

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

PRODUÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS DE AROMA POR NOVAS
LINHAGENS DE *Neurospora sp*

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Berenice Mandel Brigido

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
Orientadora

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

PARECER

Este exemplar corresponde à redação
final da tese defendida por Berenice
Mandel Brigido, aprovada pela
Comissão Julgadora em 06 de
dezembro de 2000.

Campinas, 06 de dezembro de 2.000

2000


Prof. Dra. Gláucia Maria Pastore
Presidente da Banca

200102358

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE BC
N.º CHAMADA:
TI / UNICAMP
B 768p
V. _____ Ex. _____
TOMBO BC/ 43829
PROC. 16-392101
C D
PREÇO R\$ 11,00
DATA 20/02/01
N.º CPD _____



CM-00153354-1

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

B768p Brigido, Berenice Mandel
Produção de compostos voláteis de aroma por novas
linhagens de *Neurospora* sp / Berenice Mandel Brigido. –
Campinas, SP: [s.n.], 2000.

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

1.Neurospora sp. 2.Aroma. 3.Ésteres. 4.Álcoois.
5.Cromatografia gasosa. I.Pastore, Gláucia Maria.
II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia
de Alimentos. III.Título.

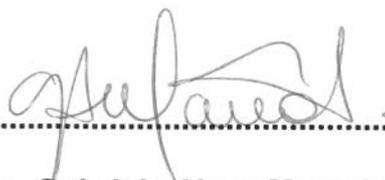
BANCA EXAMINADORA



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



.....
Prof. Dr. Yong Kun Park
(membro)



.....
Dra. Gabriela Alves Macedo
(membro)

.....
Profa. Dra. Délia Rodriguez Amaya
(membro)

Dedico este trabalho ao Mario Nelson, meu marido, pelo seu amor, carinho, incentivo e amizade. Aos meus filhos Maurício e Fabiana que são a alegria e razão de nossas vidas.

Aos meus pais Israel e Anita e a minha sogra Alzira por seu amor .

Ao meu irmão Celso, a minha cunhada Cecília e ao meu sobrinho Gustavo pelo carinho, incentivo e compreensão.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Gláucia Maria Pastore pela oportunidade oferecida em desenvolver este trabalho.

À Dra Christina Leopoldo e Silva, Diretora do Instituto Adolfo Lutz de Campinas.

Aos amigos da Seção de Bromatologia e Química, Beatriz, Valéria, Maria Helena, Irene, Marise, Paulo, Angela, e Elaine por sua amizade e incentivo.

Ao amigo Joaquim por sua amizade e pela imensa contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

A amiga Denise por sua amizade e pela valiosa colaboração neste estudo.

A amiga Luciana por seu carinho e amizade.

A amiga Rosana por sua amizade.

Aos amigos do laboratório de Bioaromas, Danielle, Mercedes, Vinicius, Angelita, Sonia, e Luciana, por seu carinho e incentivo.

Aos amigos do laboratório de Bioquímica pelo incentivo.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação pelos cursos dados, que foram de grande importância na realização deste estudo.

Às funcionárias Dora e Beatriz pelo auxílio prestado durante a realização deste trabalho.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação do Departamento de Alimentos pela gentileza e atenção.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos pela atenção.

ÍNDICE GERAL

	Página
LISTA DE TABELAS.....	xvii
LISTA DE FIGURAS.....	xxvii
RESUMO.....	xxxix
SUMMARY.....	xliii
1-INTRODUÇÃO.....	1
2-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3-MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1- Materiais.....	27
3.1.1 – Reagentes.....	27
3.1.2- Equipamentos.....	27
3.2- Métodos.....	27
3.2.1- Linhagens de <i>Neurospora</i> sp.....	27
3.2.2- Seleção das linhagens de para produção de compostos voláteis.....	28
3.2.3- Produção da suspensão de esporos.....	28
3.2.4- Composição dos meios de cultura para produção de compostos voláteis.....	28
3.2.5- Efeito da composição dos meios de cultura na produção de compostos voláteis em função do tempo.....	30
3.2.6- Efeito da temperatura de incubação na produção de compostos por linhagens de <i>Neurospora</i> sp.....	30

3.2.7- Efeito da adição de precursor na produção de compostos voláteis por linhagem <i>Neurospora</i> sp1.....	30
3.2.8- Efeito da concentração da suspensão de esporos na produção de compostos voláteis por linhagem <i>Neurospora</i> sp1.....	31
3.2.9- Métodos analíticos.....	31
3.2.9.1- Determinação da curva de crescimento das linhagens de <i>Neurospora</i> sp.....	31
3.2.9.2- Medida de pH.....	32
3.2.9.3-Análise dos Compostos Voláteis por “Purge and Trap/Dynamic Headspace”(P&T/DHS).....	32
3.2.9.4-Avaliação Sensorial por Painel não treinado.....	33
3.2.10- Confirmação de identidade dos compostos voláteis produzidos por linhagens de <i>Neurospora</i> sp.....	33
4-RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1- Seleção de linhagens de <i>Neurospora</i> sp através de avaliação sensorial por painel não treinado.....	35
4.2- Identificação tentativa dos compostos voláteis produzidos por novas linhagens de <i>Neurospora</i> sp.....	36
4.3- Estudo da composição do meio de cultura para produção de compostos voláteis em função do tempo de fermentação pela linhagem <i>Neurospora</i> sp 1	37
4.3.1- Caldo Extrato de Malte 5%.....	39
4.3.2- Meio Yeast Malt Broth.....	41
4.3.3- Meio Czapeck – Dox modificado.....	43
4.3.4- Meio Vogel mínimo com sacarose.....	45
4.3.5- Meio Vogel mínimo com maltose.....	47

4.3.6- Meio Corn Steep Liquor sem glicose.....	49
4.3.7- Meio Corn Steep Liquor com glicose.....	51
4.3.8- Meio Frutose/Extrato de levedura.....	53
4.4- Estudo da composição do meio de cultura para produção de compostos voláteis em relação ao tempo de fermentação pela linhagem <i>Neurospora</i> sp2.....	61
4.4.1- Caldo Extrato de Malte 5%.....	63
4.4.2- Meio Yeast Malt Broth.....	65
4.4.3- Meio Czapeck – Dox modificado.....	67
4.4.4- Meio Vogel mínimo com sacarose.....	69
4.4.5- Meio Vogel mínimo com maltose.....	71
4.4.6- Meio Corn Steep sem glicose.....	73
4.4.7- Meio Corn Steep com glicose.....	75
4.4.8- Meio Frutose/Extrato de levedura.....	77
4.5- Estudo da composição do meio de cultura para produção de compostos voláteis em relação ao tempo de fermentação pela linhagem <i>Neurospora</i> sp5.....	83
4.5.1- Caldo Extrato de Malte 5%.....	85
4.5.2- Meio Yeast Malt Broth.....	87
4.5.3- Meio Czapeck – Dox modificado.....	89
4.5.4- Meio Vogel mínimo com sacarose.....	91
4.5.5- Meio Vogel mínimo com maltose.....	93
4.5.6- Meio Corn Steep sem glicose.....	95
4.5.7- Meio Corn Steep com glicose.....	97
4.5.8- Meio Frutose/Extrato de levedura.....	99

4.6 -Efeito da Temperatura na Produção de Compostos Voláteis pela linhagem <i>Neurospora</i> sp1.....	121
4.6.1 - <i>Neurospora</i> sp1 em Caldo Extrato de Malte 5%.....	121
4.6.2 - <i>Neurospora</i> sp1 em Yeast Malt Broth.....	122
4.7 -Efeito da adição de óleo de soja em meio Yeast Malt Broth.....	126
4.8 - Efeito da concentração de esporos na produção de compostos voláteis por <i>Neurospora</i> sp.....	127
5-CONCLUSÕES.....	132
6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	134
ANEXOS.....	140

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1-Condições de Extração dos Voláteis por Purge and Trap/DynamicHeadspace.....	32
TABELA 2-Avaliação sensorial das Cinco Linhagens de <i>Neurospora</i> sp.....	35
TABELA3 -Índice de Retenção dos Compostos Produzidos.....	36
TABELA 4- Avaliação sensorial da linhagem <i>Neurospora</i> sp1 nos meios de cultura selecionados.....	37
TABELA 5- Composição de compostos voláteis produzidos por <i>Neurospora</i> sp1 em meio Caldo Extrato de Malte5% a 30°C, suspensão de esporos 10 ⁵ /ml de meio.....	57
TABELA 6- Composição de compostos voláteis produzidos por <i>Neurospora</i> sp1 em meio Yeast Malt Broth a 30°C, suspensão de esporos 10 ⁵ /ml de meio.	57
TABELA 7- Composição de compostos voláteis produzidos por <i>Neurospora</i> sp1 em meio Czapeck modificado a 30°C, suspensão de esporos 10 ⁵ /ml de meio.....	57
TABELA 8- Composição de compostos voláteis produzidos por <i>Neurospora</i> sp1 em meio Vogel mínimo sacarose a 30°C, suspensão de esporos 10 ⁵ /ml de meio.....	57
TABELA 9- Composição de compostos voláteis produzidos por <i>Neurospora</i> sp1 em meio Vogel mínimo maltose a 30°C, suspensão de esporos 10 ⁵ /ml de meio.....	58

TABELA 10- Composição de compostos voláteis produzidos por <i>Neurospora</i> sp1 em meio Corn Steep sem Glicose a 30°C, suspensão de esporos 10 ⁵ /ml de meio	58
TABELA 11- Composição de compostos voláteis produzidos por <i>Neurospora</i> sp1 em meio Corn Steep com Glicose a 30°C, suspensão de esporos 10 ⁵ /ml de meio.....	58
TABELA 12-Composição de compostos voláteis produzidos por <i>Neurospora</i> sp1 em meio Frutose Extrato de Levedura a 30°C, suspensão de esporos 10 ⁵ /ml de meio.....	58
TABELA 13- Avaliação sensorial da linhagem <i>Neurospora</i> sp2 nos meios de cultura selecionados.....	61
TABELA 14- Composição de compostos voláteis produzidos por <i>Neurospora</i> sp2 em meio Caldo Extrato de Malte5% a 30°C, suspensão de esporos 10 ⁵ /ml de meio.....	80
TABELA 15- Composição de compostos voláteis produzidos por <i>Neurospora</i> sp2 em meio Yeast Malt Broth a 30°C, suspensão de esporos 10 ⁵ /ml de meio.	80
TABELA 16- Composição de compostos voláteis produzidos por <i>Neurospora</i> sp2 em meio Czapeck modificado a 30°C, suspensão de esporos 10 ⁵ /ml de meio.....	80
TABELA 17- Composição de compostos voláteis produzidos por <i>Neurospora</i> sp2 em meio Vogel mínimo sacarose a 30°C, suspensão de esporos 10 ⁵ /ml de meio.....	80
TABELA 18- Composição de compostos voláteis produzidos por <i>Neurospora</i> sp2 em meio Vogel mínimo maltose a 30°C, suspensão de esporos 10 ⁵ /ml de meio.....	81

TABELA 19- Composição de compostos voláteis produzidos por <i>Neurospora</i> sp2 em meio Corn Steep com Glicose a 30°C, suspensão de esporos 10 ⁵ /ml de meio.....	81
TABELA 20- Composição de compostos voláteis produzidos por <i>Neurospora</i> sp2 em meio Frutose Extrato de Levedura a 30°C, suspensão de esporos 10 ⁵ /ml de meio.....	81
TABELA 21- Avaliação sensorial da linhagem <i>Neurospora</i> sp5 nos meios de cultura selecionados.....	83
TABELA 22- Composição de compostos voláteis produzidos por <i>Neurospora</i> sp5 em meio Caldo Extrato de Malte5% a 30°C, suspensão de esporos 10 ⁵ /ml de meio.....	103
TABELA 23- Composição de compostos voláteis produzidos por <i>Neurospora</i> sp5 em meio Yeast Malt Broth a 30°C, suspensão de esporos 10 ⁵ /ml de meio.	103
TABELA 24- Composição de compostos voláteis produzidos por <i>Neurospora</i> sp5 em meio Czapeck modificado a 30°C, suspensão de esporos 10 ⁵ /ml de meio.....	103
TABELA 25- Composição de compostos voláteis produzidos por <i>Neurospora</i> sp5 em meio Vogel mínimo sacarose a 30°C, suspensão de esporos 10 ⁵ /ml de meio.....	103
TABELA 26- Composição de compostos voláteis produzidos por <i>Neurospora</i> sp5 em meio Vogel mínimo maltose a 30°C, suspensão de esporos 10 ⁵ /ml de meio.....	104
TABELA 27- Composição de compostos voláteis produzidos por <i>Neurospora</i> sp5 em meio Corn Steep com Glicose a 30°C, suspensão de esporos 10 ⁵ /ml de meio.....	104

