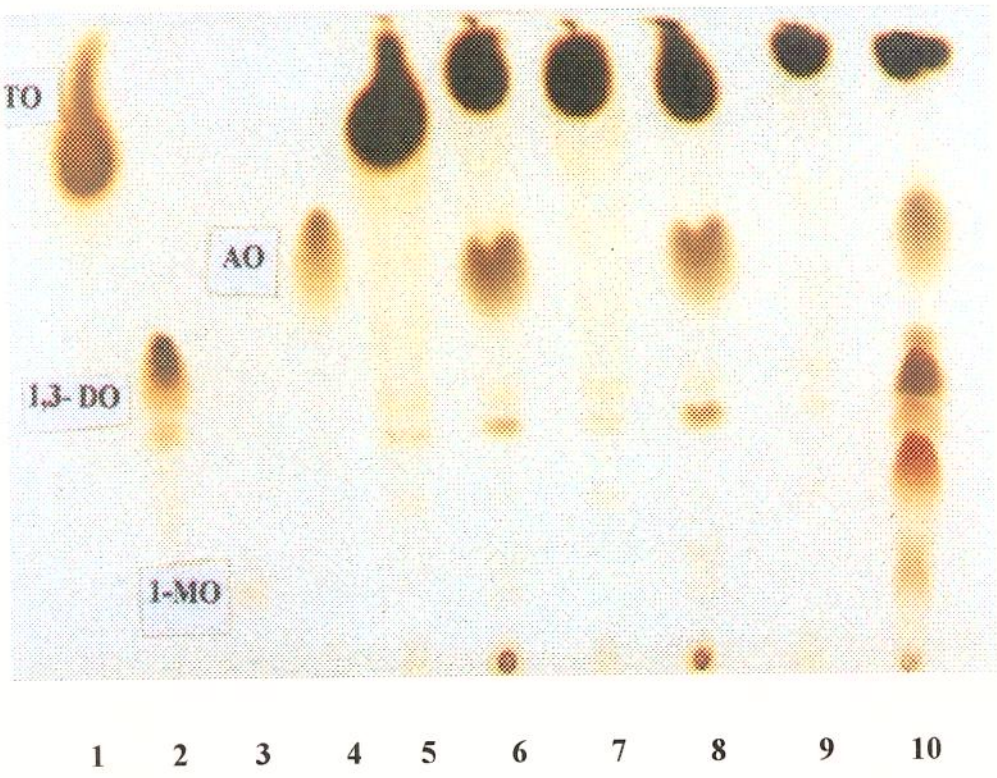


Figura 15. Cromatografia em Camada Delgada (CCD) dos produtos de hidrólise de diferentes substratos pela lipase de *Alcaligenes sp.*

(1) Trioleína
(2) Dioleína
(3) (1)- Monoleína
(4)-Ácido Oléico

5-0 hora de reação- Óleo de Girassol
6-24 horas de reação-Óleo de Girassol
7-0- horas de reação-Óleo de Milho
8- 24 horas de reação-Óleo de Milho
9- 0 horas de reação- Óleo de Mamona
10-24 horas de reação- Óleo de Mamona

Pode–se verificar pelos cromatogramas obtidos que a lipase de *Alcaligenes sp* foi hábil em hidrolisar os diferentes triglicerídeos testados liberando como produtos finais monoglicerídeos, diglicerídeos (1,2), (2,3) e ácidos graxos em 24 horas de reação de hidrólise. Os resultados obtidos foram importantes para a escolha da lipase de *Alcaligenes* para a hidrólise de triglicerídeos e aplicação dos produtos de hidrólise como precursores na produção de gama-decalactona.

As aplicações das lipases na indústria oleoquímica são extensas. Óleos e gorduras são produzidos mundialmente chegando a faixa de $6x\ 10^7$ toneladas/ ano sendo que uma parte substancial ($> 2x\ 10^6$ t/ano) é utilizada nas reações de hidrólise, alcoólisis e glicerólisis. Os produtos destas três reações são usados extensivamente na industria cosmética e de alimentos (VUFSON, 1993). Um processo de grande aplicação industrial é a hidrólise de óleos e gorduras, como o óleo de oliva para a produção de ácidos graxos e glicerol. O processo convencional na produção destes ácidos graxos envolve gastos de energia e produzem compostos que necessitam ser purificados. Por outro lado, a utilização de lipases requer temperaturas brandas de reação além de baixo custo de energia (GANDHI, 1997).

Lipases microbianas podem ser utilizadas na hidrólise de triglicerídeos contendo hidroxiácidos graxos (HFA) com potencial uso destes ácidos graxos hidroxilados na indústria de cosméticos, revestimento para tintas e na indústria de alimentos (HAYES *et al*, 1996). Vários estudos são relatados na literatura envolvendo a utilização de lipases microbianas na hidrólise de óleo e gorduras visando a aplicação industrial.

YAMAMOTO *et al* (1988) estudou as propriedades da lipase de *Pseudomonas sp* na hidrólise de diferentes óleos vegetais. A lipase de *Pseudomonas sp* hidrolisou eficientemente os óleos de oliva com 100% de hidrólise, óleo de algodão 108%, óleo de milho 104% e óleo de mamona 107%.

A figura 16 ilustra o fluxograma de produção da lipase da linhagem de bactéria *Alcaligenes sp*. A figura 17 ilustra o crescimento da linhagem de *Alcaligenes sp* em meio de cultura sólido e a figura 18 a micrografia óptica da linhagem de *Alcaligenes sp* corada pelo método de Gram.

Figura 16. Fluxograma de produção da lipase de *Alcaligenes sp*.

Fermentação em frascos a 30°C com agitação de 200 rpm.

↓

Centrifugação (5000 rpm x 25 min a 5°C)

↓

Sobrenadante

↓

Fracionamento com Sulfato de Amônio (80% de saturação)

↓

Centrifugação (5000rpm x 25 min a 5°C)

↓

Precipitado

↓

Diálise (contra água destilada a 5°C)

↓

Diálise (contra tampão Tris – HCl 0,05M pH 9,0)

↓

Enzima bruta

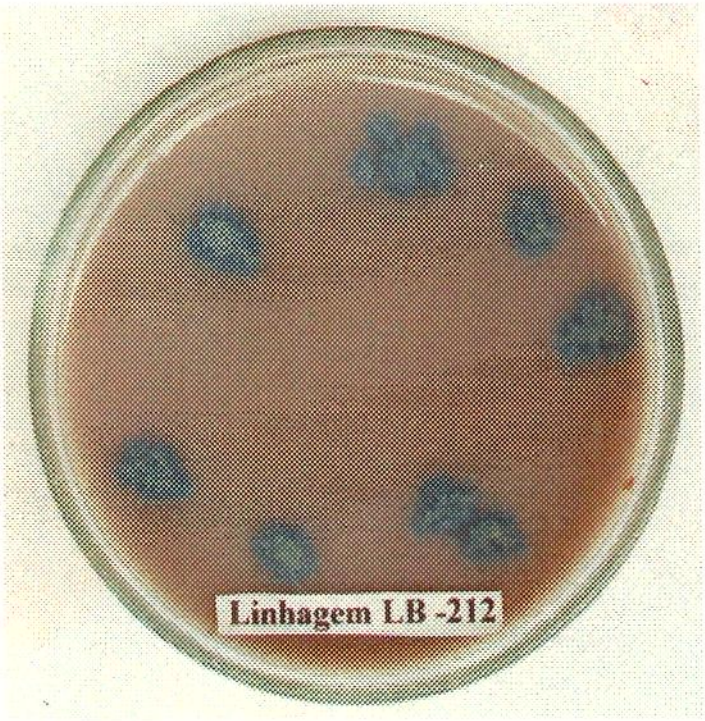


Figura 17. Crescimento da linhagem de *Alcaligenes sp*, produtora de lipase alcalina em meio de cultura sólido contendo o corante "Victória blue" como indicador.

Figura 18. Micrografia óptica da linhagem de *Alcaligenes sp* (1000 x), coloração de Gram. Visualiza-se bactéria em forma de bastonetes Gram–negativo.

5.2 Produção de γ–decalactona, composto de aroma, através da biotransformação de ácidos graxos obtidos através da ação hidrolítica da lipase de *Alcaligenes sp* em diferentes substratos.

5.2.1. Seleção de Microrganismos Produtores de gama-decalactona.

Para a seleção dos microrganismos produtores de gama-decalactona, utilizou-se fermentação líquida contendo meio de cultura composto por 1% de glicose, 1% de autolisado de levedura e 5% de óleo hidrolisado de mamona, preparado como descrito no item 4.2.7.2. Após 72 horas de incubação, as amostras foram analisadas qualitativamente em relação ao aroma produzido através de painel não treinado. As análises quantitativas foram realizadas através do método descrito no item 4.2.7.3 e 4.2.7.4. A tabela 8 ilustra os resultados obtidos.

Tabela 8. **Produção de gama-decalactona pelas linhagens de *Geotrichum fragans, Geotrichum sp, Pichia membranaefaciens* e linhagens n° 146, 430 e 552.**

Linhagem	Produção de gama – decalactona (mg/L)
146	34,7
430	34,3
552	25
Geotrichum fragans	**274,7**
Geotrichum sp	**162,6**
Pichia membranaefaciens	**60,8**

As linhagens identificadas como *Geotrichum fragans* e *Geotrichum sp*, foram selecionadas entre seis linhagens de levedura por se apresentarem potencialmente produtoras de gama-decalactona.

De acordo com os resultados ilustrados na tabela, as linhagens de *Geotrichum fragans* e *Geotrichum sp*, apresentaram produção de gama–decalactona de 274 mg/L e 162 mg/L em 72 horas de incubação na temperatura de 30°C a 200 rpm, quando foi utilizado

meio de cultura composto por 1% de glicose, 1% de autolisado de levedura e 5% de óleo de mamona hidrolisado. A tabela 9 ilustra a avaliação do aroma produzido pelas linhagens produtoras de gama–decalactona através da biotransformação do óleo hidrolisado de mamona, rico em ácido ricinoléico, em meio de cultura composto por 1% de autolisado de levedura, 1% de glicose e 5% de solução contendo 1 g de óleo hidrolisado de mamona, por painel não treinado.

Tabela 9. **Avaliação sensorial por painel não treinado do aroma produzido pelas linhagens selecionadas como produtoras de gama-decalactona em meio de cultura composto por 1% de glicose, 1% de a autolisado de levedura e 5% de solução contendo óleo de mamona hidrolisado.**

	Avaliador									
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	
Linhagem	**A**	**A**	**A**	**A**	**A**	**A**	**A**	**A**	**A**	**Aroma**
146	++	+++	++	+	++	++	++	++	++	frutal
250	+++	+	+	+	++	+	+	+	+++	fermento
430	+	+	+	++	++	++	++	++	+	banana/ solvente
552	+	+	++	++	++	+++	++	++	++	banana
Geotrichum fragans	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	++	+++	frutal doce
Geotrichum sp.	+++	++	+++	+++	+++	+	++	++	+++	frutal doce

Legenda: A= grau de aceitabilidade

+ = pouco agradável

++ = agradável

+++= muito agradável

Por serem efetivas na produção de gama–decalactona através da bioconversão de ácidos graxos presentes no óleo de mamona hidrolisado, as linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans* foram estudadas em relação aos parâmetros de produção de gama–

decalactona: composição do meio de cultura, fonte de nitrogênio, temperatura ótima, pH inicial do meio de cultura, efeito de diferentes ácidos graxos no meio de cultura, o tempo de fermentação e produção de gama–decalactona.

As figuras 19 e 20 ilustram o crescimento das linhagens de *Geotrichum fragans* e *Geotrichum sp* em placa de Petri contendo meio de cultura Yeast Malt composto por 1% de glicose, 0,5% de peptona, 0,3% de extrato de malte, 0,3% de extrato de levedura após 48 horas de crescimento. As figuras 21 e 22 ilustram a micrografia eletrônica de varredura das linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans*.

As tabelas 10 e 11 apresentam as características morfológicas das linhagens estudadas.

Figura 19. Colônias de *Geotrichum fragans* cultivadas em meio de cultura Yeast Malt Ágar com 48 horas de crescimento.

Figura 20. Colônias de *Geotrichum sp* cultivadas em meio de cultura Yeast Malt Ágar com 48 horas de crescimento.

Tabela 10. **Características morfológicas da linhagem de *Geotrichum fragans***

Morfologia em meio sólido	Cor: branca Forma: tissular Superfície: hirsuta Brilho: opaca Borda: ramificada Elevação: plana Textura: Friável
Morfologia em meio líquido	Forma: cilíndrica, globosa e filamentosa Reprodução: fissão binária Sedimento: floculento Película: rugosa e espessa Anel: completo e espesso
Esporulação	Ausente
Microcultivo	Micélio verdadeiro: presente Artroconídio: presente Pseudohifas: ausente

Fonte: Laudo de identificação da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia " André Tosello"

Tabela 11. **Características morfológicas da linhagem de *Geotrichum sp.***

Morfologia em meio de cultura sólido	Cor: branca Sem profundidade Borda irregular Sem odor ou brilho
Morfologia em meio de cultura líquido	Forma: células cilíndricas longas Formação de Película espessa Reprodução: fissão binária Anel: completo e espesso
Esporulação	Ausente
Microcultivo	Micélio verdadeiro: presente Pseudohifas: ausentes Artroconídio: presente

Fonte: MACEDO, 1995.