TABELA 28- Composição de compostos voláteis produzidos por <i>Neurospora</i> sp5 em meio Frutose Extrato de Levedura a 30°C, suspensão de esporos 10 ⁵ /ml de meio.....	104
TABELA 29 – Valores de Threshold dos compostos voláteis de acordo com FOIS et al.,1988, FAZZALANI,1978 e BUTTERY et al., 1988.....	109
TABELA 30 – Concentração de acetaldeído(ppm), tempo de produção do aroma (h), concentração celular(g/L), Produtividade(p)(mg/L.h ⁻¹), rendimento do produto em relação a concentração celular(Y _{p/x})(ppmL/g) para a <i>Neurospora</i> sp1(a), <i>Neurospora</i> sp2(b), <i>Neurospora</i> sp5(c), nos diversos meios testados.....	115
TABELA 31 – Concentração de acetato de etila(ppm), tempo de produção do aroma (h), concentração celular(g/L), Produtividade(p)(mg/L.h ⁻¹), rendimento do produto em relação a concentração celular(Y _{p/x})(ppmL/g) para a <i>Neurospora</i> sp1(a), <i>Neurospora</i> sp2(b), <i>Neurospora</i> sp5(c), nos diversos meios testados.....	116
TABELA 32- Concentração de butirato de etila(ppm), tempo de produção do aroma (h), concentração celular(g/L), Produtividade(p)(mg/L.h ⁻¹), rendimento do produto em relação a concentração celular(Y _{p/x})(ppmL/g) para a <i>Neurospora</i> sp1(a), <i>Neurospora</i> sp2(b), <i>Neurospora</i> sp5(c), nos diversos meios testados.....	117
TABELA 33- Concentração de álcool isoamilico(ppm),tempo de produção do aroma (h), concentração celular(g/L), Produtividade(p)(mg/L.h ⁻¹), rendimento do produto em relação a concentração celular(Y _{p/x})(ppmL/g) para a <i>Neurospora</i> sp1(a), <i>Neurospora</i> sp2(b), <i>Neurospora</i> sp5(c), nos diversos meios testados.....	118

TABELA 34-Concentração de hexanoato de etila(ppm),tempo de produção do aroma (h), concentração celular(g/L), Produtividade(p)(mg/L.h ⁻¹), rendimento do produto em relação a concentração celular(Y _{p/x})(ppmL/g) para a <i>Neurospora</i> sp1(a), <i>Neurospora</i> sp2(b), <i>Neurospora</i> sp5(c), nos diversos meios testados.....	119
TABELA 35 – Concentração de 1-octen-3-ol (ppm), tempo de produção do aroma (h), concentração celular(g/L), Produtividade(p)(mg/L.h ⁻¹), rendimento do produto em relação a concentração celular(Y _{p/x})(ppmL/g) para a <i>Neurospora</i> sp1(a), <i>Neurospora</i> sp2(b), <i>Neurospora</i> sp5(c), nos diversos meios testados.....	120
TABELA 36- Avaliação Sensorial a 25°C e a 30°C da linhagem <i>Neurospora</i> sp1.....	123

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1-Curva de Crescimento <i>Neurospora</i> sp1 em Caldo Extrato de Malte 5%.....	40
Figura 2- Analise dos compostos voláteis produzidos por <i>Neurospora</i> sp1 em Caldo Extrato de Malte 5% a 30°C, suspensão de esporos 10 ⁵ esporos/ml de meio.....	40
Figura 3-Curva de Crescimento <i>Neurospora</i> sp1 em meio Yeast Malt Broth	42
Figura 4- Analise dos compostos voláteis produzidos por <i>Neurospora</i> sp1 em Yeast Matt Broth a 30°C, suspensão de esporos 10 ⁵ esporos/ml de meio.....	42
Figura 5-Curva de Crescimento <i>Neurospora</i> sp1 em Meio Czapeck modificado.....	44
Figura 6- Analise dos compostos voláteis produzidos por <i>Neurospora</i> sp1 em Meio Czapeck modificado a 30°C, suspensão de esporos 10 ⁵ esporos/ml de meio.....	44
Figura 7-Curva de Crescimento <i>Neurospora</i> sp1 em Meio Vogel mínimo sacarose.....	46
Figura 8- Analise dos compostos voláteis produzidos por <i>Neurospora</i> sp1 em Meio Vogel mínimo sacarose a 30°C, suspensão de esporos 10 ⁵ esporos/ml de meio.....	46
Figura 9-Curva de Crescimento <i>Neurospora</i> sp1 em Meio Vogel mínimo maltose.....	48
Figura 10- Analise dos compostos voláteis produzidos por <i>Neurospora</i> sp1 em Meio Vogel mínimo maltose a 30°C, suspensão de esporos 10 ⁵ esporos/ml de meio.....	48

Figura 11-Curva de Crescimento <i>Neurospora</i> sp1 em Meio Corn Steep Liquor sem glicose.....	50.
Figura 12- Análise dos compostos voláteis produzidos por <i>Neurospora</i> sp1 em Meio Corn Steep Liquor sem glicose a 30°C, suspensão de esporos 10 ⁵ esporos/ml de meio.....	50
Figura 13-Curva de Crescimento <i>Neurospora</i> sp1 em Meio Corn Steep Liquor com glicose.....	52
Figura 14- Análise dos compostos voláteis produzidos por <i>Neurospora</i> sp1 em Meio Corn Steep Liquor com glicose a 30°C, suspensão de esporos 10 ⁵ esporos/ml de meio.....	52
Figura 15-Curva de Crescimento <i>Neurospora</i> sp1 em Meio Frutose /Extrato de Levedura.....	54
Figura 16- Análise dos compostos voláteis produzidos por <i>Neurospora</i> sp1 em Meio Frutose/Extrato de Levedura a 30°C, suspensão de esporos 10 ⁵ esporos/ml de meio.....	54
Figura 17a-Concentrações máximas dos compostos voláteis nos meios selecionados produzidos por <i>Neurospora</i> sp1	55
Figura 17b-Concentrações máximas dos compostos voláteis nos meios selecionados produzidos por <i>Neurospora</i> sp1.....	55
Figura 18- Relação entre a produção de butirato de etila e a curva de crescimento da linhagem <i>Neurospora</i> sp1 em meio Vogel maltose.....	56
Figura 19- Relação entre a produção de 1-octen-3-ol e a curva de crescimento da linhagem <i>Neurospora</i> sp1 em meio Yeast Malt Broth.....	56
Figura 20-Curva de Crescimento <i>Neurospora</i> sp2 em Meio Caldo Extrato de Malte 5%.....	64

Figura 21- Análise dos compostos voláteis produzidos por <i>Neurospora</i> sp2 em Meio Caldo Extrato de Malte 5% a 30°C, suspensão de esporos 10 ⁵ esporos/ml de meio.....	64
Figura 22-Curva de Crescimento <i>Neurospora</i> sp2 em Meio Yeast Malt Broth.....	66
Figura 23- Análise dos compostos voláteis produzidos por <i>Neurospora</i> sp2 em Meio Yeast Malt Broth a 30°C, suspensão de esporos 10 ⁵ esporos/ml de meio.....	66
Figura 24-Curva de Crescimento <i>Neurospora</i> sp2 em Meio Czapeck modificado.....	68
Figura 25- Análise dos compostos voláteis produzidos por <i>Neurospora</i> sp2 em Meio Czapeck modificado a 30°C, suspensão de esporos 10 ⁵ esporos/ml de meio.....	68
Figura 26-Curva de Crescimento <i>Neurospora</i> sp2 em Meio Vogel mínimo sacarose.....	70
Figura 27- Análise dos compostos voláteis produzidos por <i>Neurospora</i> sp2 em Meio Vogel mínimo sacarose a 30°C, suspensão de esporos 10 ⁵ esporos/ml de meio.....	70
Figura 28-Curva de Crescimento <i>Neurospora</i> sp2 em Meio Vogel mínimo maltose.....	72
Figura 29- Análise dos compostos voláteis produzidos por <i>Neurospora</i> sp2 em Meio Vogel mínimo maltose a 30°C, suspensão de esporos 10 ⁵ esporos/ml de meio.....	72
Figura 30-Curva de Crescimento <i>Neurospora</i> sp2 em Meio Corn Steep sem glicose.....	73
Figura 31-Curva de Crescimento <i>Neurospora</i> sp2 em Meio Corn Steep com glicose.....	75

Figura 32- Análise dos compostos voláteis produzidos por <i>Neurospora</i> sp2 em Meio Corn Steep com glicose a 30°C, suspensão de esporos 10 ⁵ esporos/ml de meio.....	75
Figura 33-Curva de Crescimento <i>Neurospora</i> sp2 em Meio Frutose /Extrato de Levedura.....	77
Figura 34- Análise dos compostos voláteis produzidos por <i>Neurospora</i> sp2 em Meio Frutose/Extrato de Levedura a 30°C, suspensão de esporos 10 ⁵ esporos/ml de meio.....	77
Figura 35 a – Concentrações máximas dos compostos voláteis nos meios selecionados produzidos por <i>Neurospora</i> sp2.....	78
Figura 35 b – Concentrações máximas dos compostos voláteis nos meios selecionados produzidos por <i>Neurospora</i> sp2.....	78
Figura 36 – Relação entre a produção de butirato de etila e a curva de crescimento da linhagem <i>Neurospora</i> sp2 em meio Frutose/extrato de levedura.....	79
Figura 37 -Curva de Crescimento <i>Neurospora</i> sp5 em Caldo Extrato de Malte 5%.....	86
Figura 38- Análise dos compostos voláteis produzidos por <i>Neurospora</i> sp5 em Caldo Extrato de Malte 5% a 30°C, suspensão de esporos 10 ⁵ esporos/ml de meio.....	86
Figura 39-Curva de Crescimento <i>Neurospora</i> sp5 em meio Yeast Malt Broth	88
Figura 40- Análise dos compostos voláteis produzidos por <i>Neurospora</i> sp5 em Yeast Matt Broth a 30°C, suspensão de esporos 10 ⁵ esporos/ml de meio.....	88

Figura 41 -Curva de Crescimento <i>Neurospora</i> sp5 em Meio Czapeck modificado.....	90
Figura 42 - Análise dos compostos voláteis produzidos por <i>Neurospora</i> sp5 em Meio Czapeck modificado a 30°C, suspensão de esporos 10 ⁵ esporos/ml de meio.....	90
Figura 43-Curva de Crescimento <i>Neurospora</i> sp5 em Meio Vogel mínimo sacarose.....	92
Figura 44- Análise dos compostos voláteis produzidos por <i>Neurospora</i> sp5 em Meio Vogel mínimo sacarose a 30°C, suspensão de esporos 10 ⁵ esporos/ml de meio.....	92
Figura 45-Curva de Crescimento <i>Neurospora</i> sp5 em Meio Vogel mínimo maltose.....	94
Figura 46- Análise dos compostos voláteis produzidos por <i>Neurospora</i> sp5 em Meio Vogel mínimo maltose a 30°C, suspensão de esporos 10 ⁵ esporos/ml de meio.....	94
Figura 47-Curva de Crescimento <i>Neurospora</i> sp1 em Meio Corn Steep sem glicose.....	96
Figura 48-Curva de Crescimento <i>Neurospora</i> sp1 em Meio Corn Steep com glicose.....	98
Figura 49- Análise dos compostos voláteis produzidos por <i>Neurospora</i> sp5 em Meio Corn Steep com glicose a 30°C, suspensão de esporos 10 ⁵ esporos/ml de meio.....	98
Figura 50-Curva de Crescimento <i>Neurospora</i> sp5 em Meio Frutose /Extrato de Levedura.....	100
Figura 51- Análise dos compostos voláteis produzidos por <i>Neurospora</i> sp5 em Meio Frutose/Extrato de Levedura a 30°C, suspensão de esporos 10 ⁵ esporos/ml de meio.....	100..

Figura 52-a-Concentrações máximas dos compostos voláteis nos meios selecionados produzidos por <i>Neurospora</i> sp5.....	101
Figura 52b- Concentrações máximas dos compostos voláteis nos meios selecionados produzidos por <i>Neurospora</i> sp5.....	101
Figura 53- Relação entre a produção de álcool isoamílico e a curva de crescimento da linhagem <i>Neurospora</i> sp5 em meio Frutose/extrato de levedura.....	102
Figura 54- Relação entre a produção de 1-octen-3-ol e a curva de crescimento da linhagem <i>Neurospora</i> sp5 em meio Yeast Malt Broth.....	102
Figura 55- Efeito da temperatura na produção dos compostos voláteis por <i>Neurospora</i> sp1 em meio Caldo Extrato de Malte 5%.....	124
Figura 56- Efeito da temperatura na produção dos compostos voláteis por <i>Neurospora</i> sp1 em meio Yeast Malt Broth.....	125
Figura 57- Perfil de obtenção de acetaldeído para <i>Neurospora</i> sp1 em meio CEM5%, com 10^5 e 10^7 esporos/mL do meio de cultivo.....	129
Figura 58- Perfil de obtenção de acetato de etila para <i>Neurospora</i> sp1 em meio CEM5%, com 10^5 e 10^7 esporos/mL do meio de cultivo.....	129
Figura 59- Perfil de obtenção de butirato de etila para <i>Neurospora</i> sp1 em meio CEM5%, com 10^5 e 10^7 esporos/mL do meio de cultivo.....	130
Figura 60- Perfil de obtenção de álcool isoamílico para <i>Neurospora</i> sp1 em meio CEM5%, com 10^5 e 10^7 esporos/mL do meio de cultivo.....	130
Figura 61- Perfil de obtenção de acetato de etila para <i>Neurospora</i> sp1 em meio Yeast Malt Broth, com 10^5 e 10^7 esporos/mL do meio de cultivo.....	131
Figura 62- Perfil de obtenção de 1-octen-3-ol para <i>Neurospora</i> sp1 em meio Yeast Malt Broth, com 10^5 e 10^7 esporos/mL do meio de cultivo.....	131

RESUMO

Muitas espécies de microrganismos produzem compostos agradáveis de aroma em meio líquido de cultura.

Neste trabalho foram estudados parâmetros do processo fermentativo para a produção de compostos voláteis de aroma por novas linhagens de *Neurospora* sp, isoladas de beiju (massa de mandioca naturalmente fermentada), de várias regiões do Maranhão Brasil.

As três linhagens deste estudo, *Neurospora* sp1, *Neurospora* sp2 e *Neurospora* sp5 produziram aroma bastante agradável de frutas e de fungo, variando apenas sua intensidade, dependendo do meio de cultura utilizado.

Os parâmetros considerados foram: composição do meio de cultura, concentração inicial de esporos, temperatura e adição de precursor.

Nos ensaios para produção de compostos voláteis pelas três linhagens de *Neurospora* sp foram selecionados oito meios de cultura: Caldo Extrato de Malte5%, Yeast Malt Broth, Czapeck modificado, Vogel mínimo sacarose, Vogel mínimo maltose, Corn Steep sem glicose, Corn Steep com glicose e Frutose/Extrato de Levedura. Foi utilizada temperatura de 30°C, com agitação de 200rpm e a formação dos compostos foi acompanhada por 144 horas de fermentação.

Através da utilização da técnica de extração dos voláteis por "Purge and Trap" acoplada a cromatografia gasosa e cálculo do Índice de Retenção, foram identificados 3 classes de compostos: aldeídos (acetaldeido), ésteres (acetato de etila, butirato de etila e hexanoato de etila) e álcoois (álcool isoamílico e 1-octen-3-ol).

Os diferentes compostos apresentaram suas melhores concentrações produzidos por linhagens distintas, em tempos de fermentação e meios de cultura diversos.

O acetaldeido teve sua melhor concentração (98ppm) produzido pela linhagem *Neurospora* sp1 em meio Frutose/Extrato de Levedura com 144horas de fermentação.

Os compostos acetato de etila e butirato de etila foram produzidos nas suas concentrações máximas pela linhagem *Neurospora* sp2, 165ppm em meio Vogel sacarose com 72 horas de fermentação e 17,9ppm em meio Frutose/Extrato de Levedura com 96 horas de fermentação respectivamente.

A linhagem *Neurospora* sp5 produziu as melhores concentrações de : álcool isoamílico, 213 ppm em meio Frutose/Extrato de Levedura com 96 horas de fermentação; hexanoato de etila, 2,6ppm em meio Vogel sacarose com 48 horas de fermentação e de 1-octen-3-ol, 10,3ppm em meio Yeast Malt Broth em 48 horas de fermentação.

No estudo das temperaturas feito com a linhagem *Neurospora* sp1 em meio Caldo Extrato de Malte 5%, a temperatura de 25°C produziu melhores concentrações dos compostos em relação a 30°C; já no meio Yeast Malt Broth a temperatura de 30°C produziu melhores resultados. Na temperatura de 35°C não houve desenvolvimento de aroma.

Os resultados revelaram que as linhagens de *Neurospora* sp deste estudo apresentam potencialidade para produção de compostos voláteis de aroma sendo importante o ajuste das condições de fermentação para melhoria da produtividade e aplicação em indústrias de aromas.

SUMMARY

Several microbial species produce a pleasant odour in liquid culture medium.

It was studied some fermentative processes parameters for the production of volatile compounds of flavour by new strains *Neurospora* sp, isolated from beiju (naturally fermented cassava mass), in the Brazilian State of Maranhão.

The three selected strains, *Neurospora* sp1, *Neurospora* sp2 and *Neurospora* sp5 have produced a very pleasant fruity and mushrooms like aroma, whose intensity varied dependent on the culture medium used.

The parameters used were: culture medium composition, initial spores concentration, temperature and precursor's addition.

Eight culture medium culture medium composition were selected: 5% Malt Extract, Yeast Malt Broth, Czapeck, Vogel sucrose, Vogel maltose, Corn Steep Liquor Glucose and Fructose/Yeast Extract. The temperature chosen was 30°C with agitation of 200 rpm; the production of volatile compounds was followed by 144 hours of fermentation.,

Using Purg and Trap concentration system, coupled with gas chromatography and calculation of retention Index, three classes of compounds could be identified: aldehyds (acetaldehyde), esters (ethyl acetate, ethyl butyrate and ethyl hexanoate) and alcohol (isoamilic alcohol and 1-octen-3-ol).

The different compounds presented their best concentrations produced by distinct strains, under different fermentation times and culture mediums.

The "acetaldeido" had its best concentration (98 ppm) produced by *Neurospora* sp1's strain in Fructose /Yeast Extract medium in 144 hours of fermentation.

The compounds ethyl acetate and ethyl butyrate were produced under their maximum concentration by *Neurospora* sp2's strain, 165 ppm in Vogel Sucrose medium in 72 hours of fermentation and 17,9 ppm in Fructose/Yeast in 96 hours of fermentation respectively.

The *Neurospora* sp5's strain had produced the best concentrations of: isoamilic alcohol, 231 ppm in Fructose/Yeast Extract medium in 96 hours of fermentation; ethyl hexanoate, 2,6 ppm in Vogel Sucrose medium in 48 hours of fermentation and 1-octen-3-ol, 10,3 ppm in Yeast Malt Broth medium in 48 hours of fermentation.

In the temperature studied, with the *Neurospora* sp1's strain in 5% Malt Extract Broth medium, under a temperature of 25°C has produced better concentrations of compounds

than in 30°C; in Yeast Malt Broth medium the 30°C temperature has produced better results. Under 35°C it wasn't found flavour development.

The results have revealed that *Neurospora* sp's strain in this study presented potential for the production of volatile compounds of flavour, being important the adjustment of fermentation conditions to make productivity and application in flavour better.

1 – INTRODUÇÃO

O sabor é uma resposta integrada a uma mistura de estímulos (cheiro, gosto, tato), estando principalmente relacionado com o gosto e aroma. O gosto é devido a compostos não voláteis que interagem com receptores da mucosa bucal e geralmente estão presentes nos alimentos em grandes concentrações.

Já o aroma é dado por compostos voláteis à temperatura ambiente; são percebidos por receptores olfativos na cavidade nasal e estão presentes nos alimentos em concentrações muito baixas. Geralmente, o aroma é o responsável pelo sabor característico, sendo portanto um dos mais importantes atributos em alimentos e bebidas.

O aroma natural é uma mistura muito complexa de compostos químicos, biologicamente ativos, difícil de ser sintetizado quimicamente. Na indústria de alimentos a cada dia que passa se atribui cada vez mais papel importante aos compostos de aroma, sendo que sua síntese é o principal alvo de estudos comerciais.

Segundo Schindler, em 1982 o mercado mundial de aromas e fragrâncias alcançou a cifra de 2 bilhões de dólares ; já em 1992 a indústria de aromas movimentou cerca de 7 bilhões de dólares(L. Janssens), sendo que em 1996 o valor alcançou cerca de 9,7 bilhões de dólares.

Aproximadamente 80% de aromas e fragrâncias utilizados no mundo são produzidos por síntese química tendo como principal motivo a ordem econômica, devido ao fato da diferença de preço entre um composto natural e o sintetizado quimicamente. A vanilina sintética tem valores no mercado entre 50 e 60 dólares /Kg sendo que a vanilina extraída da vagem de vanila sobe para 4000 dólares /Kg. Porém a síntese química apresenta algumas desvantagens como a falta de seletividade, pureza, solubilidade e estereoespecificidade, além de não ser considerada natural.

A grande maioria dos aromas naturais tem sido obtida por processo de extração de vegetais e alimentos em geral. A produção desses aromas tem como desvantagens custos elevados, limitada disponibilidade de matéria prima, variabilidade na qualidade e quantidade dos extratos e dependência às vezes a restrições políticas de mercado.

De encontro à tendência dos consumidores por alimentos que contenham ingredientes e aditivos naturais, a Biotecnologia aparece com um grande potencial de aplicação, pois implica em trabalhar com a natureza envolvendo seres vivos e sistemas biológicos. Sua origem remonta as atividades artesanais da antiguidade na fermentação da cevada para produção de cerveja, panificação e produção de alimentos fermentados como queijo e iogurte. As principais vantagens estão relacionadas aos produtos produzidos por processo biotecnológico, que possuem o "status" de composto natural ; possuem estereoespecificidade e pureza, eliminando a presença de misturas racêmicas ; os aromas podem ser produzidos em condições amenas e propiciam a produção de sabores complexos e leves. Possui também como todos os processos algumas desvantagens como a sua baixa produtividade e custo relativamente alto.

Muitos microorganismos são capazes de produzir aromas biotecnologicamente ,via síntese de novo, que significa produção de compostos por fermentação a partir de nutrientes simples, tais como açúcares e aminoácidos. Os microorganismos podem catalisar conversões específicas de precursores adicionados ou de intermediários, pelo processo de bioconversão ou biotransformação.

Os compostos produzidos através de processos microbianos incluem ésteres, aldeídos, cetonas , lactonas, alcoóis e outras moléculas complexas.

As condições de cultivo tais como composição do meio de cultura (fonte de carbono , fonte de nitrogênio e outros elementos), pH , tempo de fermentação, temperatura de incubação, agitação, e aeração são os fatores determinantes do tipo e quantidade de aroma produzidos, além da linhagem do microorganismo (Sariaslani & Rosazza ,1984; Armstrong & Brown,1988; Gatfield,1988; Scharpf et al ,1992; Janssens et al ,1998; Welsh,1994).

O objetivo deste trabalho foi estudar a correlação entre determinados parâmetros de fermentação e a produção de compostos voláteis de aromapor novas linhagens de *Neurospora* sp. Os parâmetros considerados foram: composição do meio de cultura, temperatura de incubação, tempo de fermentação, concentração inicial da suspensão de esporos e adição de precursores. A quantificação e a identificação dos compostos

produzidos pelo processo fermentativo foi realizada por "Purge and Trap Dynamic Headspace (P&T/ DHS) acoplado a Cromatografia Gasosa.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Há centenas de anos , aromas e fragrâncias tem desempenhado importante função em proporcionar prazer e satisfação ao homem (SCHARPF et al , 1986).

A maioria dos aromas naturais são o resultado de misturas de compostos químicos, biologicamente ativos e a maioria apresenta estruturas complexas, possuindo vários grupos funcionais, além de estarem presentes em baixas concentrações (SARIASLANI & ROSAZZA, 1984).

Por muito tempo, plantas foram a única fonte de compostos de aroma e a maioria destes foram isolados a partir de óleos essenciais. Porém , os componentes sensorialmente ativos, geralmente encontram-se presentes em quantidades mínimas ou ligados a outras substâncias, o que dificulta a sua extração (JANSSENS et al,1986).

Cerca de 84% dos compostos de aroma disponíveis no mercado são produzidos por síntese química ou extração vegetal (JANSSENS et al,1986; KRINGS & BERGER,1998). Atualmente existe tendência a utilização de aromas naturais motivada principalmente pela conscientização por parte dos consumidores com relação a sua saúde, evitando alimentos com aromas artificiais e estimulando o desenvolvimento de produtos naturais(LUGAY, 1986). Esta tendência fica evidente na Alemanha onde em torno de 70% dos aromas utilizados nas indústrias de alimentos em 1990 eram naturais (KRINGS & BERGER,1998).