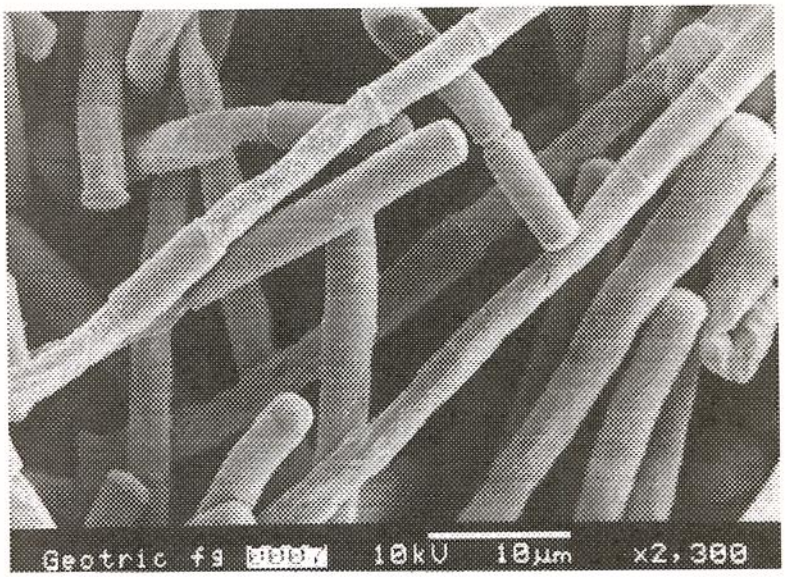


Figura 21. Micrografia eletrônica de varredura da linhagem de *Geotrichum fragans* em meio de cultura Yeast Malt com 48 horas de crescimento. Visualiza-se células cilíndricas filamentosas e presença de artroconídios.

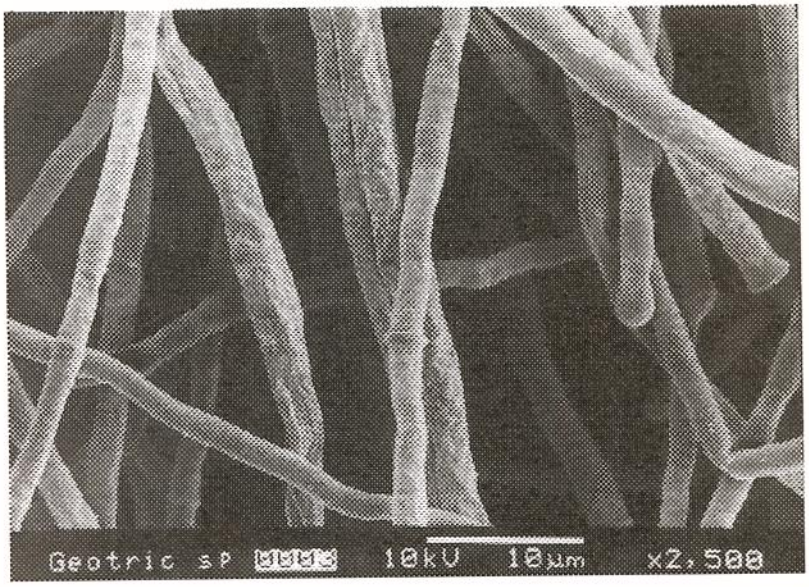


Figura 22. Micrografia eletrônica de varredura da linhagem de *Geotrichum sp* em meio de cultura Yeast Malt com 48 horas de crescimento. Visualiza-se células cilíndricas filamentosas, micélio verdadeiro.

5.2.2. Estudos dos Parâmetros de Produção de gama–decalactona pelas linhagens de *Geotrichum fragans* e *Geotrichum sp.*

5.2.2.1 Estudo da composição do meio de cultura na produção de gama–decalactona pela linhagem de *Geotrichum sp.*

O estudo da composição do meio de cultivo e produção de gama-decalactona pela linhagem de *Geotrichum sp* foi realizado de acordo com o método descrito no item 4.2.7.7.

Os resultados do melhor meio de cultivo para a produção de gama–decalactona por *Geotrichum sp* estão dispostos na figura 23.

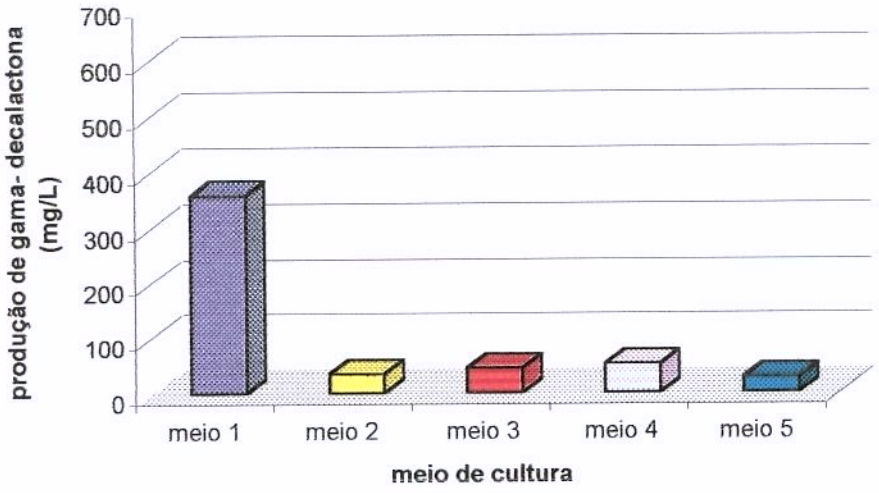


Figura 23. Estudo da composição de meios de cultura e produção de gama–decalactona pela linhagem de *Geotrichum sp.*

Foi obtida produção máxima de gama-decalactona de 370 mg/L quando se utilizou o meio de cultura n°1, composto por 1% de glicose, 1% de autolisado de levedura e 5% de óleo de mamona hidrolisado incubado a 30°C por 96 horas a 200 rpm. No meio de cultura n°2 composto por glicose 20g/L, peptona 6g/L, KH_2PO_4 1,5 g/L e 1 mL de solução contendo $FeCl_3$, $ZnSO_4$ e $MgSO_4$ emulsificados com Tween 80 (KAPFER *et al*, 1989) a produção de gama-decalactona obtida foi de 34 mg/L. Quando a linhagem de *Geotrichum*

sp foi cultivada no meio de cultura n°3 composto por $NaNO_3$ 0,6 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, KCl 0,5 g/L, $MgSO_4$ 0,5 g/L, $CaCl_2$ 8 mg/L, extrato de levedura 1 g/L, peptona 2 g/L e 1% de óleo hidrolisado de mamona (BONARME *et al*, 1997), foi obtida uma produção de 44 mg/L. No meio de cultura n°4, composto por NH_4SO_4 9,5 g/L, KH_2PO_4 7,8 g/L, Na_2HPO_4 2,2 g/L, $MgSO_4$ 1,7 g/L, $CaCl_2$ 0,11 g/L, $ZnSO_4$ 0,00011 g/L e 1% de óleo de mamona hidrolisado (SERRANO-CARREON *et al*,1997), foi obtida a produção de 48 mg/L de gama-decalactona. A produção de 30 mg/L foi encontrada quando a linhagem de *Geotrichum sp* foi cultivada no meio de cultura n°5 composto por glicose 15 g/L, triptona 0,5 g/L, extrato de malte 1 g/L, extrato de levedura 1 g/L, casaminoácidos 0,2 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, $CaCl_2$ 0,13 g/L, $FeSO_4$ 0,01g/L , $MgSO_4$ 3 g/L, acrescido de 0,1% de metil ricinoleato (FERON *et al*, 1996) após 96 horas de incubação.

5.2.2.2 Estudo da composição do meio de cultura na produção de gama – decalactona pela linhagem de *Geotrichum fragans*.

O estudo da composição do meio de cultivo e produção de gama-decalactona pela linhagem de *Geotrichum fragans* foi realizado de acordo com o método descrito no item 4.2. 7.7. A figura 24 ilustra os resultados obtidos.

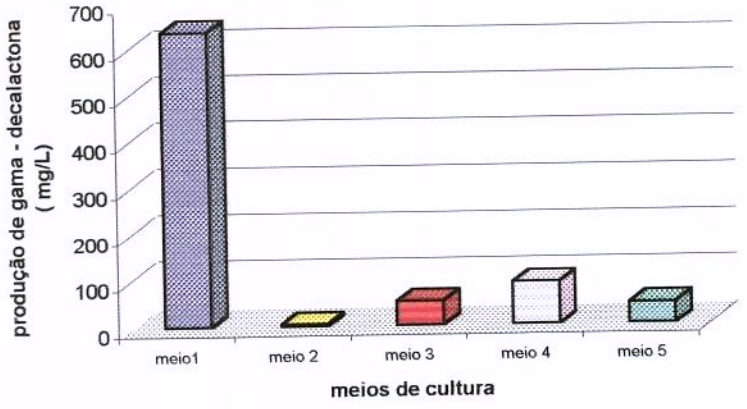


Figura 24. Estudo da composição do meio de cultura e produção de gama-decalactona pela linhagem de *Geotrichum fragans*.

A produção máxima de gama-decalactona de 650 mg/L foi obtida utilizando-se a linhagem de *Geotrichum fragans* meio de n°1 cultura composto por 1% de glicose, 1% de autolisado de levedura e 5% de óleo hidrolisado de mamona.

O meio de cultura n° 2 (KAPFER *et al*, 1989), mostrou-se pouco efetivo para a produção de gama–decalactona para a linhagem de *Geotrichum fragans*, sendo obtida uma produção de 5,4 mg/L após 96 horas de incubação. Por outro lado, produções de 52,8 mg/L para o meio de cultura n°3 (BONARME *et al* ,1997) e 91,6 mg/L para o meio de cultura de n° 4 (SERRANO–CARREON *et al*, 1997) foram obtidas após 96 horas de incubação. Quando se utilizou o meio de cultura de n° 5 (FERON *et al*, 1996), uma produção de 45 mg/L foi obtida.

Podemos verificar pelos resultados obtidos neste estudo, que a composição do meio de cultura afetou de forma significativa a produção do composto de aroma gama-decalactona. A produção do composto de aroma foi mais significativa nos meios de cultura contendo óleo de mamona hidrolisado ou derivados como o metil ricinoleato tanto para a linhagem de *Geotrichum sp* quanto para a linhagem de *Geotrichum fragans* o que sugere que estes compostos devem ser fundamentais para a produção de gama-decalactona pelas linhagens estudadas. Os resultados obtidos neste experimento foram diferentes dos obtidos por KAPFER *et al* (1989), que estudaram a produção de gama-decalactona em sistema de fermentação contínua pela linhagem de *Tyromyces sambuceus* utilizando o meio de cultura de n° 2 obtendo uma produção de 330 mg/L. FERON *et al* (1996) investigaram a produção de gama-decalactona por linhagens de *Sporidiobolus salmonicolor* e *Sporidiobolus ruinenii* utilizando o meio de cultura n°5. Os autores obtiveram uma produção de 500 mg/L após 130 horas de incubação para a linhagem de *Sporidiobolus salmonicolor* e 1,6 g/L de gama-decalactona após 216 horas de incubação para a linhagem de *Sporidiobolus ruinenii.*

5.2.2.3 Efeito da fonte de nitrogênio na produção de gama-decalactona pela linhagem de *Geotrichum fragans.*

A produção máxima de gama–decalactona por *Geotrichum sp* foi obtida quando se utilizou autolisado de levedura como única fonte de nitrogênio, em meio de cultura composto por: 1% de glicose e 5% de óleo de mamona hidrolisado após 96 horas de incubação a 30°C. A figura 25 ilustra os resultados obtidos.

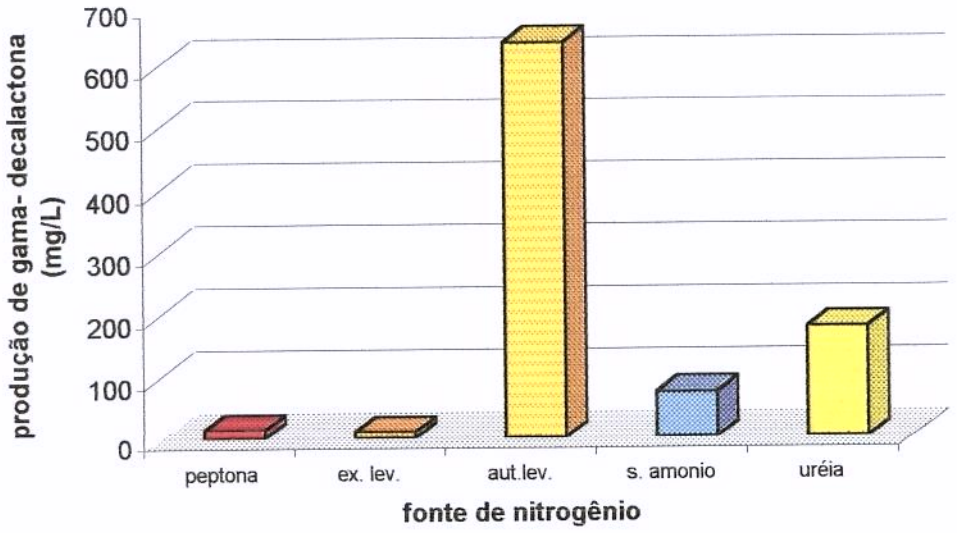


Figura 25. Efeito da fonte de nitrogênio na produção de gama-decalactona pela linhagem de *Geotrichum fragans.*

A melhor fonte de nitrogênio para a produção de gama–decalactona pela linhagem de *Geotrichum fragans* foi o autolisado de levedura. No meio de cultura contendo essa fonte de nitrogênio foi obtido 650 mg/mL de gama-decalactona. Uma produção de gama-decalactona de 178,5 mg/L foi obtida quando se utilizou uréia como fonte de nitrogênio. Nos meios de culturas contendo sulfato de amônio e extrato de levedura foram obtidas uma produção de 74,5 mg/L e 10 mg/L respectivamente.

5.2.2.4 Efeito da fonte de nitrogênio na produção de gama-decalactona pela linhagem de *Geotrichum sp.*

O estudo referente ao efeito da fonte de nitrogênio na produção de gama–decalactona pela linhagem de *Geotrichum sp* foi realizado de acordo com item 4.2.7.8. A figura n°26 ilustra os resultados obtidos.