Segundo TYRELL(1995), existem 3 categorias de aromas naturais:

- 1- Materiais que são formados durante o metabolismo natural de animais e plantas que podem ser usados na forma seca ou extraídos e refinados; ou
- 2- Compostos de aroma formados durante a ação de enzimas e microrganismos ;ou
- 3- Compostos de aroma básicos formados durante o processamento térmico de ingredientes naturais.

Certas condições devem ser garantidas para assegurar que compostos de aroma produzidos biotecnologicamente sejam considerados naturais. Estas condições estipulam que a matéria prima utilizada seja natural e que apenas processos físicos (extração, destilação e cristalização) sejam utilizados para o isolamento e purificação

dos compostos formados ; a biotecnologia é considerada em vários países um processo de obtenção de aromas naturais, desde que as condições anteriores sejam respeitadas (GATFIELD, 1995).

A utilização de microorganismos em alimentos para produção de aromas já é conhecida há centenas de anos. Desde o advento da cerveja, vinho, queijo, além de outros produtos fermentados, processos microbiológicos tem tradicionalmente desempenhado papel fundamental no desenvolvimento de misturas complexas de aroma em alimentos. As raízes da moderna biotecnologia desenvolveram-se a partir de níveis artesanais, chegando nos tempos atuais a grandes indústrias (KRINGS & BERGER,1998; GATFIELD,1988; GATFIELD,1995).

O primeiro estudo sobre produção de aromas por microorganismos foi realizado por OMELIANSKI, em 1923, que apresenta alguns microorganismos e o seu odor característico, sendo que tal habilidade em produzir aroma, era utilizada ao lado de características químicas e morfológicas para classificar os microorganismos.

Microorganismos fornecem uma interessante oportunidade no sentido de melhorar as metodologias já existentes na produção de aromas. Comparados com processos agrícolas podem em alguns casos proporcionar a possibilidade de se tornarem mais independentes das mudanças de qualidade e colheita . Comparados com as vias químicas existentes, os microorganismos podem oferecer melhor especificidade voltados aos passos de transformações de interesse (SCHINDLER & SCHMID,1982).

A produção de aromas a partir de microorganismos, plantas ou tecido animal implica no conhecimento das vias metabólicas da formação dos compostos voláteis, a sua natureza química , além das reações não enzimáticas que poderiam alterar ou destruir aromas desejáveis. A identificação das substancias precursoras destes compostos aromatizantes possibilita aplicações onde o aroma poderia ser produzido durante o preparo do alimento, resultando num forte impacto com perda mínima durante o armazenamento e estocagem. Desse modo, de posse deste conhecimento e utilizando-se a Engenharia Genética, os microorganismos sintetizariam aromas em quantidades comerciais a um custo razoável (LUGAY, 1986).

Microorganismos são sistemas vivos e podem produzir metabólitos que possuem propriedade de aroma. As reações metabólicas são catalisadas pelas enzimas presentes nos microorganismos . Duas estratégias são possíveis para produção de compostos de aroma por processo biotecnológico : biossíntese, também chamada de síntese de novo, onde microorganismos são capazes de produzir compostos de aroma por fermentação a partir de nutrientes simples, como açúcares e aminoácidos; e que microorganismos podem catalisar conversões específicas de precursores adicionados ou intermediários, no processo chamado bioconversão (JANSSENS et al ,1992) .

O caminho biossintético dos microorganismos pode ser manipulado para produzir certas moléculas que são normalmente limitadas a pequenas quantidades por mecanismos celulares de regulação. Indústrias de aroma desenvolvem técnicas para seleção de mutantes onde o processo regulatório é alterado de modo a que metabólitos de interesse tenham sua produção aumentada. Metabólitos primários tais como açúcares e aminoácidos são essenciais para o crescimento celular e também podem contribuir com notas de sabor e odor. Certos aminoácidos e peptídeos são doces enquanto outros são amargos ou salgados (SCHARPF et al, 1986).

Compostos de aroma são resultantes principalmente do metabolismo secundário tanto em plantas quanto em microorganismos (HEATH & REINECCIUS, 1986).Metabólitos secundários são substâncias que não são necessárias para síntese celular (SCHARPF et al, 1986; ABRAHAM & BERGER, 1993). Antibióticos são bons exemplos de metabólitos secundários produzidos por fermentação em escala industrial. Muitos voláteis encontram-se nesta categoria de metabólitos secundários , como álcoois, aldeídos, cetonas, terpenos e lactonas. Os ésteres formados por fungos ,também são exemplos de metabólitos secundários, como mecanismo de remoção de ácidos e álcoois do meio, pois o seu acúmulo seria tóxico para o microorganismo(SCHARPF et al,1986). Microorganismos que produzem metabólitos secundários geralmente sofrem um período de crescimento logarítmico, onde a síntese de metabólitos é desprezível. Quando a cultura está na fase estacionária, normalmente a produção destes metabólitos é aumentada (SCHARPF et al, 1986) .

De acordo com COLLINS citado por SCHARPF(1986), os metabólitos secundários contribuem para a sobrevivência do microorganismo pela inibição de espécies competidoras que poderiam ocupar o mesmo nicho ecológico. Além disso foi sugerido também que em fungos a liberação de voláteis estimularia a germinação de esporos, além de servir como atrativos. Em maçãs , o composto 2-metilbutanoato, além de contribuir no aroma ,serve como atrativo de insetos (ROWAN et al ,1996).

Existem porém casos relatados na literatura onde a produção desses compostos voláteis não ocorre na fase de metabolismo secundário ((BERGER, 1995).Um exemplo desta situação foi demonstrada por (ABRAHAM & BERGER, 1993) ,onde cultura submersa de *Mycena pura* apresentou produção de citronelol já a partir do primeiro dia de fermentação. Outro exemplo é a produção de ácido abscísico por *Cercospora rosicola* , que aumentou em paralelo com a massa celular seca na fase inicial de crescimento (JIANG, 1995).

Segundo HEATH & REINECCIUS(1986) e TRESSL & ALBRECHT(1986), compostos voláteis podem ser formados a partir do metabolismo de lipídios, aminoácidos e carboidratos.

Os compostos voláteis podem ser formados a partir de lipídios por diferentes vias, as quais incluem β oxidação, clivagem de hidroxiácidos (produção de lactonas) e a oxidação via enzimas lipoxigenases. Os produtos primários são aldeídos e cetonas; várias oxidações, reduções e esterificações também produzem quantidades substanciais de ácidos, álcoois, lactonas e ésteres. Segundo JENNINGS citado por HEATH & REINECCIUS (1986), a via da β oxidação fornece a maioria dos compostos voláteis em pêra. A atividade das lipoxigenases gera muitos ésteres alifáticos, álcoois, ácidos e carbonilas encontrados em frutas derivados a partir da degradação oxidativa dos ácidos linoleico e linolenico .

Muitos compostos de aroma tais como álcoois metílicos ramificados, ácidos, ésteres, cetonas, compostos aromáticos que contém enxofre são derivados do metabolismo de aminoácidos. A biossíntese dos aminoácidos nos cloroplastos e plastideos e sua degradação na mitocôndria, envolve reações sequenciais. Em banana, o aminoácido

leucina é transformado em 3 - metil - 1 - butanol e 3-metil butil acetato, importantes compostos de aroma. Aminoácidos aromáticos também servem como importantes precursores para o aroma de frutas. Alguns dos compostos aromáticos tem origem na tirosina e fenilalanina , como é o caso do eugenol.

No caso de aromas formados a partir do metabolismo de carboidratos, considera-se que no metabolismo das plantas , a obtenção de toda energia é diretamente da fotossíntese e esta via envolve a transformação de CO₂ em açúcares os quais são metabolizados nas necessidades da planta como aminoácidos e lipídios. Assim podemos notar que indiretamente os compostos de aroma são resultantes do metabolismo de carboidratos. Alguns poucos compostos, no entanto podem resultar do metabolismo direto de carboidratos, por exemplo ,os terpenos.

Segundo TRESSL & ALBRECHT, 1986, os microorganismos produzem diferentes classes de compostos de aroma através de reações típicas, tais como: oxidações, reduções, hidrólises, nitrificações, denitrificações, isomerizações e esterificações .

Os ésteres estão entre os mais importantes compostos na industria de aromas (HERRAIZ, 1990). São importantes tanto em alimentos naturais , como frutas, quanto em alimentos fermentados. Os ésteres são provavelmente os compostos mais importantes em algumas bebidas alcoólicas (HEATH & REINECCIUS, 1986).

Em frutas estão presentes em baixas concentrações , em torno de 1 a 100 ppm. Foram os primeiros compostos produzidos sinteticamente, porém sabe-se há muito tempo que ésteres podem ser sintetizados por microorganismos (JANSSENS et al ,1992) . OMELIANSKY citado por KRINGS & BERGER, 1998, relatou que alguns microorganismos produziram aroma de maçã, provavelmente devido a formação de 3 metilbutil 3 metilbutirato.. PEREIRA & MORGAN ,1958, identificaram butirato de etila ,isovalerato de etila e hexanoato de etila como principais ésteres responsáveis pelo aroma de fruta produzido por culturas de *Pseudomonas fragi* em leite pasteurizado e queijo, como "off- flavour".

A produção biológica dos ésteres pode ocorrer por alcoólise de compostos acil – CoA ou por esterificação de um ácido orgânico com um álcool (ARMSTRONG & BROWN, 1994).

No caso da alcoólise de compostos acil – CoA , existe uma enzima associada a membrana, álcool acetiltransferase que atua na formação de ésteres. O nível de acetil CoA é muito controlado já que é o principal metabólito consumido no ciclo do ácido tricarbóxico , porém em determinadas condições, os níveis intracelulares podem aumentar significativamente. (ARMSTRONG & BROWN, 1994), por exemplo.

A segunda via, a esterificação direta de determinados álcoois e ácidos orgânicos por microorganismos, pode levar a inúmeros ésteres de importância econômica como butirato de etila (aroma de abacaxi) (ARMSTRONG & BROWN, 1994).

Ésteres de cadeia curta podem ser produzidos através da bioconversão de precursores apropriados. Um exemplo é a utilização de óleo fusel como precursor .que é composto principalmente por 3-metilbutanol e 2-metilbutanol. A levedura *Hansenula miakii* converte estes álcoois nos seus acetatos correspondentes com alto rendimento. Os ésteres produzidos volatilizam-se durante o processo aeróbico e são adsorvidos em carvão ativado. O concentrado final obtido pela desorção do carvão ativado, pode ser usado como aroma natural de banana (GATFIELD 1988; JANSSENS, 1992; WELSH, 1995)

Os terpenos são os maiores constituintes e os responsáveis pelo aroma característico de óleos essenciais. São hidrocarbonetos formados a partir da unidade isoprenóide de 5 carbonos , podendo ser de cadeia aberta ou fechada, saturados ou insaturados. Pelo fato de serem facilmente oxidados, produzindo “off-flavour” , são geralmente removidos dos óleos essenciais (HEATH & REINECCIUS,1986; KEMPLER, 1983).

Terpenos na sua maioria são produzidos por fungos, os quais podem ser encontrados em pinheiros podres e pertencem aos Ascomicetos e Basidiomicetos. Estes fungos são adequados aos processos biotecnológicos devido ao seu comportamento nos meios de cultura , crescendo tanto em meios líquidos ou semi sólidos , de composição simples. O gênero *Ceratocystis* , tem sido muito estudado e é capaz de produzir vários terpenos : citrionelol, geraniol, linalool, nerol e α -terpineol (JANSSENS et al , 1992).

Terpenos são o substrato favorito para o estudo de bioconversão. Muitos microorganismos são capazes de hidrolizar terpenos, produzindo compostos de maior

valor. Um exemplo é a conversão do sesquiterpeno valenceno em notkatona, composto importante no aroma de suco de uva (JANSSENS et al, 1992).

Os terpenos são excelentes substratos para bioconversão estereoespecífica. Como exemplo, a bioconversão da mistura racêmica DL – mentol, que é sintetizada quimicamente. Os isômeros são esterificados principalmente para acetatos, formatos, propionatos ou succinatos. Microorganismos ou esterases isoladas são então utilizadas para hidrolisar especificamente L- mentil para L – mentol (JANSSENS et al, 1992).

Lactonas são compostos potentes de aroma encontrados em grande variedade de alimentos. Estão associadas com aroma de frutas (coco, pêssigo), manteiga, doce e nozes (KEMPLER,1983; JANSSENS et al, 1992).

Devido ao seu baixo valor de “threshold”, as lactonas têm um alto valor comercial (KEMPLER,1983). A maioria das lactonas é produzida quimicamente, porém a utilização de microorganismos para sua produção tem grandes vantagens, principalmente a produção de lactonas opticamente ativas (JANSSENS et al, 1992; GATFIELD, 1995). Microorganismos podem produzir lactonas que muitas vezes requerem múltiplos passos pela síntese química; é o caso do fungo *Trichoderma viride* que produz forte aroma de coco quando cultivado em meio de batata /dextrina. O composto responsável por esse aroma é a lactona 6-pentil-2-pirona na concentração de 170mg/L(JANSSENS et al, 1992; KEMPLER,1983).

Lactonas podem ser formadas a partir de aminoácidos, onde a desaminação oxidativa do ácido glutâmico produz 2-oxoglutarato que é descarboxilado a 4-oxobutirato, reduzido a 4-hidroxibutirato e após ciclização forma δ - butirolactona(HEATH & REINECCIUS, 1986).

Lactonas podem também ser formadas a partir de ácidos graxos. A redução dos ácidos graxos ocorre via β oxidação. Depois de um certo número de ciclos da β oxidação o éster CoA do hidroxiácido graxo é liberado do complexo da β oxidação funcionando como primeiro precursor de lactona (FERON et al,1996).Provavelmente a mais importante lactona seja a δ - decalactona, que pode ser obtida via fermentativa pela β oxidação do óleo de rícino utilizando a levedura *Candida lipolytica* (GATFIELD, 1995).

Pirazinas são compostos heterocíclicos que contêm nitrogênio; contribuem de forma significativa para o aroma de muitos alimentos (KEMPLER, 1983). Estão frequentemente associadas a aroma típico de alimentos aquecidos tostados, normalmente formados na reação de Maillard (HEATH & REINECCIUS, 1986). Alguns vegetais crus possuem típico aroma da presença de certas pirazinas ; por exemplo 2-metoxi-3-isobutil pirazina em pimentão verde, fornecendo evidências de que pirazinas podem ser formadas por mecanismos biológicos (HEATH & REINECCIUS, 1986; GATFIELD, 1986).

A produção de ácidos por microorganismos durante fermentação tem importância para o aroma de muitos alimentos, não somente por sua presença em si, mas por serem substratos para biossíntese de outros compostos de aroma tais como em produtos lácteos (ARMSTRONG & BROWN, 1994).

Provavelmente o primeiro composto de aroma feito via biotecnológica foi o ácido acético produzido quando o vinho é oxidado a vinagre utilizando espécies de *Acetobacter* . Este tipo de bioconversão tem sido utilizado para outros substratos naturais para produção dos ácidos naturais correspondentes que são de interesse para a indústria de aroma. Desse modo, isobutanol que é um dos componentes do óleo fusel , pode ser convertido por certas espécies de *Acetobacter* em ácido isobutírico (GATFIELD, 1986).

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

Cetonas e dicetonas , como os aldeídos são caracterizados pela presença do grupo carbonila e podem ser classificadas em alifáticas, aromáticas ou derivadas de fenol. Cetonas alifáticas, como acetona e diacetil são importantes em aroma de queijos maturados por fungos. Cetonas do tipo 2-alcanonas são responsáveis pelo aroma e sabor típico do queijo Roqueforti. 2-alcanonas podem ser formadas via bioconversão de gorduras, óleos ou ácidos graxos específicos por *Penicillium roqueforti* e por alguns

outros microrganismos. As lipases de *Penicillium* sp liberam ácidos graxos que sofrem β oxidação e descarboxilação chegando a uma 2-alcanona com um átomo de carbono a menos que o ácido graxo original (ARMSTRONG & BROWN, 1994).

Existe grande interesse na produção de acetaldeído, pois este contribue para a nota de frescor e pungência em alimentos e bebidas, bem como em formulações. *Candida utilis* é capaz de oxidar etanol a acetaldeído com rendimento razoável. Melhores rendimentos são obtidos em condições de limitação de ferro (ARMSTRONG & BROWN, 1994).

Ao lado do acetaldeído, existem outros aldeídos naturais com importância comercial. Um exemplo é a vanilina (4 hidróxi 3 metóxi benzaldeído), que é o aroma químico mais apreciado mundialmente. Vanilina natural ocorre nas vagens de *Vanilla planifolia* em nível abaixo de 2% do peso. Atualmente somente 0,2% de vanilina consumida corresponde a vanilina natural. Limitadas reservas e alto preço da fonte natural tem estimulado pesquisas para produção biotecnológica, utilizando como possíveis precursores, lignina, eugenol e ácido ferúlico. Porém baixas produtividades ainda são encontradas, pela toxicidade do precursor e do produto, bem como pela degradação do produto durante a fermentação (KRINGS & BERGER, 1998).

Álcoois normalmente são os menores contribuintes para o aroma, a não ser que estejam presentes em altas concentrações (ppm) ou sejam insaturados como é o caso do 1-octen-3-ol, composto de impacto no aroma de cogumelos (HEATH & REINECCIUS, 1986).

Outros álcoois são importantes como precursores para futuras bioconversões, como por exemplo para ésteres e aldeídos (ARMSTRONG & BROWN, 1994).

Álcoois podem surgir da via metabólica primária de um microorganismo ou pela redução de uma carbonila ao álcool correspondente. Produção de álcool através do metabolismo de aminoácidos pode ocorrer por transaminação, descarboxilação e redução ou por desaminação oxidativa seguida de descarboxilação e redução. Nas duas vias de produção, o produto é sempre um aminoácido menos o grupo amino e um átomo de carbono (HEATH & REINECCIUS, 1986).

A produção de aromas por células vivas depende como em qualquer processo fisiológico de parâmetros exógenos, tais como temperatura, atividade de água, pressão parcial dos gases e grande variedade de nutrientes químicos. Bactérias e fungos podem se adaptar a condições extremas para produção de compostos voláteis((BERGER,1995).

Os efeitos da temperatura e pH precisam ser monitorados rigorosamente durante o processo fermentativo para maximizar o rendimento do composto de interesse . Normalmente, temperatura e pH são ajustados em valores ideais para o crescimento do microorganismo e que algumas vezes não coincide como ótimo da enzima envolvida na bioconversão. Por exemplo, *Mycoacia uda* produz aroma de amêndoa doce; embora a temperatura ótima para crescimento do microorganismo seja 30°C , verificou-se que a temperatura ótima para produção do composto de aroma era de 25°C (ARMSTRONG & BROWN, 1994).

Muitos microorganismos necessitam de oxigênio para o seu crescimento, reprodução e manutenção de suas células, dependendo da linhagem do microorganismo. Aeróbios estritos metabolizam e crescem na ausência de oxigênio livre; como por exemplo, bactérias do gene *Clostridium*, que produzem etanol , butanol e acetona. Os aeróbios estritos metabolizam e crescem somente na presença de oxigênio molecular. Entre os aeróbios, os fungos filamentosos são os que mais produzem compostos voláteis; os microorganismos facultativos são capazes de alterar seu metabolismo dependendo do meio ambiente onde se encontram, por exemplo leveduras industriais como *Saccharomyces*, que produz aroma em pães e vinho (SCHARPF et al , 1986).

Fonte de carbono e nitrogênio são também fatores determinantes do tipo e quantidade dos compostos de aroma produzidos. Compostos que contenham carbono fornecem tanto energia, como componentes celulares. Por exemplo, *Ceratocystis moniliformis*, pode produzir aroma de banana, pêssego e citrus. O aroma produzido é dependente das fontes de carbono e nitrogênio utilizadas na composição do meio de cultura e foi produzido apenas após a depleção da fonte de nitrogênio. Após 5 dias de fermentação

obteve-se 50µg de monoterpenos por mililitro de meio de cultura (BERGER et al,1988; ARMSTRONG & BROWN, 1994; WELSH, 1995).

Fosfatos e elementos traços, como ferro, zinco e magnésio estão envolvidos em várias etapas do metabolismo, conseqüentemente tem papel importante na produção de aroma, não só a presença, mas também a ausência, podem ser fundamentais na produção destes compostos. Por exemplo, o efeito do ferro na produção de acetato de etila a partir de etanol por *Candida utilis*. Sob condições limitadas de ferro , a levedura formou acetil-CoA a partir do etanol, com uma subsequente reação ocorrendo para formação de acetato de etila. No entanto, quando o ferro estava presente , a acetil - CoA foi oxidada no ciclo do ácido tricarboxílico para o crescimento , não promovendo acúmulo do éster acetato de etila (ARMSTRONG & BROWN, 1994).

A especificidade da cepa pode ser muito importante para a produção de aroma e pode haver grande variação entre cepas de um único microorganismo, como é o caso de *Phlebia radiata* que possui no mínimo 25 cepas, sendo que apenas 2 são capazes de produzir compostos de aroma(ARMSTRONG & BROWN, 1994).

PEREIRA & MORGAN (1958) detectaram a presença de ésteres de isovalerato e de acetato como sendo os principais ésteres produzidos por *Pseudomonas fragi* em destilados de leite. A suplementação prévia do leite estéril com etanol estimulou a rápida produção de ésteres pelo microorganismo, sendo que em o éster isovalérico foi o abundante. Os autores mostram evidências de que a presença destes ésteres foi responsável pelo aroma de frutas observado nas culturas .

REDDY et al (1968) identificaram e quantificaram ésteres produzidos por *Pseudomonas fragi* . As culturas de *Pseudomonas fragi* foram isoladas de queijo tipo “Cottage” e de leite pasteurizado com aroma de frutas e em seguida foram inoculadas em leite homogeneizado estéril por 7 dias /21°C . Após o desenvolvimento do aroma típico de frutas, os compostos voláteis identificados por cromatografia gasosa foram: acetato de etila, propionato de etila , butirato de etila, isovalerato de etila e hexanoato

de etila. Os autores observaram que a adição de 0,2% de etanol no meio estimulou a produção dos ésteres. A utilização de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa conferiu identificação positiva dos ésteres acima citados. Os ésteres mais abundantes com aroma de frutas foram butirato de etila e hexanoato de etila. Nas culturas onde o aroma foi mais forte as concentrações dos ésteres foram 0,35 e 0,5 ppm respectivamente.

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

KAMINSKI et al. (1974) identificaram os compostos voláteis produzidos pelos fungos *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus parasiticus*, *Penicillium chrysosenum*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium fumiculosum*, *Penicillium raistrickii*, *Penicillium viridicatum*, *Alternaria*, *Cephasporum* e *Fusarium* sp. Os microorganismos foram cultivados em meio de farelo de trigo a 26-28°C por 28 horas. Os compostos voláteis produzidos foram destilados a baixa temperatura e a pressão reduzida. Os destilados das armadilhas a -40° e -78°C foram extraídos com cloreto de metileno e concentrados. Os concentrados foram analisados por cromatografia gasosa, espectrometria de massa, reações químicas de grupos funcionais e avaliação sensorial. Foram detectados seis componentes nos destilados das culturas que foram identificados como : 3-metil-butanol, 3-octanona, 3-octanol, 1-octen-3-ol, 1-octanol e 2-octen-1-ol. Eles representam 67 a 97% de todos os voláteis que ocorrem no destilado

concentrado. Dentre os voláteis produzidos por fungos, 1-octen-3-ol conferiu um odor característico de cogumelo e foi predominante.

HOSONO et al. (1974) estudaram a produção de esterases por cinco linhagens de bactérias lácticas e duas linhagens psicotróficas pertencentes ao gênero *Pseudomonas* na produção de ésteres etílicos. Todas as linhagens continham esterase capaz de esterificar ácido butírico e ácido capróico com etanol. Nas bactérias lácticas a produção de butirato de etila foi mais alta do que hexanoato de etila. Os autores verificaram que a produção de esterases por todas as linhagens foi muito afetada pelo pH do meio.

LANZA et al. (1976) relataram a produção de aroma por cultura de *Ceratocystes moniliformis*. A avaliação sensorial demonstrou que a qualidade e intensidade do aroma variavam com a composição do meio de cultura e com a idade das culturas. A combinação de cromatografia gasosa e espectrometria de massa foi usada para a identificação dos constituintes voláteis em culturas que apresentaram aroma de fruta: banana, pêsego, pêra e citrus. Os compostos identificados por cromatografia gasosa e espectrometria de massas foram: etanol, acetato de etila, acetato de n-propila, acetato de isobutila e acetato de isoamila. Os resultados indicaram o microorganismo *Ceratocystes moniliformis* como uma fonte potencial de aromas de frutas.

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

ARMSTRONG et al. (1984) estudaram a conversão de etanol para acetato de etila utilizando *Candida utilis*. A formação do éster em meio de glicose foi resultado da utilização do etanol sob condições de aeração apropriada. Esta conversão foi inibida pela suplementação com Fe^{+3} e o pH ótimo para conversão foi relatado ser 5 a 7.