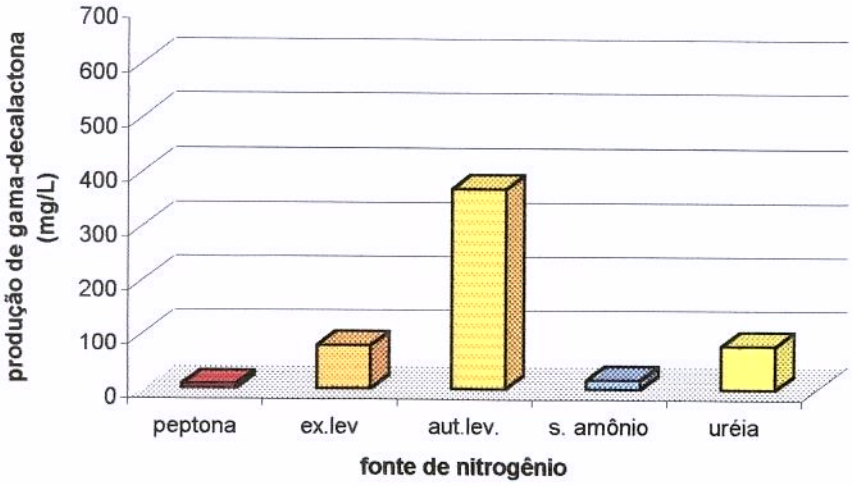


Figura 26. Estudo do efeito da fonte de nitrogênio na produção de gama–decalactona pela linhagem de *Geotrichum sp.*

A produção máxima de gama–decalactona, 370 mg/L foi obtida quando se utilizou 1% de autolisado de levedura no meio de cultura incubado a 30°C por 96 horas a 200 rpm. No meio de cultura contendo uréia como fonte de nitrogênio a produção de gama-decalactona foi de 80 mg/L. As fontes de nitrogênio: peptona, sulfato de amônio foram pouco efetivas na produção de gama-decalactona, afetando também a qualidade do aroma produzido no meio de cultura.

LANZA *et al* (1976), também investigaram o efeito da fonte de nitrogênio na qualidade do aroma produzido por culturas de *Ceratocystis moniliformes.* Foi obtido aroma característico de banana quando se utilizou isoleucina, leucina ou norleucina como fonte orgânica de nitrogênio.

YONG *et al,* (1985) investigaram o efeito da fonte de nitrogênio na produção da lactona saturada 6-pentil-α-pirona, responsável pelo aroma característico de coco por linhagem de *Trichoderma viride*. Os autores observaram que nos meios de cultura contendo histidina, isoleucina, metionina e triptofano como fonte orgânica de nitrogênio o aroma característico de coco não foi produzido, enquanto que nos meios de cultura contendo fenilalanina, um aroma característico de coco com uma leve nota de mel foi obtido.

5.2.2.5 Efeito do pH na extração e porcentagem de reconversão total de gama–decalactona pelas linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans.*

A porcentagem de reconversão da gama-decalactona extraída do líquido sobrenadante da cultura acidificado para pH 2,0 e 6,0 respectivamente, foi verificada de acordo com o método descrito no item 4.2.7.9. A figura 27 ilustra os resultados obtidos.

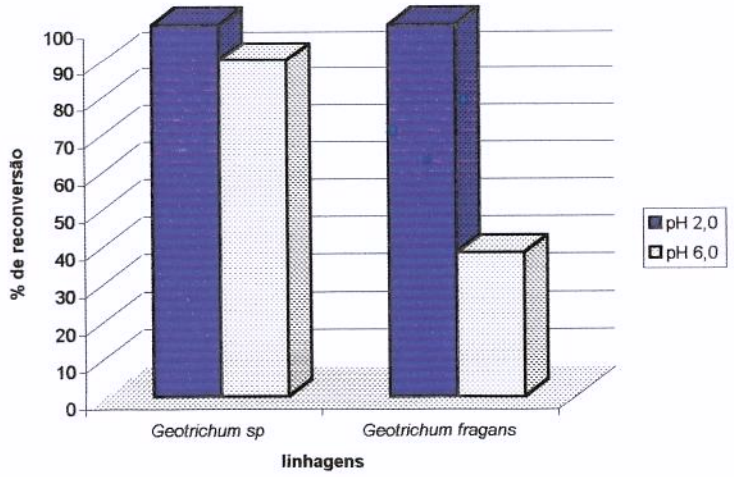


Figura 27. Porcentagem de reconversão de gama-decalacatona pelas linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans* em pH 2,0 e 6,0.

A taxa de reconversão de gama–decalactona em pH 6,0 para a linhagem de *Geotrichum sp* foi de 87,8%, equivalente a 332 mg/L. Após o ajuste do pH do meio de

cultura para 2,0, obteve-se um acréscimo de 12,7% de reconversão da gama–decalactona. A taxa de reconversão total (100%) foi de 378 mg/L. A linhagem de *Geotrichum fragans* apresentou taxa de reconversão de gama–decalactona em pH 6,0 de 30,46%, equivalente a 198 mg/L. Quando o pH do meio de cultura foi ajustado para 2,0, obteve-se uma reconversão de 69,5%. A taxa total de reconversão (100%) foi equivalente a 650 mg/L.

Vários estudos citados na literatura (FARBOOD, *et al.* 1983; GATFIELD, 1995; DUFOSSÉ *et al* 1998) relatam a obtenção de gama-decalactona através da extração por solvente orgânico. Para a eficiência na obtenção de lactonas, são necessárias etapas essenciais no processo de conversão como o aquecimento e/ou acidificação do meio de cultura até pH 1,5–2,0. Os resultados obtidos neste experimento foram semelhantes aos obtidos por FERON *et al*, (1996) em estudos realizados com linhagens de leveduras do gênero *Sporidiobolus ruinenii* e *Sporidiobolus salmonicolor* em meio de cultura contendo metil-ricinoleato. Foi observado que a acidificação do meio de cultura para pH 1,0 com HCl 2,5 N antes da extração da gama-decalactona, a concentração de gama-decalactona aumentou em cerca de 2,5 vezes: de 1,6 g/L para 4,0 g/L. No entanto, nenhum aumento foi verificado após a acidificação do meio e cultura para a extração de gama-decalactona produzida pela linhagem de *Sporidiobolus salmonicolor*, indicando que o metil–ricinoleato utilizado como substrato na produção do composto gama-decalactona foi convertido para gama-decalactona e liberado no meio de cultura.

5.2.2.6 Efeito da temperatura na produção de gama–decalactona pelas linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans.*

O efeito da temperatura na produção de gama-decalactona foi testado incubando–se os meios de cultura preparados de acordo com o item 4.2.7.12 nas temperatura de 20°C, 25°C, 30°C, 35°C e 40°C por 96 horas a 200 rpm. A figura 28 ilustra os resultados obtidos.

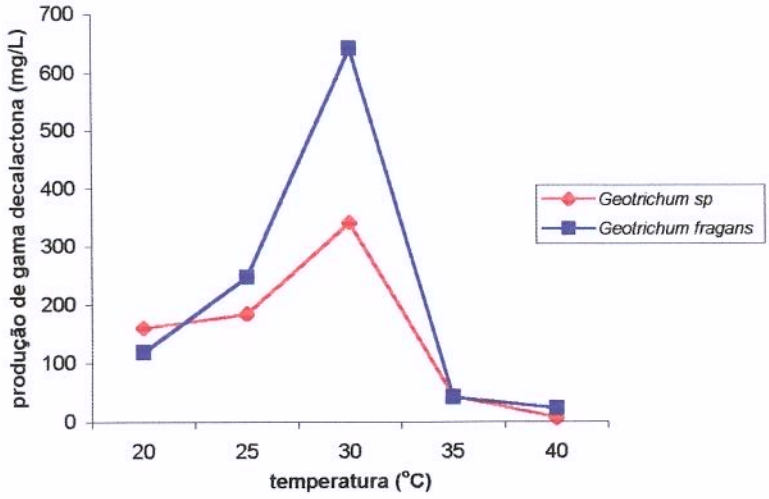


Figura 28. Efeito da temperatura na produção de gama-decalactona pelas linhagens de *Geotrichum fragans* e *Geotrichum sp.*

Foi verificado neste experimento que a produção máxima de gama-decalactona pelas linhagens de *Geotrichum fragans* e *Geotrichum sp* ocorreu na temperatura de 30°C após 96 horas de fermentação a 200 rpm. Nas temperaturas de 35°C e 40°C observou-se um acentuado decréscimo na produção de gama-decalactona, sendo que na temperatura de 40°C não houve crescimento microbiano.

5.2.2.7 Efeito do pH inicial do meio de cultura na produção de gama - decalactona

O efeito do pH inicial do meio de cultura na produção de gama-decalactona pelas linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans* foi realizado como descrito no item 4.2.7.13. A figura 29 ilustra os resultados obtidos.

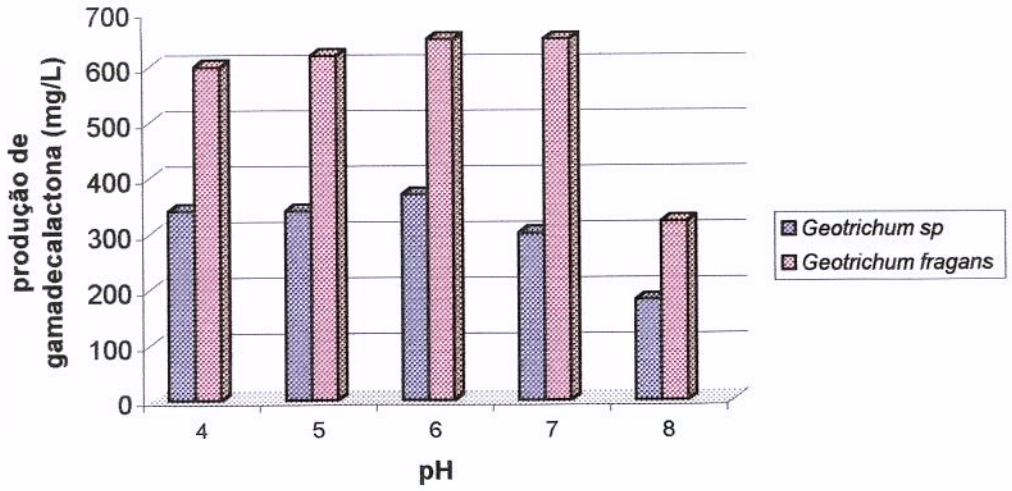


Figura 29. Efeito do pH na produção de gama–decalactona pelas linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans*.

A variação da faixa de pH não afetou significativamente a produção de gama-dcalactona pelas linhagens estudadas. Foi verificado, porém, crescimento e produção de massa celular em todos os valores de pH testados. LEE *et al* (1999), estudaram o efeito do pH inicial do meio de cultura na produção de gama–decalactona pelas células da levedura *Sporidiobolus salmonicolor* imobilizadas em alginato de cálcio. Foi verificado neste experimento que a produção máxima de gama-decalactona foi em pH 4,0.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

5.2.2.8 Relação entre a porcentagem do hidrolisado de mamona e produção de gama – decalactona pelas linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans*.

O estudo referente ao efeito da concentração de óleo de mamona hidrolisado e produção de gama-decalactona foi realizado de acordo com o método descrito no item 4.2.7.10. A figura 30 ilustra os resultados obtidos.

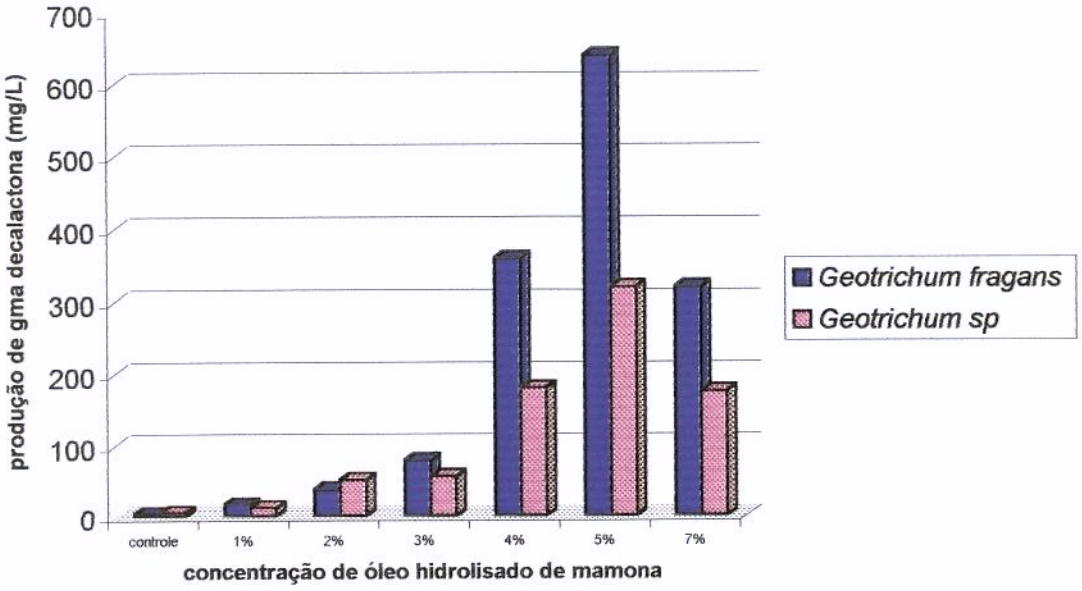


Figura 30. Efeito da concentração do óleo hidrolisado de mamona na produção de gama-decalactona.

A máxima produção de gama-decalactona pelas linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans* foi obtida em meio de cultura contendo 5% de óleo hidrolisado de mamona em 96 horas de cultivo a 30°C.

5.2.2.9 Estudo do efeito do tempo de fermentação na produção de gama–decalactona utilizando óleo de mamona hidrolisado como precursor pelas linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans*.