SARRIS & LATRASSE (1985) cultivaram o fungo *Fusarium poae* em caldo de malte e identificaram forte odor de frutas no meio. O aroma predominante de pêssigo em calda foi caracterizado quimicamente como sendo cis-6-dodecen-4-olide, que foi a mais abundante lactona presente no meio (2mg/L). Para a identificação foi utilizada cromatografia gasosa e espectrometria de massa na comparação com os dados de retenção e odores de padrões autênticos. O microorganismo estudado foi isolado de trigo e cultivado também em meio sólido. Os voláteis foram extraídos com diclorometano destilado utilizando-se 3 extrações, que foram posteriormente concentradas. Os concentrados foram fracionados em coluna de sílica reidratada a 25%. As frações isentas de aroma foram descartadas. O forte aroma de frutas foi verificado ser devido as lactonas –penta, -hexa, -hepta, octa-, -nona, -deca, -ondecas, -dodeca, cis-6-dodecen-4-olide e –decalactonas.

BERGER et al. (1987) utilizaram uma linhagem de *Ischnoderma benzoinum* para a produção de voláteis por fermentação. O microorganismo encontrado em madeiras apodrecidas emite um fraco aroma agradável. Os voláteis foram extraídos com pentano:diclorometano(2:1) e concentrados à 40°C. A identificação dos compostos voláteis foi por cromatografia gasosa em coluna capilar e espectrometria de massa. Os principais componentes do aroma foram identificados como o benzaldeído e anisalaldeído. O metabolismo ativo de componentes fenólicos pode ser correlacionado com a habilidade do fungo em degradar lignina de madeira apodrecida. Outros componentes que contribuem para a fragrância encontrada no meio de cultura foram relatados como : 4-octanolide e 2-octen-4-olide, linalool, 1-octanol e octenóis. Foram estudadas as condições de cultivo do microorganismo e a produção de voláteis. A substituição de asparagina, por fenilalanina leva a diminuição da taxa de crescimento,

mas a formação de aromas se processa. A adição de tirosina favorece a formação de anisaldeído, sendo assumido que os aminoácidos são convertidos pela degradação de cadeia lateral e metilação da função hidroxila. O crescimento da cultura de *Ischnoderma benzoinum* foi fortemente inibido na presença de uma fração de óleo de coco. Esta inibição foi atribuída a liberação lipolítica de ácidos graxos que podem interferir na membrana do fungo.

JANSSENS et al. (1988) estudaram a produção de ésteres por *Geotrichium penicillatum*. A composição da fração volátil foi analisada por cromatografia gasosa e espectrometria de massa. O microorganismo estudado foi previamente denominado de *Trichosporum penicillatum* ATCC 42397 sendo classificado como fungo. O meio de cultura utilizado consistiu de 3% glicose, 0,6% peptona e 0,2% de extrato de levedura. Os compostos voláteis produzidos foram arrastados por nitrogênio a 120ml/min e adsorvidos em adsorvente polimérico "Tenax". Antes da injeção no cromatógrafo gasoso, os voláteis foram desorvidos a 200°C por 30min com gás hélio a 15ml/min. Foram identificados os compostos: acetato de propila, crotoato de etila, propionato de isobutila, valerato de etila, butirato de isobutila, isohexanoato de etila, propionato de isopentila, hexanoato de etila e β -fenil etil acetato. A produção dos diferentes ésteres ocorreu em momentos diferentes do crescimento do microorganismo. Os acetatos foram formados após 57 horas de fermentação, propionato e butirato após 75 horas, isobutirato após 87 horas e posteriormente a síntese de isovalerato. A alta produtividade e especificidade dos ésteres produzidos dependeram do tipo de fonte de nitrogênio e da adição de precursores.

LATRASSE et al. (1988) estudaram a produção de ésteres pelo microorganismo *Geotrichium candidum* mutante (Staron). Quando esta microorganismo cresceu em meio de cultura contendo glicerol, uréia, L-asparagina, ácido úrico ou alantoina foi produzido forte aroma de frutas, semelhante ao aroma de marmelada. A análise dos voláteis feita por cromatografia gasosa - espectrometria de massa (CG-MS) revelou a

presença de duas classes principais de voláteis: álcoois e ésteres. Os ésteres responsáveis pelo aroma de fruta predominante na cultura foram os derivados de ácidos graxos de pequena cadeia como propanóico, butanóico, isobutanóico e 2-metilbutanóico. Através da avaliação sensorial pelo “sniffing” no CG, foi verificado que o aroma de marmelo foi sentido durante a eluição do etil isobutanoato enquanto que o aroma de levedura foi percebido durante a eluição do 2-fenil etanol. A concentração da maioria dos voláteis foi inferior a 1ppm. Os ésteres produzidos desapareceriam no quarto dia de fermentação, enquanto o pH do meio aumentava. Além dos ésteres foram identificados os álcoois isobutanol, 2-metil butanol e 2-fenil etanol. Tais álcoois são relatados ser originários de valina, leucina, isoleucina e fenilalanina respectivamente.

RAYMOND et al. (1990) estudaram a influencia de fatores físicos, tais como temperatura, velocidade de agitação, pH e biomassa , na produção de aroma de morango por *Pseudomonas fragi* em meio a base de leite desnatado em 72 horas de fermentação. Os principais compostos identificados por cromatografia gasosa foram: butirato de etila, hexanoato de etila, 2-hexenoato de etila, isovalerato de etila e 2-metil hexanoato de etila. Os melhores resultados para butirato de etila (17ppm) e para hexanoato de etila (8ppm) foram obtidos com 60 horas de fermentação, a temperatura de 11°C , com agitação de 150rpm. Foi observado o desenvolvimento de “off – flavour” com altas temperaturas e altas velocidades de agitação.

RAYMOND et al. (1991) estudaram o aumento da produção de aroma de frutas por *Pseudomonas fragi* cultivada em leite desnatado, soro de leite, suplementado com ácidos graxos de C₃ a C₇ carbonos. O microorganismo estudado produziu hexanoato de etila, butirato de etila, ácido hexenóico etil éster, crotonato de etila, 2-metil hexanoato de etila e isovalerato de etila. O tempo para adição de ácidos graxos teve efeito no crescimento e na produção de aroma. A adição de ácidos graxos a 0 hora aumentou a produção de ésteres de C₃ a C₇ para cerca de 1500 vezes os valores reportados anteriormente. A produção de metabólitos de odor foi retardada pela adição de ácidos graxos livres no começo do período de fermentação.

CORMIER et al. (1991) relataram a análise de voláteis produzidos por *Pseudomonas fragi* cultivado em leite. O microorganismo estudado produziu um agradável aroma de morango quando cultivado em leite desnatado a 15°C. Os voláteis produzidos no meio de cultura foram extraídos e coletados usando método de “purge and trap”. Os ésteres butirato de etila, 3-metil butanoato de etila e hexanoato de etila foram os compostos de maior contribuição para o aroma.

PASTORE et al. (1994), através de isolamento de linhagens de leveduras obtidas de pólen de flor, frutas maduras e plantas, isolaram uma linhagem de *Geotrichum* sp de mamão. A linhagem selecionada foi cultivada em três diferentes meios de cultura: Meio G – 5% de glicose e 40 ml de extrato de levedura aquoso por 100 ml de meio; Meio F – 5% de frutose e 40 ml de extrato de levedura aquoso por 100 ml de meio; e Yeast Malt sem ágar.

Os compostos produzidos foram identificados através de “Dynamic Headspace” e por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Após dois dias de incubação a 30°C, foi verificada a presença de aroma que se assemelha ao de maçã e morango através de testes sensoriais. Obteve-se 22 compostos sendo que os de maior concentração foram identificados como: acetato de etila, 2-propanol, propionato de etila, butirato de etila, isovalerato de etila, 2-metil 1-propanol, 3-metil 1-butanol e hexanoato de etila.

ABRAHAM & BERGER (1994) estudaram os voláteis produzidos por 20 linhagens de Basidiomicetes, que comparados com outros microorganismos, os compostos produzidos por eles, são os mais próximos aos voláteis produzidos por plantas. Os autores através de cromatografia gasosa e espectrometria de massa identificaram 123 compostos, sendo a maioria álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres e fenóis. Os autores observaram a formação de 40 álcoois diferentes, a maioria deles em quantidades acima de 100µg/L sendo que os mais abundantes foram os álcoois superiores; a maioria das linhagens produziu: 1-butanol, 2-metil-1-propanol e 3-metil-1-propanol. Foram

identificados 4 aldeídos alifáticos e 7 aromáticos com predominância do benzaldeído. 12 cetonas foram identificadas e a maioria delas eram alifáticas, 3-hidroxi-2-butanona, 3-octanona, 4-metil-3-penten-2-ona . Foram também identificados 19 ésteres, sendo 15 deles aromáticos , 4 alifáticos e 14 lactonas.

FABRE (1995) cultivaram *Kluyveromyces marxianus* em um meio definido e verificaram a formação de um forte aroma de banana, que provavelmente seja devido a produção de acetato de isoamila. Foram analisados os álcoois, aldeídos, ácidos e ésteres através de cromatografia gasosa combinada com espectrometria de massa. Os resultados revelaram que os ácidos foram produzidos após 63 horas, enquanto a biossíntese dos ésteres começou após 70 horas de fermentação. As mudanças cinéticas de cada um dos compostos durante 120 horas de fermentação foram diferentes, porque são usados vários caminhos metabólicos. Além disso, tais variações na concentração de cada componente foram dependentes da sua própria volatilidade. Os compostos predominantes foram: álcool isoamílico, álcool 2-feniletílico e ácido isobutírico, com 180mg/L, 400mg/L e 290mg/L respectivamente.

MARQUES (1998) , estudou a levedura *Pichia membranefaciens* em diversas condições de cultivo, tais como variação da composição do meio de cultura, pH do meio, temperatura e tempo de incubação, visando a obtenção de aromas de frutas. Foram selecionadas as fontes de carbono: glicose, frutose e manose ; como fonte de nitrogênio, autolisado de levedura e extrato de levedura. Os principais compostos voláteis produzidos por *Pichia membranefaciens* foram: acetato de etila, isobutanol, 1-butanol, propanoato de etila, álcool isoamílico, álcool n-amílico, acetato de isoamila, acetato de n-butila, caproato de etila e álcool feniletílico. Estes compostos foram analisados por cromatografia gasosa e identificados por espectrometria de massa.

BRAMORSKI et al. (1998) testaram a eficácia da fermentação semi-sólida em diferentes substratos de resíduos agro-industriais, no crescimento e produção de aroma de fruta por *Ceratocystis fimbriata*. Foram preparados 7 meios de cultura

utilizando bagaço de mandioca, resíduos de maçã, feijão de soja e amaranto. O meio contendo amaranto produziu aroma de abacaxi e os meios contendo bagaço de mandioca, feijão de soja e resíduos de maçã produziram forte aroma de frutas. Foram identificados 6 álcoois, 5 ésteres, 1 ácido, 1 aldeído e 2 cetonas por cromatografia gasosa.

OLIVEIRA (1998) estudou alguns parâmetros para produção de metilcetonas por uma nova linhagem de *Aspergillus* sp . Através de cromatografia gasosa acoplada a detetor seletivo de massas e de cálculo de índice de retenção foram identificadas quatro principais metilcetonas: 2-pentanona, 2-heptanona, 2-nonanona e 2-undecanona., sendo que as maiores concentrações encontradas quando foi utilizado creme de leite de cabra foram 0,5, 1,4, 2,4 e 0,4 mg/g respectivamente. Foi observado que as melhores condições para produção de metilcetonas foram : período de incubação de 96 horas a 30°C, pH 4,5 e sistema de reação contendo uma mistura de lipase e esporos da linhagem nº 1099. O estudo também concluiu que uma suspensão de lipase isenta de esporos foi incapaz de produzir metilcetonas.

DAMASCENO (1999) avaliou o cultivo de *Geotrichum fragrans*, microrganismo isolado de manipueira, (resíduo líquido da industrialização da mandioca com alto teor de cianeto e portanto altamente poluente) que além de produzir biomassa ,exala aroma de frutas em decorrência de sintetizar compostos voláteis . Os compostos voláteis identificados deste cultivo foram: 1-butanol, 3-metil 1-butanol, 2-metil 1-butanol, 1-3 butanodiol , feniletanol, acetato de etila, propionato de etila, 2-metil propionato de etila e 2-metil propanóico. A produção de compostos voláteis pelo *Geotrichum fragrans* esteve associada a fase de geração de biomassa, sendo detectado o aroma de frutas desde as primeiras horas de cultivo.

SHEAR & DODGE ,1927 estudaram o fungo róseo do pão, como era conhecido primeiramente o microorganismo *Neurospora* pelo fato da grande e quase incontrolável contaminação ocorrida em padarias. Foi isolado de bagaço de cana de açúcar e

registrado pelo nome de *Monilia sitophila* onde foi observada a produção de conídias e peritécios. Mais tarde comparando a formação de peritécios , conídias e ascosporos entre três diferentes espécies de *Monilia* verificou-se que essas características eram importantes para a classificação taxonômica deste fungo, pois enquanto a quantidade de peritécio era produzido em abundância por uma espécie ,era bastante escassa por outras, além do tamanho que também apresentou muita variação.

Os autores reportaram ainda que entre as três espécies estudadas , *N.crassa*, *N. sitophila* e *N. tetrasperma* , as duas primeiras são heterotáticas e a ultima homotática . O resultado das investigações levou ainda ao conhecimento de que o fungo róseo do pão foi conhecido por muitos outros nomes no decorrer de seu estudo até ser classificado dentro de gênero *Neurospora* : *Penicillum sitophilum*, *Oidium aurantiacum*, *Monilia martini* , *Oospora aurantiaca*, *Monilia aurantiacum*, *Oospora lupuli*, *Oidium lupuli* , *Monilia aurea*, *Monilia cabonaria* e *Melanospora margini*. Três novas espécies de *Neurospora* foram identificadas neste trabalho , conhecidas por *N. sitophila*, *N. crassa* e *N. erythraea* .

PARK et al ,1982 descreveram a microflora do beiju e suas características bioquímicas . Observaram que *Aspergillus niger* , *Rhizopus delemar* e *Paelomyces sp* são produtores de amiloglicosidase e ainda que *Paelomyces sp* produz alfa – amilase ácida. Os autores verificaram que além da produção de enzimas amilolíticas no beiju, linhagens de *Neurospora sp* isoladas produziam um forte aroma de frutas . As características morfológicas de *Neurospora* foram descritas após incubação da linhagem em meio de Agar Batata Dextrose por 48 horas como colônias alaranjadas , conídias medindo de 7-14 µm de diâmetro e micélios septados de 3,5 – 7,0µm .Quanto à atividade amilolítica não foi detectada atividade da alfa – amilase pela linhagem de *Neurospora*. Houve atividade de amiloglicosidase , porém num valor muito baixo quando comparados com a atividade da enzima pela outras linhagens isoladas do beiju de mandioca.

YOSHIZAWA et al.(1988) estudaram a produção de aroma de frutas por linhagem de *Neurospora sp.* A linhagem de *Neurospora sp* ATCC 46892 isolada por Park et al no Brasil em três diferentes meios de cultura líquidos , à temperatura de 30°C e verificaram a maior produção de aroma quando a linhagem foi cultivada em caldo extrato de malte 5% por 2 a 3 dias , apresentando forte aroma de fruta como pêssego, pêra ou maçã. O meio foi filtrado em membrana e o filtrado foi saturado com cloreto de sódio e extraído com acetato de etila. Os extratos orgânicos foram analisados por cromatografia gasosa com coluna capilar de sílica fundida. Nos resultados obtidos houve predominância do composto hexanoato de etila ,e também a presença de 3-metil - 1- butanol e acetoína. Na análise quantitativa ,foi encontrado mais que 30 ppm de hexanoato de etila após 3 a 4 dias de fermentação . Estes resultados sugeriram que o hexanoato de etila produzido é o responsável pelo forte aroma de fruta.

YAMAUCHI et al (1989) descreveram uma nova enzima acilcoenzima A – álcool acil transferase encontrada em extrato livre de células de *Neurospora sp* ATCC 46892 que produziu hexanoato de etila abundantemente no meio de cultura. A enzima estudada catalisou a esterificação entre etanol e n-hexanoil coenzima A . A enzima também atuou sobre n-butilil coenzima A, mas não em acetil coenzima A. Esta enzima desempenhou importante papel na biossíntese de ésteres etílicos os quais foram formados com etanol e acilcoenzima A .Os autores estabeleceram algumas características da enzima álcool acil transferase como a sua localização no citoplasma, pH ótimo em torno de 8,0 , aumento da atividade com NaCl e não inibição pelos ácidos graxos insaturados .Os autores concluem que esta enzima é importante na biossíntese de ésteres etílicos e embora tenha sido encontrada em *Neurospora sp* é possível que esta enzima possa existir em microorganismos que produzem ésteres etílicos de uma maneira geral.

YAMAUCHI et al (1989) isolaram e purificaram a enzima álcool acil transferase de *Neurospora sp* ATCC 46892 . A enzima apresentou peso molecular em torno de 30000 Daltons , temperatura ótima de 25°C a pH 8,0 , estável até 43°C e pH de estabilidade

entre 3,0 e 9,0 . Quanto à especificidade pelo substrato , a enzima apresentou atividade em vários acil coenzima A contendo mais que quatro carbonos em uma cadeia linear como n-octanoil coenzima A , n-decanoil coenzima A, n-heptanoil coenzima A e n-hexanoil coenzima A, porém não apresentou atividade sobre o n-propanoil coenzima A e acetil coenzima A (com menos de 4 carbonos na cadeia) .

Yamauchi et al (1991) estudaram a produção de aroma por 12 linhagens de *Neurospora*, incluindo a classificada como ATCC 46892, uma linhagem de *Neurospora* sp isolada no Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP e outras linhagens da Coleção de culturas do Instituto de Fermentação, Osaka, Japão. As linhagens foram inoculadas em caldo de malte 5% e cresceram aeròbicamente a 30° C por 3 a 5 dias . Os voláteis foram extraídos com acetato de etila e analisados por cromatografia gasosa e espectrometria de massa. Todas as linhagens tiveram um crescimento significativo em caldo de malte sendo que apenas as linhagens isoladas de Beiju produziram aroma característico de frutas e de cogumelo. As linhagens de *Neurospora* sp ATCC 46892 e *Neurospora* T produziram 29,6 e 17,2 ppm respectivamente de hexanoato de etila, responsável pelo aroma de frutas. As linhagens produziram quantidade significativo de álcool isoamílico e acetoína. As linhagens *Neurospora sitophila* IFO 4596 e *Neurospora* sp T apresentaram 20,1 e 1,65 ppm respectivamente de uma substancia identificada como 1-octen-3-ol responsável pelo aroma de cogumelo dentre outros compostos .

PASTORE et al (1994) estudaram oito linhagens de *Neurospora* sp isoladas de Beiju de várias regiões do Estado do Maranhão, Brasil. Foram estudadas também linhagens de *Neurospora* sp cedidas pela NRRL(Northern Regional Research Laboratory , USDA, Peoria ,Illinois,USA) e também linhagens de *Neurospora* sp isoladas do solo do Estado de São Paulo. O meio de cultura de *Neurospora* ATCC46892 e os outros meios de cultura das outras linhagens isoladas de Beiju apresentaram aroma de frutas, porém as linhagens de *Neurospora* da coleção de culturas NRRL e as linhagens isoladas do solo do Estado de São Paulo não produziram aroma de frutas. A linhagem *Neurospora sitophila* ATCC 46892 produziu etil hexanoato (59 ppm) , 3 metil-1- butanol, 1-octen-

3-ol, acetato de etila e etanol. Etil hexanoato tem um forte aroma de frutas e todos os meios de cultura de *Neurospora* sp isolados a partir de Beiju apresentaram aroma de frutas devido ao etil hexanoato. 1-octen-3 ol tem aroma de cogumelo sendo que *Neurospora sitophila* ATCC 46892 produziu 40 ppm de 1-octen-3 ol.

YAMAUCHI et al (1996) estudaram o efeito de irradiação de luz no meio de cultura de três linhagens de *Neurospora* sp produtoras de aroma e verificou uma diminuição da quantidade de caproato de etila no meio de cultura ; a luz reduz a atividade da enzima álcool aciltransferase. Os autores também estudaram o efeito da luz na produção de 1-octen-3 ol e verificaram que ao contrário do caproato de etila , a quantidade de 1-octen-3-ol aumenta coma irradiação de luz no meio de cultura com exceção de *Neurospora sitophila* IFO4596 que produz grande quantidade apenas no escuro.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – MATERIAIS

3.1.1 – REAGENTES

- Padrões Cromatográficos:

Acetaldeído, acetato de etila, butirato de etila, álcool isoamílico, hexanoato de etila, 1-octen-3-ol e hexanol – 1(Reagentes Sigma-Grau Analítico)

3.1.2 - EQUIPAMENTOS

- Estufas Bacteriológicas Fanen mod. 002 – CB
- Balança analítica Mettler mod. H – 10
- Autoclave Fanen mod 415
- Shaker refrigerado New Brunswick Scientific mod. G 25
- Shaker refrigerado programável INNOVA 4335
- Sistema HP 7695 Purge and Trap Concentrator
- Cromatógrafo Hewlett Packard (HP) , modelo 6890, equipado com detector de ionização de chama (CG – FID) , utilizando coluna HP – Innovax (30m x 0,25mm x 0,25 μ)

3.2 - MÉTODOS

3.2.1 – Linhagens de *Neurospora* sp

Neste estudo foram utilizadas inicialmente 5 linhagens de *Neurospora* sp isoladas de amostras de Beiju (produto de fermentação artesanal de massa de mandioca obtido na região de Tutóia – MA , utilizada para produção de bebida alcoólica indígena chamada Tiquira), pertencentes ao Laboratório de Bioaromas - FEA UNICAMP.

As linhagens foram conservadas em tubo inclinado em meio Saboraud.

3.2.2 – Seleção das linhagens para produção de compostos voláteis

Foram selecionadas linhagens de *Neurospora* sp que apresentaram forte aroma de fruta ou cogumelo, após incubação a 30°C por 72 horas em Caldo Extrato de Malte 5% , através de avaliação sensorial por painel não treinado.

3.2.3 – Produção da suspensão de esporos

Em tubos de ensaio contendo o meio Agar dextrose batata (PDA) inclinado, as linhagens selecionadas foram inoculadas e os tubos incubados a 30°C durante 4 dias. Após o período de incubação , a cada tubo foi adicionado 10ml de água destilada estéril ; a superfície foi raspada e a suspensão de esporos foi homogeneizada em tubo estéril e o número de esporos foi obtido pela contagem em Câmara de Neubauer, utilizando corante Azul de Algodão .

3.2.4 – Composição dos meios de cultura para a produção de compostos voláteis

As linhagens de *Neurospora* sp previamente selecionadas foram testadas em 8 diferentes meios de cultura quanto às fontes de carbono , nitrogênio, adição de sais minerais e vitamina, com o objetivo de se determinar de forma qualitativa e quantitativa a melhor composição do meio de cultura para a produção de compostos voláteis:

Meio 1 : Caldo Extrato de Malte 5% (OXOID)

Meio 2 : Yeast Malt Broth :(g%) – glicose : 1g ; peptona : 0,5g ; extrato de levedura: 0,3g ; extrato de malte : 0,3g.

Meio 3 :Vogel mínimo com sacarose (para 1000ml): 3g citrato de sódio; 5g KH_2PO_4 ; 0,1g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 5mg ácido cítrico. $1\text{H}_2\text{O}$; 5mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1mg $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$;0,25mg $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,05mg H_3BO_3 ; 0,05mg $\text{Na}_2\text{MoO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 5 μg biotina e 20 g de sacarose.(Vogel , 1956)

Meio 4 : Vogel mínimo com maltose (para 1000ml): 3g citrato de sódio ; 5g KH_2PO_4 ; 0,1g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 5mg ácido cítrico. $1\text{H}_2\text{O}$; 5mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1mg $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$;0,25mg $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0.05mg H_3BO_3 ;0,05mg $\text{Na}_2\text{MoO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 5 μg biotina e 60 g de maltose.(Vogel , 1956)

Meio 5 :Meio Czapeck modificado(Thom&Raper, 1945), para 100ml :4,06g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$;1g K_2HPO_4 ;0,5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;0,5g KCl ; 0,001g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 30g de sacarose

Meio 6 : Corn Steep Liquor com glicose : glicose : 6g,2g fosfato de amonio; 2,5g de óleo de soja; 0,068g KH_2PO_4 ; 8,0 ml de água de maceração de milho(Corn steep liquor) , tampão citrato pH – 5,0 10mM e 100ml de solução mineral composta de (g/L): $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$:2,3g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$:0,1g; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$:0,023g; $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$:0,06g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0,08g e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 0,03g.

Meio 7 : Corn Steep Liquor sem glicose: 2g fosfato de amonio; 2,5g de óleo de soja; 0,068g KH_2PO_4 ; 8,0 ml de água de maceração de milho(Corn steep liquor) , tampão citrato pH – 5,0 10mM e 100ml de solução mineral*.

*Solução Mineral(g/L) : $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$:2,3g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$:0,1g; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$:0,023g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,06g ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0,08g e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 0,03g.