O estudo referente ao efeito do tempo de fermentação na produção de gama-decalactona foi realizado de acordo com o método descrito no item 4.2.7.11. A produção de gama-decalactona foi acompanhada nos intervalos de tempo de 24, 48, 72, 96 e 120 horas de incubação. A figura 31 ilustra os resultados obtidos.

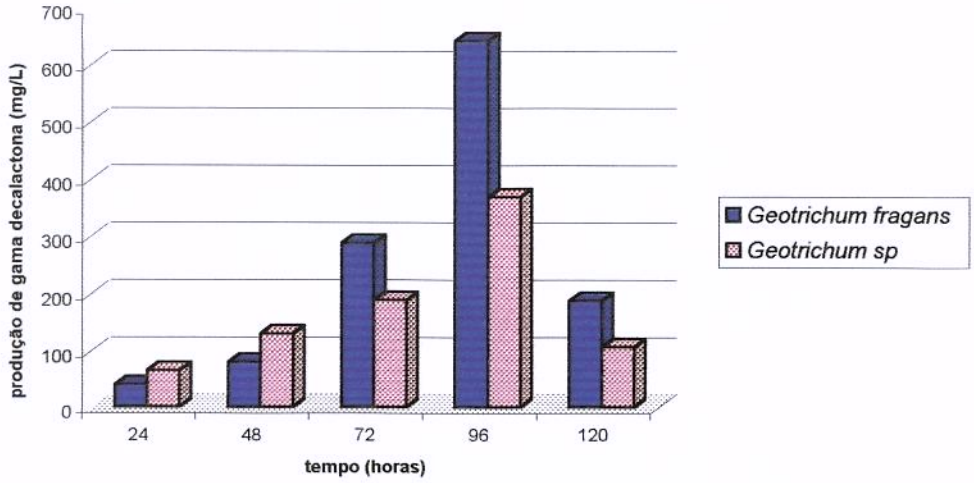


Figura 31. Efeito do tempo de fermentação na produção de gama–decalactona pelas linhagens de *Geotrichum sp e Geotrichum fragans* utilizando óleo de mamona hidrolisado como precursor.

A produção máxima de gama-decalactona pelas linhagens de *Geotrichum fragans* e *Geotrichum sp* utilizando-se óleo de mamona hidrolisado como precursor foi de 650 mg/L e 370 mg/L respectivamente após 96 horas de fermentação a 30°C em 200 rpm.

5.2.2.10 Estudo do efeito do tempo de fermentação na produção de gama–decalactona pelas linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans* utilizando óleo hidrolisado de oliva.

O efeito do tempo de fermentação na produção de gama-decalactona pelas linhagens de *Geotrichum fragans e Geotrichum sp* utilizando óleo de oliva como precursor foi realizado de acordo com o método descrito no item 4.2.7.17. A produção de gama-decalactona foi acompanhada nos intervalos de tempo de 24, 48, 72 e 96 e 120 horas de incubação. A figura 32 ilustra os resultados obtidos.

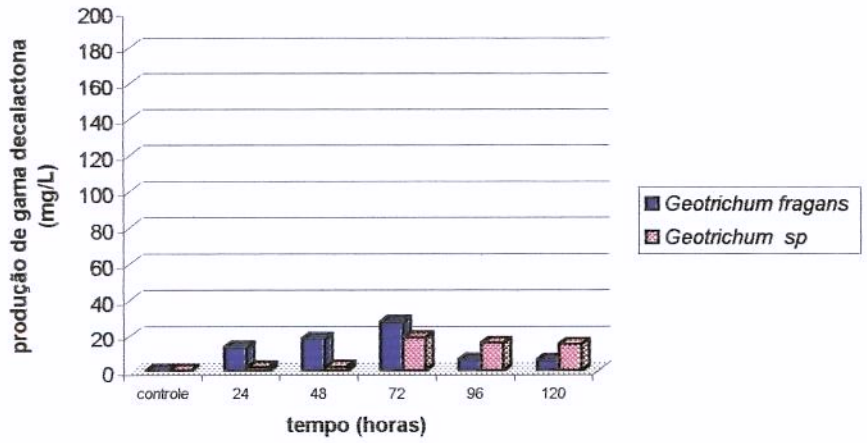


Figura 32. Efeito do tempo de fermentação na produção de gama–decalactona pelas linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans* utilizando óleo de oliva hidrolisado como precursor.

A produção máxima de gama-decalactona utilizando óleo de oliva como precursor foi de 28 mg/L em 72 horas de incubação para a linhagem de *Geotrichum fragans* e 18,46 mg/L após 96 horas de incubação para a linhagem de *Geotrichum sp* a 30°C a 200 rpm.

5.2.2.11 Estudo do efeito do tempo de fermentação na produção de gama–decalactona pelas linhagens de *Geotrichum fragans e Geotrichum sp* utilizando óleo hidrolisado de girassol.

O efeito do tempo de fermentação na produção de gama-decalactona pelas linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans* utilizando óleo hidrolisado de girassol foi realizado conforme o método descrito no item 4.2.7.17. A figura 33 ilustra os resultados obtidos.

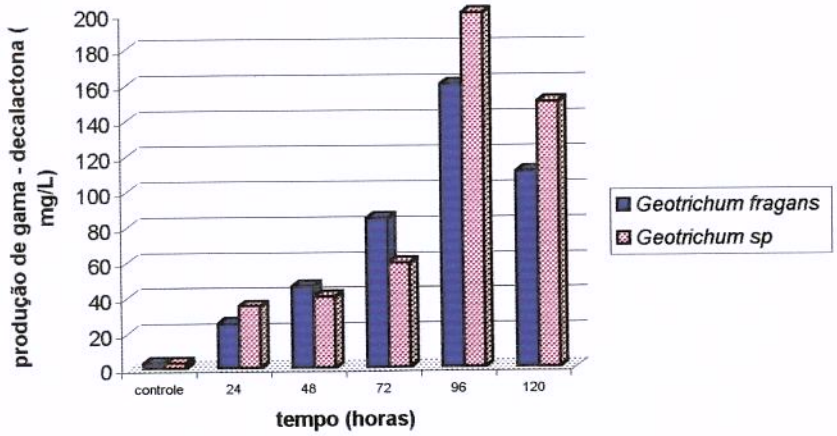


Figura 33. Efeito do tempo de fermentação na produção de gama–decalactona pelas linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans* utilizando óleo de girassol hidrolisado como precursor.

Como podemos observar, foi obtida produção máxima de gama-decalactona pelas linhagens de *Geotrichum fragans* e *Geotrichum sp* de 159,8 mg/L e 196 mg/L utilizando óleo de girassol como precursor após 96 horas de incubação a 30°C.

5.2.2.12 Efeito do tempo de fermentação na produção de gama–decalactona pelas linhagens de *Geotrichum fragans e Geotrichum sp* utilizando óleo hidrolisado de soja.

O efeito do tempo de fermentação na produção de gama-decalactona pelas linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans* utilizando óleo hidrolizado de soja foi realizado de acordo com o método descrito no item 4.2.7.17. A figura 34 ilustra os resultados obtidos.

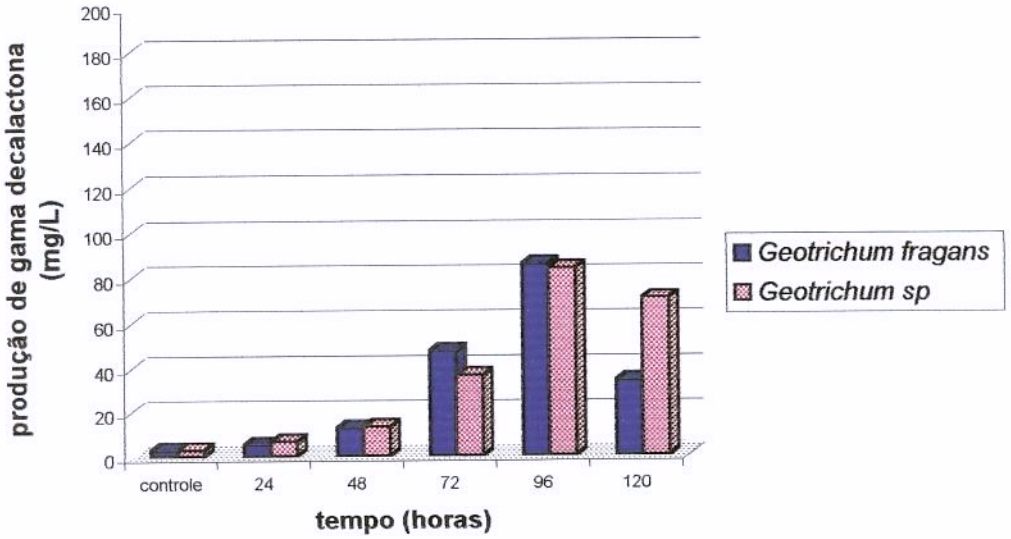


Figura 34. Efeito do tempo de fermentação na produção de gama–decalactona pelas linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans* utilizando óleo de soja hidrolisado como precursor.

A produção máxima de gama-decalactona obtida neste experimento foi de 85,7 mg/L para a linhagem de *Geotrichum sp* e 84 mg/L para a linhagem *de Geotrichum fragans* após 96 horas de incubação do meio de cultura contendo óleo de soja hidrolisado na temperatura de 30°C em 200 rpm.

5.2.2.13 Efeito do tempo de fermentação na produção de gama–decalactona pelas linhagens de *Geotrichum fragans* e *Geotrichum sp* utilizando óleo de milho hidrolisado.

O efeito do tempo de fermentação na produção de gama-decalactona pelas linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans* foi verificado utilizando meio de cultura preparado de acordo com o item 4.2.7.17. A produção de gama-decalactona foi acompanhada nos intervalos de tempo de 24, 48, 72, 96 e 120 horas de fermentação. A figura 35 ilustra os resultados obtidos.

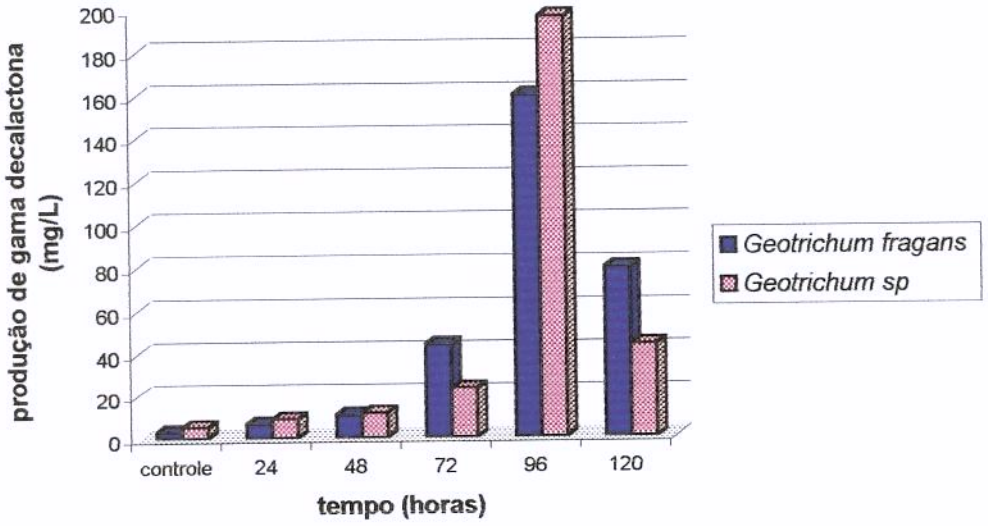


Figura 35. Estudo da produção de gama–decalactona utilizando óleo de milho hidrolisado como precursor.

A produção máxima de gama-decalactona obtida neste experimento foi de 200 mg/L para a linhagem de *Geotrichum sp* e 160 mg/L para a linhagem de *Geotrichum fragans* após 96 horas de incubação do meio de cultura contendo óleo de milho hidrolisado a temperatura de 30°C a 200 rpm.

Pode-se verificar pelos resultados obtidos que a produção máxima de gama-decalactona foi no meio de cultura contendo óleo hidrolisado de mamona. O óleo de mamona apresenta na sua composição cerca de 80-85% de ácido ricinoléico, um hidroxiácido graxo, ácido palmítico (1,5%), ácido esteárico (1,5%), ácido oléico (4,5%),

ácido linoléico (5,0%). O ácido ricinoléico tem sido relatado na literatura como precursor direto na produção de gama-decalactona por biotransformação através da via da β-oxidação dos ácidos graxos (ENDRIZZI *et al*, 1996; GATFIELD, 1995, FARBOOD, 1983). Na via da β-oxidação, o ácido graxo é metabolizado em compartimentos celulares como as mitocôndrias e peroxissomos, liberando compostos intermediários como o ácido 4-hidroxidecanóico (forma aberta da gama-decalactona) que é eliminado para o meio externo e sob condições favoráveis como o pH, este composto intermediário pode ser convertido em gama-decalactona (GATFIELD, 1998). Os meios de cultivo contendo óleos de milho, girassol ou soja também se mostraram efetivos para a produção de gama-decalactona. Estes resultados podem ser devido à presença do ácido linoléico na composição desses óleos. Os óleos de milho e girassol apresentam na sua composição o ácido linoléico e de acordo com os estudos reportados por CHARLIER & CROUZET (1992) este ácido graxo pode ser utilizado como precursor na produção de gama-lactonas, o que também foi verificado neste trabalho. Por outro lado, quando se utilizou o meio de cultura contendo o óleo de oliva hidrolisado, foi verificado um efeito inibidor na produção de gama-decalactona tanto para a linhagem de *Geotrichum fragans* (28 mg/L) quanto para a linhagem de *Geotrichum sp* (18,4 mg/L), quando comparado com os outros óleos testados. O óleo de oliva apresenta na sua composição cerca de 89% de ácido oléico. HAFFER & TRESSEL (1996) estudaram o efeito da adição do ácido oléico no meio de cultura e a produção de gama-lactonas pela linhagem de *Sporobolomyces odorus* e comprovaram ser este ácido graxo, um precursor na produção do composto de aroma, sendo proposta uma nova via biossíntética iniciando a partir da hidroxilação do ácido oléico, seguida da β-oxidação até a formação da lactona.

5.2.2.14 Estudo do efeito dos ácidos graxos: ricinoléico, linoléico, oléico, esteárico e palmítico na produção de gama–decalacatona.

Para este estudo, foi utilizado o meio de cultura n°1, preparado de acordo com o item 4.2.7.2, ao qual foi adicionado 0,7% do volume final dos ácidos graxos: palmítico, esteárico, oléico, linoléico e ricinoléico. Os frascos foram incubados em agitador rotatório por 96 horas na temperatura de 30°C a 200 rpm. Após esse período, o conteúdo dos frascos

foi centrifugado e a extração da gama-decalactona produzida foi realizada de acordo com o item 4.2.7.3. A figura 36 ilustra os resultados obtidos.

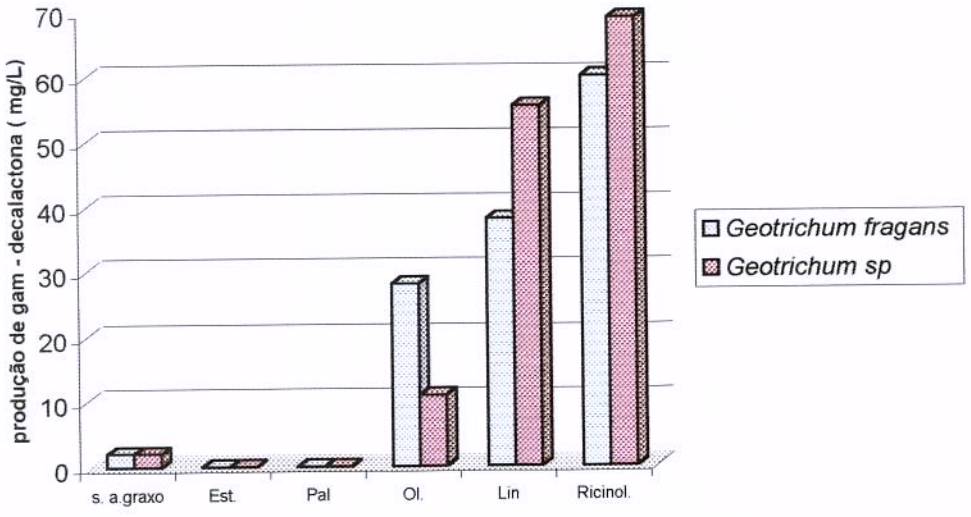


Figura 36. Estudo da produção de gama-decalactona utilizando os ácidos graxos: Palmítico, Esteárico, Oléico, Linoléico e Ricinoléico na concentração de 0,7%.

Verificou-se neste experimento, que no meio de cultivo contendo ácido ricinoléico, obteve-se uma produção máxima de 67,8 mg/L de gama-decalactona pela linhagem de *Geotrichum sp* e de 60 mg/L para a linhagem de *Geotrichum fragans*. No meio de cultivo contendo ácido linoléico, observou-se um decréscimo na produção de gama–decalactona de 38 mg/L para a linhagem de *Geotrichum fragans* e 55,4 mg/L para a linhagem de *Geotrichum sp*. Um decréscimo na produção de gama-decalactona foi observado no meio de cultivo contendo ácido oléico, sendo obtida máxima produção de 11,8 mg/L para a linhagem de *Geotrichum sp* e de 28 mg/L para *Geotrichum fragans*. Nos meios de cultivo contendo ácido palmítico e ácido esteárico, nenhuma produção de gama–decalactona foi obtida para as duas linhagens. Estes resultados sugerem a utilização preferencial do ácido graxo hidroxilado como precursor principal na produção de gama-decalactona pelas linhagens estudadas.

Este experimento foi realizado de acordo com LIN *et al* (1996), que verificaram os efeitos dos ácidos graxos (palmítico, esteárico, oléico, linoléico e ricinoléico) componentes do óleo de mamona na produção de gama-decalactona por leveduras do gênero *Sporobolomyces odorus.* Os autores verificaram que a adição dos ácidos graxos palmítico, esteárico, oléico ou linoléico na concentração de 0,06% no meio de cultura, reduziu a produção de gama-decalactona após 216 horas de cultivo, porém, quando se utilizou o ácido ricinoléico, uma produção de 71,8 mg/L de gama-decalactona foi obtida. LEE *et al* (1994), verificaram um efeito inibidor no crescimento e produção de gama-decalactona pela linhagem de *Sporobolomyces odorus* no meio de cultura contendo ácido decanóico (C_{10}) e ácido dodecanóico (C_{12}).

OKAMOTO *et al* (2002) verificaram um aumento na produção de gama-decalactona pela linhagem de *Piptoporus soloniensis* após a adição dos ácidos graxos hidroxiesteárico e ricinoléico no meio de cultura, por outro lado, a adição dos ácidos graxos láurico, linoléico e linolênico reduziram o crescimento e a produção de gama-decalactona.

As lactonas podem ser sintetizadas por microrganismos a partir de ácidos graxos com grupamento hidroxi (ácido ricinoléico; ácido 12 hidroxi-9-octadecenóico) ou sem grupamento hidroxi ou cetona (ácido oléico, linoléico, esteárico e palmítico). A produção biotecnológica de gama-decalactona através dos processos de biotransformação envolve a utilização desses ácidos graxos, principalmente do ácido ricinoléico por leveduras do gênero *Candida* (ENDRIZI *et al*, 1996), *Sporobolomyces odorus* (FERON *et al*, 1996), *Yarrowia lipolytica* (WACHÉ *et al*, 2001) e fungos filamentosos do gênero *Trichoderma viride* (SERRANO–CARREON *et al*, 1993).

A transformação de ácidos graxos por microrganismos na produção de gama-decalactona, têm como via catabólica principal a via da β-oxidação, que consiste na oxidação beta dos ácidos graxos, consistindo nas reações de: 1) desidrogenação; 2) hidratação; 3) oxidação e 4) liberação da Acetil CoA e acil sem dois carbonos. Estas reações ocorrem em organelas especiais, mitocôndrias e peroxissomos, nas células eucarióticas.

5.2.2.15 Estudo do efeito da concentração de ácido ricinoléico na produção de gama-decalactona pelas linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans*.

Para o estudo do efeito da concentração do ácido ricinoléico, foi utilizado 15 mL do meio de cultura composto por 1% de glicose, 1% de autolisado de levedura ao qual foi adicionado ácido ricinoléico nas concentrações de 0,1%, 0,3%, 0,7% e 1%. A figura 37 ilustra os resultados obtidos.

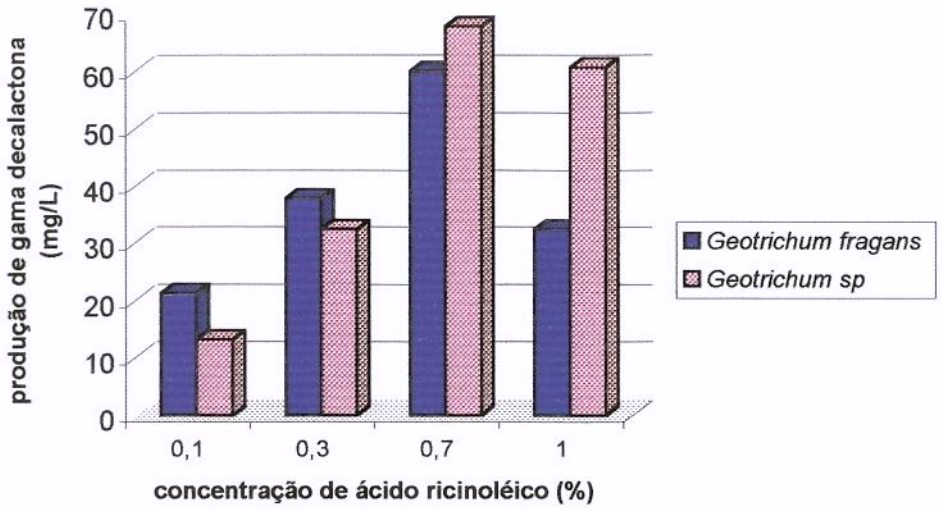


Figura 37. Efeito da concentração de ácido ricinoléico na produção de gama–decalactona.

A produção máxima de gama-decalactona obtida foi de 68,7 mg/L para a linhagem de *Geotrichum sp* e de 60 mg/L para a linhagem de *Geotrichum fragans* no meio de cultura contendo 0,7% de ácido ricinoléico a 30°C após 96 horas de cultivo.

5.2.2.16 Efeito da concentração ácido oléico na produção de gama-decalactona pelas linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans*.

O efeito da concentração de ácido oléico na produção de gama–decalactona pelas linhagens de *Geotrichum fragans* e *Geotrichum sp*, foi realizada com descrito no item 4.2.7.14. A figura 38 ilustra os resultados obtidos.

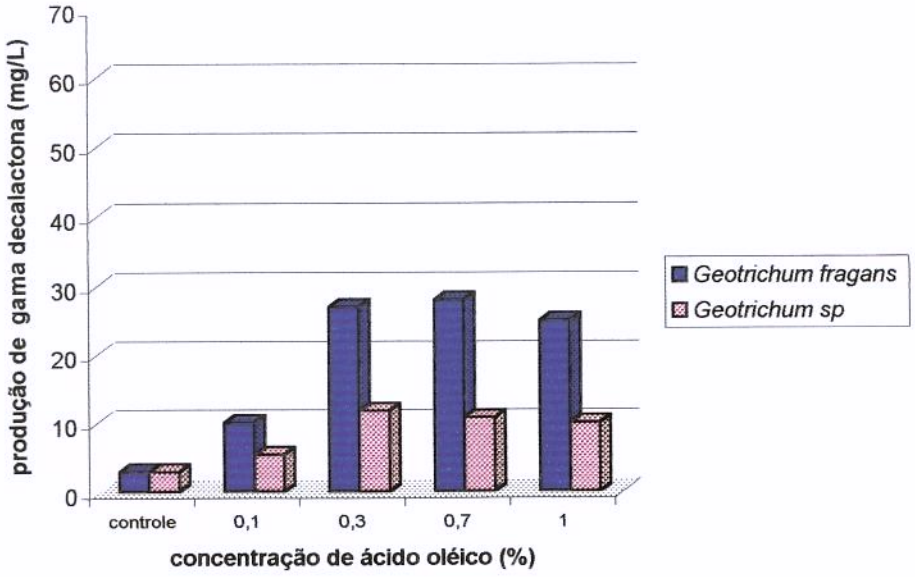


Figura 38. Efeito da concentração de ácido oléico na produção de gama-decalactona.

Observou-se que a produção máxima de gama–decalactona obtida neste experimento para a linhagem de *Geotrichum sp* foi de 11,8 mg/L em meio de cultura contendo 0,3% de ácido oléico incubado a 30°C após 96 horas a 200 rpm. Para a linhagem de *Geotrichum fragans*, a produção máxima de gama–decalactona foi de 28 mg/L no meio de cultura contendo 0,7% de ácido oléico incubado por 96 horas a 30°C a 200 rpm.

5.2.2.17 Efeito da concentração de ácido linoléico na produção de gama–decalactona pelas linhagens de *Geotrichum fragans* e *Geotrichum sp.*

O efeito da concentração de ácido linoléico na produção de gama–decalactona pelas linhagens de *Geotrichum sp.* e *Geotrichum fragans* foi realizado como descrito no item 4.2.7.14. A figura 39 ilustra os resultados obtidos.

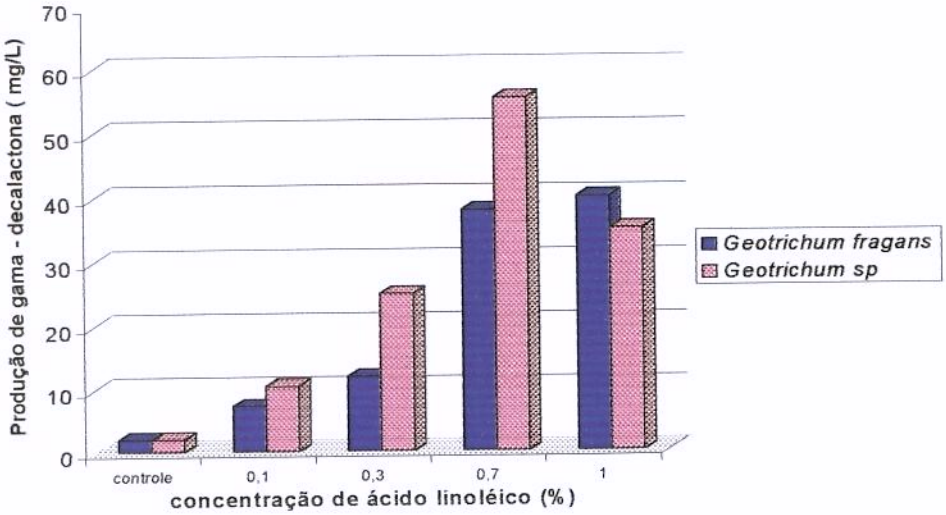


Figura 39. Efeito da concentração de ácido linoléico na produção de gama-decalactona.

A produção máxima de gama–decalactona obtida foi de 38 mg/L para a linhagem de *G. fragans* e 55,4 mg/L para a linhagem de *Geotrichum sp* em meio de cultura contendo 0,7% de ácido linoléico a 30°C após 96 horas a 200 rpm.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

5.2.2.18 Efeito da concentração de metil ricinoleato na produção de gama – decalactona pelas linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans.*

No estudo do efeito da concentração de ricinoleato de metila na produção de gama–decalactona pelas linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans*, foi utilizado meio de cultura composto por 1% de glicose, 1% de autolisado de levedura ao qual foi adicionado metil–éster do ácido ricinoléico nas concentrações de 0,1%, 0,3%, 0,7% e 1%. A figura 40 ilustra os resultados obtidos.

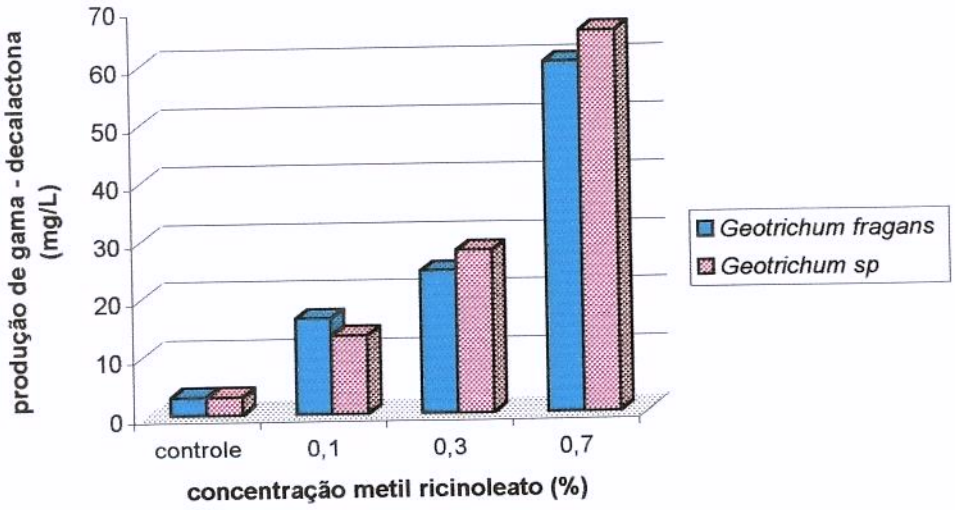


Figura 40. Estudo da produção de gama–decalactona utilizando metil ricinoleato como precursor na produção de gama–decalactona.

Como podemos verificar, as linhagens de *Geotrichum fragans e Geotrichum sp* apresentaram produção máxima de gama–decalactona de 60 mg/L e 65,3 mg/L respectivamente em meio de cultura contendo metil ricinoleato na concentração de 0,7% incubado a 30°C após 96 horas de cultivo a 200 rpm.

O objetivo deste experimento foi verificar a utilização do metil ricinoleato como precursor na produção de gama-decalactona pelas linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans*. DUFOSSÉ *et al* (1998) estudaram a bioconversão de metil ricinoleato na produção de gama-decalactona por linhagens de levedura do gênero *Sporidiobolus* (*S.*

salmonicolor, S. ruinenii, S. jonhsonii e *S. pararoseus).* Os autores obtiveram uma produção máxima de 12 mg/L e 40 mg/L de decalactona para as linhagens de *S. salmonicolor* e *S. ruinenii* após 72 horas de conversão em bioreator contendo 4,1 g/L de metil ricinoleato. FERON *et al.*(1996), obtiveram produção máxima de gama-decalactona para as linhagens de *S. salmonicolor* de 500 mg/L após 130 horas de incubação e 1,6 g/L para a linhagem se *S. ruinenii* em meio de cultura suplementado com 5% de metil ricinoleato após 24 horas de incubação no meio de cultura de composição sintética contendo 15 g de glicose como fonte de carbono.

O processo metabólico na bioconversão de metil ricinoleato tem sido objeto de vários estudos. PAGOT *et al* (1996) estudaram o metabolismo de ácidos graxos e produção de gama-decalactona por linhagem de *Pichia guilliermondii* em meio de cultura contendo metil ricinoleato como única fonte de carbono. Neste estudo, os autores verificaram a influência da enzima carnitina octanoil transferase no metabolismo de ácidos graxos. Os autores verificaram que na presença do inibidor enzimático clorpromazina, houve um decréscimo na produção de gama-decalactona, sendo este decréscimo proporcional à quantidade de clorpromazina adicionada no meio de cultura.

Alguns microrganismos podem transformar metil ricinoleato em gama-decalactona, mas geralmente a produção é baixa devido a fatores tais como: 1) conversão incompleta do metil ricinoleato; 2) acúmulo de outras lactonas (3-hidroxi-gama-decalactona e 2,3 decen-4-olide) e 3) aproveitamento da gama–decalactona pelo microrganismo. A atividade da Acil coenzima A (Acil CoA oxidase) em linhagens mutantes da levedura do gênero *Yarrowia lipolytica* foi estudada por WACHÉ *et al* (2001). Os autores verificaram que as linhagens mutantes nas quais a atividade de acil-CoA oxidase foi suprimida, não podem consumir a gama-decalactona produzida.

As figuras 41,42 e 43 ilustram os cromatogramas dos padrões autênticos das gama e delta-decalactonas e de quantificação da gama-decalactona produzida pelas linhagens estudadas.

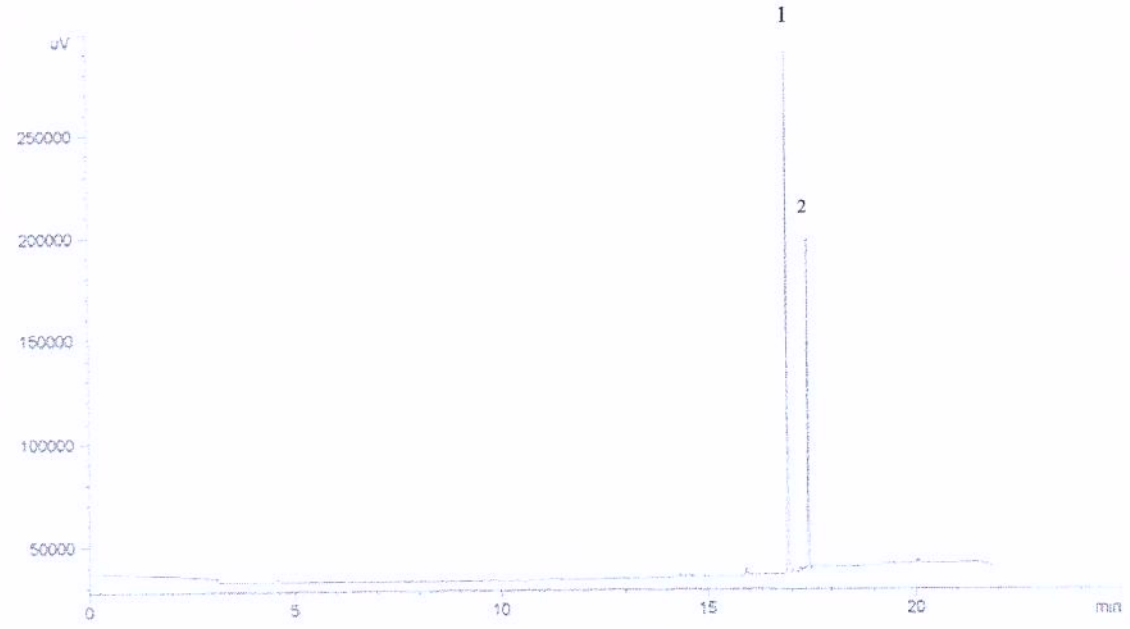


Figura 41. Cromatograma da análise por cromatografia gasosa (CG) dos padrões de lactonas, gama-decalactona e delta-decalactona.

Pico	Tempo de retenção	Compostos
1	16,994	Gama-decalactona
2	17,411	Delta- decalactona

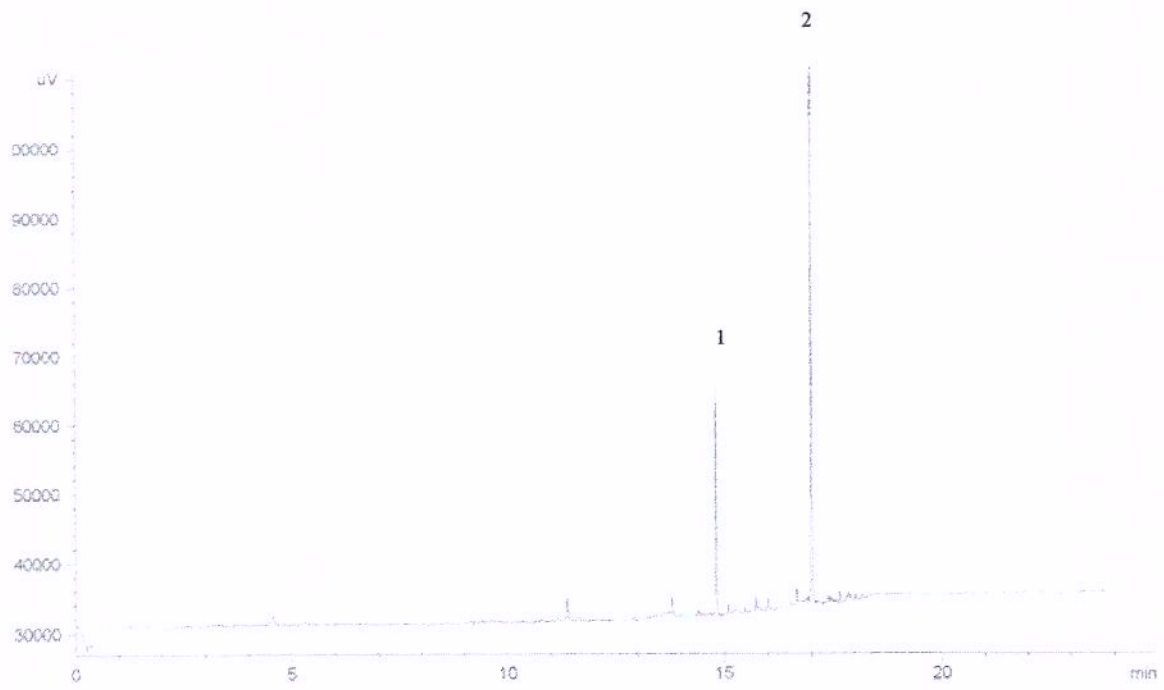


Figura 42. Cromatograma de quantificação da análise por cromatografia gasosa (CG) da gama – decalactona produzida pela linhagem de *Geotrichum sp.*

Pico	Tempo de retenção	Compostos
1	14,799	β-Ionona (padrão interno)
2	16,994	Gama-decalactona

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

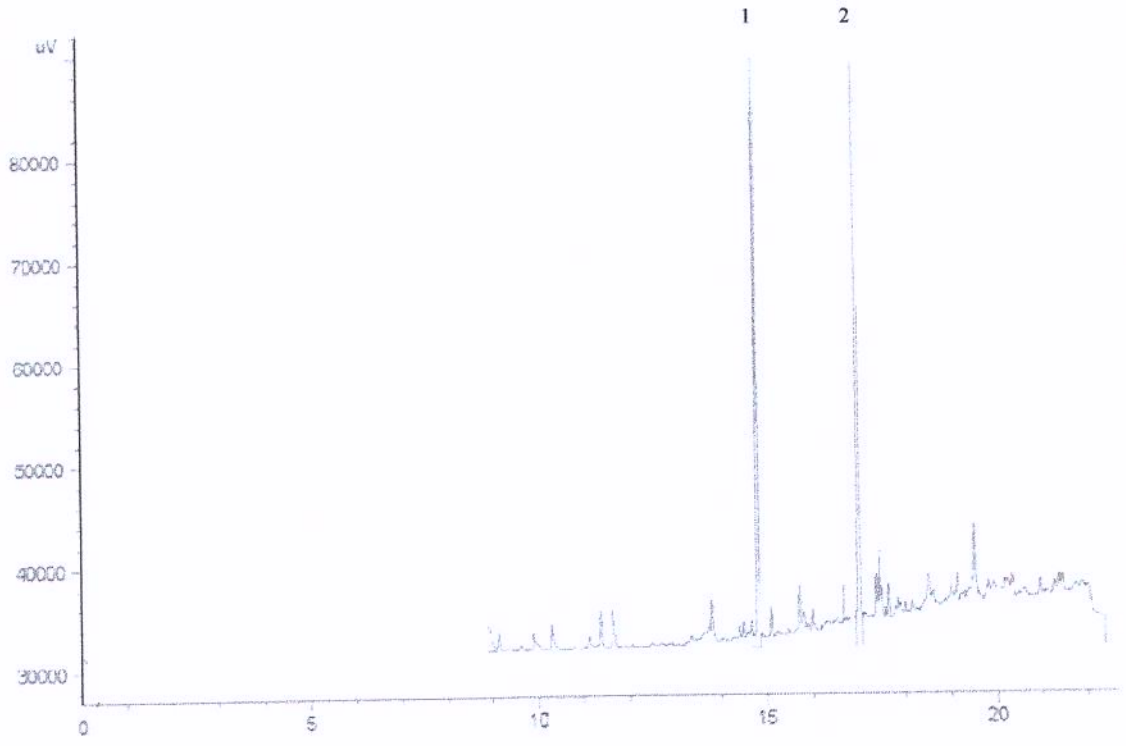


Figura 43. Cromatograma de quantificação da análise por cromatografia gasosa (CG) da gama-decalactona produzida pela linhagem de *Geotrichum fragans*.

Pico	Tempo de retenção	Compostos
1	14,79	β-ionona
2	16,99	Gama-decalactona

5.2.2.19 Identificação por Espectrometria de Massas da gama-decalactona produzida pelas linhagens de *Geotrichum fragans* e *Geotrichum sp.*

A identificação da gama-decalactona produzida pelas linhagens de *Geotrichum fragans* e *Geotrichum sp* foi realizada conforme descrito no item 4.2.7.5. A figura 44A ilustra o espectro de massas obtido do padrão autêntico da gama-decalactona e a figura 44B mostra o espectro de massas do composto produzido pelas linhagens de *Geotrichum fragans* e *Geotrichum sp*.

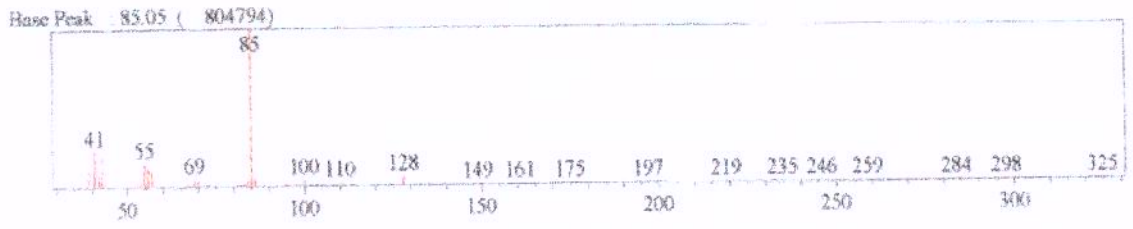


Figura 44A. Espectro de massas do composto autêntico gama-decalactona.

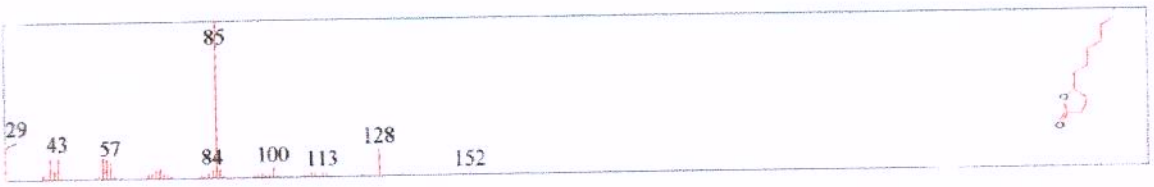


Figura 44B. Espectro de massas do composto gama-decalactona produzido pelas linhagens de *Geotrichum fragans* e *Geotrichum sp.*

Nos espectros de massas do composto autêntico gama-decalactona e o do composto produzido pelas linhagens estudadas no meio de cultura contendo óleo de mamona hidrolisado, foi detectado o fragmento do íon m/z 85 (cátion tetrahidro piranonil = pico base). O fragmento do íon m/z 85 é o mais importante na análise dos espectros de massas de gama-lactonas saturadas (OKAMOTO *et al*, 2002; FERON *et al*, 1996; LABOWS, 1979; TAHARA *et al*, 1972) como a gama-decalactona estudada neste trabalho.

6.6 A produção de gama–decalactona foi obtida quando se utilizou óleo de mamona hidrolisado, entre os substratos testados, no meio de cultura composto de 1% de glicose e 1%de autolisado de levedura.

6.7 No estudo do efeito dos ácidos graxos e produção de gama-decalactona, obteve-se produção máxima de gama-decalactona, 68,7 m/L e 60 m/L para as linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans* respectivamente, no meio de cultura contendo 0,7% de ácido ricinoléico após 96 horas de incubação a 30°C.

6.8 No estudo do efeito do ricinoleato de metila e produção de gama-decalactona, foi obtida produção máxima de 65,3 e 60 mg/L utilizando-se as linhagens de *Geotrichum fragans* e *Geotrichum sp* respectivamente no meio de cultura contendo 0,7% de ricinoleato de metila após 96 horas a 30°C.

6.9 As linhagens de *Geotrichum sp* e *Geotrichum fragans* se mostraram potencialmente produtoras do composto de aroma gama-decalactona nos estudos realizados neste trabalho. Estudos futuros visando o conhecimento do metabolismo na produção do composto de aroma pelas linhagens estudadas e a aplicação do composto de aroma obtido serão realizados.

7. REFERÊNCIAS BIBILIOGRÁFICAS

ABDOU, A.M. Purification and Partial Characterization of Psichrotrophic *Serratia marcescens* Lipase. **Journal Dairy Science**. Kaliobya, vol. 86, pp. 127-132, 2003.

ALBRECH, W., HEIDLAS, J.; SCHWARZ, M., TRESSL, R. Biosynthesis and Biotechnological Production of Aliphatic γ and δ-Lactones. **ACS – Symposium – series, Chicago**, n. 490, pp.46-58, 1992.

ANTCZAK, U.; GORA, J.; ANTCZAK, T.; GALAS, E. Enzimatic Lactonization of 15-hidroxypentadecanoic and 16-hydroxyhexadecanoic acids to Macrocycli Lactones. **Enzyme Microbiology Technology**, Poland, vol. 13, n.7, pp. 583 – 598, jul., 1991.

BAGNON, V.S.; LOZANO, P.; CASTAÑEDA, G.S.; ROUSSOS, S. Production of 6 – pentil α–pyrone by *Trichoderma harzianum* in Liquid and Solid State Cultures. **Process Biochemistry**, Oxford, vol. 36,n (1/2), pp. 103–109, sept., 2000.

BEDOUKIAN, P. Perfumery and Flavour Material Then and Now, **Perfumer& Flavorist**, Wheaton, vol. 19, pp.1-22,may/june, 1994.

BELIN, J.M.; BENSOUSSAN, M.; SERRANO-CARREON, L. Microbial Biosynthesis for the Production of Food Flavours. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, U.K, vol. 3, n.1, pp. 11-14, jan., 1992.

BERGER, R. G.; NEUHAEUSER, K.; DRAWERT, F. Biotechnological of flavour Compounds: III. High Productivity Fermentation of Volatile Flavours Using a Strain of *Ischnoderma benzoium*. **Biotechnology and Bioegeneering**, New York, vol. 30, n.8, pp. 987 – 990, dec., 1987.

BERNARDI, R.; FUGANTI, C.; GRASSELII, P.; MARINONI, G. Synthesis of the enantiomeric forms of 4-hexanolide (gama-caprolactone) from optically active 5-phenyl-4-pentene-2,3-diol prepared from Cinnamaldehyde and Baker's yeast. **Synthesis**, n. 50, pp. 50-52, Italy, 1980.

BOELENS, M.;GEMERT,L.J;. Sensory properties of optical Isomers. **Perfumer & Flavorist**, Huizen, vol. 18, pp. 1,3-6, 8-10, 12-14,16, jan./feb., 1993.

BONNARME, P.; DJIAN, A.; LATRASSE, A.; FERON, G.; GINIÉS, C.; DURAND, A.; LÉ-QUERRÉ, J. L. Production of – pentyl –α –pirone by *Trichoderma sp* from Vegetable Oils. **Journal of Biotecnhology**, Amsterdan, vol. 56, n.2, pp. 143-150, aug., 1997.

BRAUN,P.; BALZER, G.; FEHLHBER, K. Activity of Bacterial Lipases at Chilling Temperatures. **Food Microbiology**, London, vol. 18, n. 2, pp. 21-215, april, 2001.

CHARLIER, P.; CROUZET, J. Production of lactones by *Penicillium roquefort* **Biotechnology Letters,** Montpellier, vol. 14, n.4, pp. 275-280, marc., 1992.

CHEN, S.J.; CU, Y. C.; CHEN, T. L. Production of Alkaline Lipases by *Acinetobacter radioresistens*. **Journal of Fermentation and Bioengeneering**, Osaka, vol. 86, n. 3, pp. 308-312, jun., 1998.

COLLINS, R. P.; HALIM, A.F. Characterization of the Major Aroma Constituent of the Fungus *Trichoderma viride* (Pers.) **Journal Agricultural Food Chemistry**, vol. 20, n.2, pp. 437-438, aug. , 1972.

COSTA, M.C. **Produção, purificação e caracterização da lipase de *Aspergillus sp*.** 108 folhas. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

COSTA, V. R. S. **Produção, purificação e caracterização bioquímica de uma nova linhagem de *Rhizopus sp*.** 90 folhas. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

DOMMES, V.; BAUMGART, C.; KUNAU,W.H. Degradation of Unsatured fatty acids in Peroxisomes. **The Journal of Biological Chemistry**, Germany, vol. 256, n.16, pp. 8259-8262, aug., 1981.

DRAWERT, F.; BARTON, H. Biosynthesis of Flavour Compounds by Microrganisms. 3. Production of Monoterpenes by the Yeast *Kluyveromyces lactis*. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Easton, vol. 26, n. 3, pp. 765-766, 1978.

DUFOSSÉ, L.; FERON, G.; MAUVAIS,G.; BONNARME, P.; DURAND, A.; SPINNLER, H.E. Production of gamma- decalactone and 4-hidroxy-decanoic-acid in the genus *Sporidiobolus*. **Journal of Fermentation and Bioengeneering**, France, vol. 86, n.2, pp 169-173, apr., 1998.

DUFOSSÉ, L.; LATRASSE, A.; SPINNLER, H.E. Importance dês lactones dans lês aromes alimentaires: structure, distribuition, propriétés sensorielles et biosynthése. **Science dês Aliments**, France, v.14, n.1, pp. 17-50, sept., 1994.

ENDRIZZI, A.; PAGOT, Y.; LECLAINCHE, A ; NICAUD, J.M.; BELIN, J.M. Production of Lactones and Peroxomal Beta Oxidation in Yeast. **Critical Reviews in Biotechnology**, Ohio, vol. 16, n. 4, pp. 301-329, 1996.

ERCOLI, B; FUGANTI, C.; GRASSELLI, P.; SERVI, S.; ALLEGRONE, G.; BARBENI, M.; PISCIOTTA, A. Stereochemistry of the Biogeneration of C_{10} and C_{12} Gamma Lactones in *Yarrowia lipolytica* and *Pichia ohmeri*. **Biotechnology Letters**, Meddlesex, vol. 14, n. 8, pp. 665-668, aug., 1992.

ESAKI, N.; ITO, S.; BLANK, W.; SODA, K. Biotransformation of Oleic Acid by *Alacaligenes sp.* 5–18, a Bacterium Tolerant to High Concentrations of Oleic acid. **Journal Fermentation and Bioengeneering**, Osaka, vol. 77, n. 2, pp. 148–151, 1994.

FARBOOD, H.; WILLIS, B. Europ. Patent CT 1072, 1983.

FERON, G. ; DUFOSSÉ, L.; PIERARD, E.; BONNARME, P.; LE-QUERÉ, J. ; SPINNELER, H.E. Production, Identification and Toxicitiy of Gamma-Decalactone and 4-Hidroxydecanoic acid from *Sporiodiobolus spp.* **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, vol. 62, n. 8, pp. 2826- 2831, aug., 1996.

FERON, G.; BONNARME, P. DURAND, A.; Prospects for the Microbial Production of Food Flavor. **Trends in Food Science & Technology**, vol. 7, pp. 285 – 293, 1996.

FREITAS, S. P.; HARTMAN, L.; COURI, S. Alternativa biotecnológica ao uso de solventes orgânicos na extração de óleos vegetais. **Óleos e grãos**, n. 32, pp. 29-32, set/out, 1996.

FRONZA, G.; FUGANT, C.; GRASSELLI, P.; SERVI, S. Biogeneration of Aromas. **Chimia**, Zurich, vol 47, n. 4, pp 107-109, april, 1993.

FU, X.; ZHU, X.; GAO, K.; GUAN, J. Oil and Fat Hydrolysis with Lipase from *Aspergillus sp.* **Journal American Oil Chemistry Society**, Illinois, vol. 72, n. 5 pp. 527-531, may, 1995.

GANDHI, N. N. Application of Lipase. **Journal American Oil Chemist's Society**, Chicago, vol. 74, n. 6, pp. 621-633, 1997.

GATFIELD, I. L. Enzymatic and Microbial Generation of Flavours. **Perfumer & Flavourist**, Germany, vol. 20, n.5, pp 5- 6, 8-10, 12, 14, sep./oct., 1995.

GERVAIS, P.; BATTUT, G. Influence of Water Potential on gamma–decalactone Production by the Yeast *Sporidiobolus salmonicolor*. **Applied and Enviromental Microbiology**, Washigton, vol. 55, n. 11, pp. 2939 – 2943, nov., 1989.

GERVAIS, P.; SARRETE, M. Influence of Age of Mycelium and Water Activity of the Medium on Aroma Production by *Trichoderma viride* Grown on Solide Substrate. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Japan, vol. 69, n. 1, pp. 46-50, 1990.

HAFFNER, T.; TRESSL, R. Biosynthesis of R-gama–decanolactone in Yeast *Sporobolomyces odorus*, **Journal Agricutural Food Chemistry**, Washington vol. 44, n.5, pp. 1218 – 1223, may, 1996.

HAYES, D. G. The Catalytic Activity of Lipases Toward Hidroxy Fatty Acids – a Review, **Journal American Oil Chemist's Society**, Ilinois, vol. 73, n. 5, pp. 543-549, may, 1996.

HERRÁIZ, T. Produccion Biotecnologica de Compuestos del Aroma De Alimentos. Aplicacion en la Industria Alimentaria. **Alimentaria**, Bogotá, vol. 27, n. 213, pp. 35 – 39, jun., 1990.

JANSSENS, L.; POOTER, H.L.; SCHAMP, N.M.; VANDAMME, E. J. Production of Flavours by Microorganims. **Process Biochemistry**, Essex, vol. 24, n. 4, pp. 195-215, july, 1992.

JENNINGS, B. H.; AKOH, C. C. Lipase catalyzed modification of fish oil to incorporate capric acid. **Food Chemistry**, Oxford, vol. 72, n.3, pp. 273-278, sept., 2001

KAPFER, G. F. ; BERGER, R.G.; DRAWERT, F. Production of 4-decanolide by Semicontinuos Fermentation of *Tyromyces sambuceus.* **Biotechnology Letters**, Surrey, vol. 11, n. 8, pp. 561- 566, aug., 1989.

KARAHADIAN, C.; JOSEPHSON, D. B.; LINDSAY, R. C. Volatile Compounds from *Penicillium sp.* Contributing Musty –Earthy Notes to Brie and Camembert Cheese Flavour. **Journal Agricultural Food Chemistry,** Washington vol. 33, pp. 339-343, 1985.

KITAJIMA, E.W.; DOLDER, M.A.H.; JOAZEIRO,P.P Microscopia eletrônica de varredura. Apostila, 68 folhas. Laboratório de Microscopia Eletrônica-IB, UNICAMP, 1999.

KOPPENHOEFER,B.; BEHNSICH, R.; EPPERLEIN, U.; HOLZSCHUH,H. Enantiomeric odor Differences and Gas Chromatographic Properties of Flavors and Fragances. **Perfumer & Flavorist**, Jamaica, vol. 19, pp. 1-2, 4-12, oct., 1994.

KRISNA, S.H.; SATTUR, A.P.; KARANTH, N.G. Lipase-Catalyzed Synthesis of Isoamyl Isobutyrate – Optimization Using a Central Composite Rotatable Design. **Process Biochemistry**, vol. 37, n. 1, pp. 9 – 16, sept., 2001.

LABOWS, J. N.; MCGINLEY,K .J.; LEYDEN,J.L.; WEBSTER,G.F. Characteristic gamma Lactone Odor Production of the Genus *Pityrosporum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, vol. 38, n.3, pp. 412 - 415, sept., 1979.

LANZA, E.; KO, K.H.; PALMER, J. K. Aroma Production by Cultures of *Ceratocystis moniliformis*, **Journal Agricutural Food Chemistry,** Washington, vol. 24, n. 6, pp. 1247 – 1250, aug., 1976.

LEE, S. L.; CHIENG, H. Y.; CHEN, C.W.; CHENG, C.C. Effect of Physical Factors on Production of Gamma–Decalactone by Immobilized Cells of *Sporidiobolus salmonicolor*. **Process Bichemistry**, London, vol. 34, n.8, pp. 845 – 850, oct., 1999.

LEE, S.L.; CHOU, C.C. Growth and Production of gamma decalactone and cis–dodecen- olide by *Sporobolomyces odorus* in Presence of Fatty Acids and Oils. **Journal of Fermentation and Bioengeneering**, Japan, vol. 78, n. 1, pp. 114-116, july, 1994.

LEE,S.L.; CHENG, H. Y.; CHEN, C. W.; CHOU, C.C. Production of Gamma – Decalactone from Ricinoleic Acid by Immobilized Cells of *Sporidiobolus salmicolor*. **Process Biochemistry**, Essex ,vol. 33, n. 4, pp. 453 – 459, marc., 1998.

LEEJEERAJUMNEAN, A.; DUCKHAM, S. C.; OWENS, J. D.; AMES, J.M. Volatile Compounds in *Bacillus* – Fermented Soybeans. **Journal of the Science of Food and Agricultures**. West Sussex, vol. 81,n.5, pp. 525 – 529, marc., 2001.

LIN, S. J.; LEE, S.L.; CHOU, C.C. Effects of Various Fatty acids Components of Castor Oil on the Growth and Production of Gamma-Decalactone by *Sporobolomyces odorus*. **Journal Fermentation and Biogeneering**, Japan, vol. 82, n.1, pp. 42-45, july, 1996.

LIU, K. J.; SHAW, J.F. Synthesis of Propylene Glycol Monoesters of Docosahexaenoic Acid and Eicosapentaenoic Acid by Lipase –Catalyzed Esterification in Organic Solvents. **Journal American Oil Chemist´s Society,** Taipei, vol. 72, n. 11, pp. 1271-1274, july, 1995.

LOWRY, O.H.; ROSEBRAUGH,A. L.; RANDALI, R.F. Protein Measurement with Folin – phenol Reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, vol. 193, pp. 265-275, 1951.

MAARSE, H.; HEIJ, D. G.; Trends in Flavour Research. **Trends in Food Science & Tecnhology**, Cambridge, vol. 5, pp. 306-307, sept., 1994.

MACEDO, G. A. **Produção, purificação, caracterização bioquímica e aplicações da lipase de *Geotrichum sp***. Dissertação de Mestrado, 121 folhas. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

MACRIS, J. B.; KOURENTZI, E.; HATZINIKOLAOU, D.G. Studies on Localization and Regulation of Lipase Production by *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, Oxford, vol. 31, n. 8, pp. 807-812, April, 1996.

MAGA, J. A. Types of Food Additives in **Food Additives Toxicology**. New YorK, Marcel Dekker, 1995.

MAGA, J.A. Lactones in Foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, vol.10, pp. 1 – 56, sept., 1976.

MAMONA. Disponível em: < http:// www. Aboissa.com.br/mamona/plantio1.htm > Acesso em : 11. nov. 2002.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

MAMONA: Cultura da Mamoeira.Campinas: IAC (Instituto Agronômico de Campinas), [2002]. 4p.

MISHINA, M.; YANAGAWA, S.; TANAKA, A.; FUKUI, S. Effects of Chain-length of Alkane Substrate on Fatty Acid Composition and Biosynthetic Pathway in Some *Candida* Yeasts. **Agricultural Biological Chemistry**, Tokyo, vol. 37, n. 4, pp. 863-870, oct., 1973.

MURALIDAHAR, R.V.; MARCHANT, R.; NIGAM, P. Lipases in Racemic Resolutions. **Journal of Chemical Tecnhology and Biotecnhology,** Tokyo, vol. 76, n. 1, pp. 3-8, jan., 2001.

MUYS, G.T.; VEN, V.; JONGE, A.P. Synthesis of optically active γ and δ-lactones by microbological reduction. **Nature**, London, vol. 192, n.9, pp. 995-996, june, 1962.

NAGO, H.; MATSUMOTO,M.; NAKAI, S. Degradative pathway of 2-Deceno-δ-Lactone by Lactone–Producing Fungus, *Fusarium solani*. **Bioscience Biotecnhology and Biochemistry**, Japan, vol. 57, n. 12, pp. 2111-2115, dec., 1993.

NICAUD, J.M.; CLAINCHE, A.L.; DALL, M. T.; WANG,H.;GAILLARDIN, *Yarrowia lipolytica*, a Yeast Model for the Genetic Studies of Hidroxy Fatty Acids Biotrasformation into Lactones. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzimatic**, Amsterdan vol. 5, n. 1- 4, pp. 175 – 181, nov., 1998.

OKAMOTO, K.; CHIMORI,M.; IWANAGA, F.; HATTORI, T.; YANASE, H. Production of Gamma Lactones by the Brown Rot Basidiomycete *Piptoporus soloniensis*. **Journal of Bioscence and Bionegineering**, vol 94, n.2, pp. 182-185, 2002.

PAGOT, Y.; BELIN, J.M. Fatty Acid Cellular Metabolism and Lactone Production by the Yeast *Pichia guilliermondii*. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, vol. 45, n.3, pp. 349 – 354, april, 1996.

PITTET, A. O.; KLAIBER, E. M. Synthesis and Flavor Properties of Some Alkyl-Substituted α-Pyrone Derivatives. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Washington, vol. 23, n. 6, pp.1189-1195, nov./dec., 1975.

RATLEDGE, C. Microbial Conversions of Alkanes and Fatty Acids. **Journal American Oil Chemist´s Society**, Hull, vol. 61, n.2, pp. 447-453, feb, 1984.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. Lipídeos **in Farmacognosia e Farmacobiotecnologia,** pp. 70-83. Ed. Premier, Baltimore, 1997.

SARRIS, J.; LATRASSE, A. Production of Odoriferous Gamma Lactones by *Fusarium poae.* **Agricultural Biological Chemistry,** Tokio, vol. 49, n. 11, pp. 3227-3230, nov., 1985.

SCHINDLER, J.; SCHMID, R.D. Fragance or Aroma Chemicals Microbial Synthesis and Enzimatic Transformation – a Review**. Process Biochemistry**, London, v. 17, pp. 2-8,1982.

SCHIERBELE, P.; GASSENMEIER, K.; GUTH, H.; SEN, A.; GROSCH, W. Character Impact Odour Compounds of Different Kinds of Butter. **Lebensm. Wiss. U. Technol.**, v.26, n. 4, pp- 347-356, 1993.

SCHUEPP, C.; KERMASHA, S.; MICHALKI, M. C.; MORIN, A. Production, Partial Characterization of Lipases from *Pseudomonas fragi* CRDA 037. **Process Biochemistry**, Oxford, vol. 32, n. 3, pp. 225-232, mar., 1997.

SERRANO-CARREON, L.; FLORES, C.; GALINDO, E. Gamma - Decalactone Production by *Trichoderma harzianumm* in Stirred Bioreactors. **Biotechnology Progress**, New York, vol. 13, pp 205 – 208, mar/apr., 1997.

SERRANO-CARREON, L.; HATHOUT, Y.; BENSOUSSAN, M.; BELIN, J. Metabolism of Linoleic Acid or Mevalonate and 6-Pentil-α–Pyrone Biosynthesis by

Trichoderma Species. **Applied and Enviromental Microbiology**, vol. 59, n. 9, pp 2945 – 2950, sept., 1993.

SHARMA, R.; SONI, S.K.; VOHARA, R.M.; GRUPTA, L.K.; GRUPTA, J.K. Purification and characterization of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus sp.* RSJ –1. **Process Biochemistry**, Panjab, vol 37, n.10, pp. 1075 – 1084, may, 2002.

SHELDON, R. A. Biocatalytic vs Chemical Synthesis of Enantiomerically Pure Compounds. **Chimia**, Zurich vol. 50, n. 9, pp.418-419, sept., 1996.

SOUSA NETO, R. **Produção, caracterização bioquímica e aplicações da lipase de *Alcaligenes sp.***, 132 folhas. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

SPENCER, M.; PANGBORN, R.M.; JENNINGS,G. W. Gas Chromatographic Analysis of volatiles from cling peaches. **Journal Agricultural Food Chemistry**, California, vol. 26, n.3, 1978.

STWART, H.B.; TUBBS,P.K.; STANLEY, K.K. Intermediates in Fatty Acid Oxidation, **Biochemistry Journal**, Cambridge, vol. 132, pp. 61-76, aug., 1973.

SWAINE, R.L. Flavoring Agents in **Food Additives – Toxicology**, pp. 269-277, Marcel Dekker, New York, 1995.

TURATTI, J.M.; GOMES, R.A.R.; ATHIÉ, I. Óleo de Mamona in **Lipídeos: Aspectos funcionais e Novas Tendências**, pp 60-62, Apostila –ITAL, Campinas, 2002.

VANDAMME, E.J.; SOETAERT, W. Bioflavours and fragrances via fermentation and biocatalysis. **Journal of Chemical Technology and Biotecnology**, vol. 77, pp. 1323-1332, aug., 2002.

VUFSON, E.N. Enzimatic synthesis of food ingredients in low-water media. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, vol. 4, pp. 209-215, 1993.

XIA, J.; CHEN, X.; NNANNA, I . A. Activity and Stability of *Penicillium cyclopium* Lipase in Surfactant and detergent Solutions. **Journal Oil Chemist´s Society**, Illinois, vol. 73, n. 1, pp. 115-120, jan., 1996.

XU, X.; SKANDS, A.; JONSSON, G.; NISSEN, J.A. Production of Strured Lipids by Lipase- Catalysed Interesterification in an Ultrafiltration Membrane Reactor. **Biotechnology Letters**, Holanda, vol. 22, n.21, pp. 1667-1671, 2000.

WACHÉ, Y.; PAGOT, T.; NICAUD, J.M.; BELIN, J. M. Acyl–Coa oxidase, a Key Step for Lactone Production by *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzimatic**, Amsterdan, vol 5, n. 1-4, pp. 165-169, sept., 1998.

WACHÉ, Y.; BERGMARK, K.; COURTHAUDON, J. L.; AGUEDO, M.; NICAUD, J.M.; BELIN. Medium–size droplets of methyl ricinoleato are reduced by cell-surface a activity in the gamma – decalactone production by *Yarrowia lipolytica*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, vol. 30, n.3, pp. 183 – 187, mar., 2000.

WACHÉ, Y.; AGUEDO, M.; CHOQUET, A. ; GATIFIELD, I.L.; NICAUD, J. M.; BELIN, J. M. Role of β-Oxidation Enzymes in gamma–Decalactone Production by yeast *Yarrowia lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, vol. 67, n.12, pp. 5700 – 5704, sep., 2001.

WANIKAWA, A.; HOSOI, K.; SHOJI, H.; NAKAGAWA, K. Estimation of the Distribuition of enantiomers of γ-Decalactone and γ-Dodecalactone in Malt Whisky. **Journal of Institute of Brewing**, London, vol. 107, n. 4, pp. 253-259, feb., 2001.

WANIKAWA, A.; HOSOI, K.; TAKISE, I.; KATO, T. Detection of γ-Lactones in Malt Whisky. **Journal of the Institute of Brewing**, London, vol. 106, n. 1, pp. 39- 43, jan/ feb., 2000.

WELSH, F. W.; MURRAY, W. D.; WILLIAMS, R. E. Microbiological and Enzymatic Production of Flavor and Fragance Chemicals. **Critical Reviews in Biotechnology**, Ohio, vol 9, n.2, pp. 105-169, 1989.

WURZ, R.E; KEPNER, R.E.; WEBBE, A.D. The Biosynthesis of Certain Gamma-Lactones from Glutamic Acid by Film Yeast Activity on the surface of Flor Sherry. **American Journal of Enology and Viticulture**, California, vol. 39, n. 3, pp.234-238, feb., 1988.

YAMAMOTO, K.; FUJIWARA, N. Purification and Some Properties of a castor – oil – hydrolyzing lipase from *Pseudomonas sp.* **Agricultural Biological Chemistry**, Tokyo, vol.12, n. 52, pp. 3015-3021, jun., 1988.

YONG, F. M.; WONG, H. A.; LIN, G. Effect of Nitrogen Source on Aroma Production by *Trichoderma viride*. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, vol. 22,n.2, pp. 146–147, feb., 1995.

YOSHIZAWA, K.; YAMAGUCHI, H.; HASUO, T.; AKITA, O.; HARA, S. Production of Fruity Odor by *Neurospora sp.* **Agricultural Biological Chemistry**, Tokyo, vol. 52, n.8, pp. 2129 – 2130, aug., 1988.