Meio 8 : Frutose 5% e Extrato de levedura 0,5%

3.2.5 - Efeito da composição dos meios de cultura na produção de compostos voláteis em relação ao tempo

Frascos Erlenmeyer de 250mL contendo 50mL de cada meio selecionado, previamente esterilizados por 15 minutos a 121°C/1atm de pressão foram inoculados com a suspensão de esporos das linhagens de *Neurospora* sp numa concentração de 10^5 esporos/ml de meio.

Os frascos Erlenmeyer foram incubados por períodos de 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas a temperatura de 30 °C, com agitação de 200rpm.

Após os períodos de incubação, os meios de cultura foram filtrados em papel de filtro Whatman nº1 .

3.2.6 - Efeito da temperatura de incubação na produção de compostos por linhagens de *Neurospora* sp

Frascos Erlenmeyer de 250ml contendo 50ml dos meios Caldo Extrato de Malte 5% e Yeast Malt Broth , previamente esterilizados por 15 minutos /121°C / 1atm, foram inoculados com suspensão de esporos de *Neurospora* sp 1 na concentração de 10^5 esporos /ml no meio de cultura.

Os frascos foram incubados a 25°C e 30°C e 35°C por períodos de 24, 48, 72,96, 120 e 144 horas com agitação de 200 rpm.

3.2.7 – Efeito da adição de precursor na produção de compostos voláteis por linhagem de *Neurospora* sp 1

Em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 ml de meio Yeast Malt Broth, adicionado de 0,5% de óleo de soja , previamente esterilizados por 15 minutos a 121°C/1atm, foram inoculados com suspensão de esporos da linhagem *Neurospora* sp1 para uma concentração de 10^5 esporos /mlno meio de cultura.

Os frascos foram incubados por 24,48,72,96,120 e 144 horas a 30°C com agitação de 200rpm .

A formação de aroma foi acompanhada sensorialmente por painel não treinado a cada 24 horas de fermentação.

3.2.8 – Efeito da concentração da suspensão de esporos na produção de compostos voláteis por linhagem de *Neurospora* sp1

Em frascos Erlenmeyer de 250mL contendo 50mL dos meios Caldo Extrato de malte 5% e Yeast Malt Broth, previamente esterilizados por 15 minutos a 121°C/1atm , foram inoculados suspensões de esporos para concentrações de 10^5 e 10^7 esporos /mL no meio de cultura.

3.2.9 - Métodos analíticos

3.2.9.1– Determinação da Curva de Crescimento das Linhagens de *Neurospora* sp

Frascos Erlenmeyer de 250mL contendo os meios selecionados para o estudo, previamente esterilizados por 15 minutos a 121°C/1 atm de pressão, foram inoculados com suspensão de esporos para concentração de 10^5 esporos /ml de meio. Os frascos foram incubados sob agitação de 200rpm a temperatura de 30°C por um periodo de 24 a 144 horas de fermentação.

Após os tempos pré-determinados de incubação, os meios foram filtrados em papel de filtro Whatman nº1, previamente tarados e a massa celular foi lavada tres vezes com água destilada para remoção dos resíduos do meio. A massa seca foi quantitativamente determinada secando-se as células a 105°C por 24 horas e após este periodo , foram pesadas.

3.2.9.2 - Medida de pH

Após cada período de incubação os meios de cultura foram filtrados em papel Whatman nº1 e os sobrenadantes foram recolhidos para determinação do pH.

3.2.9.3 -Análise dos Compostos Voláteis por "Purge and Trap / Dynamic Headspace" (P&T/DHS)

Os sobrenadantes foram recolhidos e acondicionados em frascos de vidro , lacrados com septo de borracha e tampa de alumínio . Os frascos contendo as amostras foram armazenados em freezer a -10°C até análise. Os frascos foram mantidos a temperatura ambiente por 30 minutos. Em balão volumétrico de 10 ml foi adicionada solução estoque de Padrão Interno (Hexanol-1) para uma concentração final de 5 ppm (6 μl) e o volume completado com a amostra.

Aliquotas de 0,5ml da amostra (adicionada de Padrão Interno), foram transferidas para o frasco amostrador de 5 ml com "frit" do sistema "Purge and Trap".

Tabela 1 - Condições de Extração dos Voláteis por "Purge and Trap / Dynamic Headspace"

Tempo de pré-aquecimento da amostra	3 minutos
Temperatura da Amostra	50°C
Tempo de Purga	10 minutos
Temperatura do Trap na Purga	30°C
Fluxo de Gás de purga (Hélio)	30 ml/minuto
Pré-aquecimento de Desorção	185°C
Temperatura de Desorção	225°C
Tempo de Desorção	2 minutos
Fluxo do Gás de Arraste na Desorção (Hélio)	1 ml/minuto
"Bake Time"	10 minutos
"Bake temp"	230°C
Temperatura da Linha de Transferência	200°C

Foi utilizado Cromatógrafo Gasoso, Hewlett Packard modelo 6890 com detector de ionização de chama (FID) e as condições de análise foram : Detector mantido a 250°C e o injetor a 200°C.O forno mantido a 30°C por 5 minutos e elevado até 100°C numa razão de 15°C por minuto, permanecendo nesta temperatura por 2 minutos; foi então aquecido até 200°C numa segunda razão de 10°C por minuto e mantido nessa temperatura final por 5 minutos. O gás de arraste utilizado foi o Hélio na vazão de 1,0ml/min.

A quantificação dos compostos foi feita contra o padrão interno (hexanol-1) monitorando-os relativamente à curva de calibração de padrões autênticos de: acetaldeído, acetato de etila, butirato de etila, álcool isoamilico, hexanoato de etila e 1-octen-3-ol.

3.2.9.4 – Avaliação Sensorial por Painel não Treinado

Os frascos erlenmeyer foram avaliados sensorialmente por painel não treinado de 05 provadores, os quais avaliavam a intensidade e a descrição do aroma formado. Os provadores tiveram liberdade para descrever a nota percebida.

A escala de intensidade do aroma percebido foi padronizada do seguinte modo:

- + fraco
- ++ moderado
- +++ forte
- ++++ muito forte

3. 2. 10-Confirmação da Identidade dos Compostos Voláteis produzidos por linhagens de *Neurospora sp*

O método utilizado para confirmação de identidade dos compostos voláteis foi padronizado por VAN DEN DOOL & KRATZ (1963) e calcula o índice de retenção em cromatografia gasosa.

Os compostos voláteis identificados por cromatografia gasosa tiveram sua identidade confirmada calculando - se o Índice de Retenção em cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama (FID) relativo a uma mistura de hidrocarbonetos lineares dos picos das amostras e dos picos dos padrões autênticos.

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

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

Onde:

IR = Índice de Retenção

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

T_{rcn} = Tempo de retenção do hidrocarboneto que possui tempo de retenção após T_{rx}

T_{rcn-1} = Tempo de retenção do hidrocarboneto que possui tempo de retenção anterior

T_{rx}

C_n = Número de átomos de carbono do hidrocarboneto com T_{rcn}

C_{n-1} = Número de átomos de carbono do hidrocarboneto com T_{rcn-1}

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Seleção de linhagens de *Neurospora* sp através de avaliação sensorial por painel não treinado .

O resultado da avaliação sensorial, após 72 horas de incubação, em meio Caldo Extrato de Malte 5% e meio Czapeck encontra-se na Tabela 2.

As linhagens de *Neurospora* sp 1, sp2 e sp5 foram selecionadas para as etapas posteriores do trabalho por apresentarem os aromas agradáveis mais acentuados.

Tabela 2 - Avaliação sensorial das cinco linhagens de *Neurospora* sp.

	Caldo Extrato de Malte	Meio Czapeck
<i>Neurospora</i> sp1	+++ abacaxi / + cogumelo	++ maçã
<i>Neurospora</i> sp2	+++ abacaxi maduro / + cogumelo	+ maçã
<i>Neurospora</i> sp3	++ abacaxi passado / + cogumelo	++ maçã
<i>Neurospora</i> sp4	++ doce de fruta, caramelo	++ maçã
<i>Neurospora</i> sp5	++ cogumelo	+ fruta passada
<i>Neurospora sitophila</i> ATCC 46892	++++ abacaxi maduro	+ maçã

4.2 – Identificação Tentativa dos compostos voláteis produzidos por Novas linhagens de *Neurospora sp*

Padrões autênticos (acetaldeído, acetato de etila, butirato de etila, álcool isoamílico, hexanoato de etila e 1-octen-3-ol) foram eluidos juntamente com uma mistura de hidrocarbonetos lineares, o que permitiu conhecer seus índices de retenção e assim com a eluição das amostras produzidas, foi possível obter os índices de retenção dos compostos indicados pela cromatografia gasosa identificados pela coincidência do tempo de retenção relativo com aqueles dos padrões autênticos, e tentativamente confirmados como sendo os compostos voláteis em questão.

Tabela 3 - Índice de Retenção dos compostos produzidos

COMPOSTO	ÍNDICE DE RETENÇÃO DO PADRÃO	ÍNDICE DE RETENÇÃO DA AMOSTRA
Acetaldeído	342	342
Acetato de Etila	1401	1397
Butirato de Etila	2636	2632
Alcool Isoamílico	1433	1428
Caproato de Etila	1597	1604
1- Octen- 3-ol	713	718

4.3 - Estudo da composição do meio de cultura para produção de compostos voláteis em relação ao tempo de fermentação pela linhagem *Neurospora sp1*

Na tabela abaixo encontram-se os dados referentes a avaliação sensorial realizada nos oito meios de cultura selecionados, com avaliação da nota e intensidade do aroma produzido pela linhagem *Neurospora sp1*.

A seguir os dados referentes a variação de pH do meio de cultura, da massa celular seca e a composição dos compostos voláteis produzidos em cada meio selecionado.

Tabela 4 – Avaliação sensorial da linhagem *Neurospora sp.1* nos meios de cultura selecionados.

	CEM	YMB	CZA	VS	VM	CS	CSG	FEL
24h	Abacaxi +++	Maçã ++	maçã +	Frutal ++	Maçã <+	-	frutal ++	frutal +
48h	Abacaxi ++++	Cogumelo ++	maçã ++	Frutal ++	Maçã +	-	cogumelo ++ frutal +	frutal ++
72h	Abacaxi ++	Cogumelo ++++	maçã ++	Frutal +	maçã +	-	cogumelo + frutal +	frutal + cogumelo ++
96h	Abacaxi ++	Cogumelo ++	maçã ++	Frutal +++	Frutal ++++	-	cogumelo + frutal +	frutal ++
120h	Abacaxi ++	Cogumelo ++	maçã ++	Frutal +	frutal +++	-	cogumelo + frutal +	frutal + cogumelo +
144h	Abacaxi +	Cogumelo +	Maçã +	Frutal +	Maçã +++	-	cogumelo <+	frutal ++

CEM - Caldo extrato de malte 5%

CZA- Czapeck

VM- Vogel maltose

CSG- Corn Steep Liquor com glicose

YMB- Yeast malt Broth

VS- Vogel sacarose

CS- Corn Steep Liquor sem glicose

F/EL- Frutose/ Extrato de Levedura

Pela tabela 4, observamos que a linhagem *Neurospora* sp1 produz aroma em todos os meios de cultura selecionados, com exceção do meio Corn Steep sem glicose.

O aroma obtido variou de frutal, em alguns meios, lembrando abacaxi e maçã, até cogumelo. Com relação ao aroma frutal a maior intensidade foi alcançada em meios Caldo extrato de malte 5% com 72 horas de fermentação, onde o aroma foi caracterizado como de abacaxi e em Vogel maltose com 96 horas, sendo caracterizado como frutal. Em meio Czapeck, o aroma encontrado foi puro e extremamente agradável de maçã.

O aroma de cogumelo foi obtido na sua maior intensidade em meio Yeast Malt Broth com 72 horas de fermentação.

4.3.1 - Caldo Extrato de Malte 5% (CEM 5%)

Os carboidratos presentes no caldo extrato de malte são indicados para as necessidades de crescimento de (fungos) , particularmente se o pH do meio é ácido , bem como para produção de compostos de aroma.(DIFCO MANUAL)

A avaliação sensorial (Tabela 4) realizada por painel não treinado revelou que a linhagem *Neurospora* sp1 quando fermentada em CEM 5% apresentou aroma muito agradável, forte e puro de abacaxi já com 24 horas de fermentação sendo que com 48 horas há um aumento na sua intensidade . Após este período ocorre uma queda que se mantém constante até 144 horas de fermentação.

A Figura 1 mostra as mudanças na biomassa e nos valores de pH na determinação da curva de crescimento da linhagem *Neurospora* sp1 quando cultivada em CEM 5% . A biomassa alcançou um rápido crescimento atingindo seu ponto máximo em 96 horas (12,6g/L) .O aumento da massa celular foi acompanhado de uma leve acidificação do meio de cultura, sendo em seguida observado que o pH aproxima-se da neutralidade.

Os compostos hexanoato de etila e 1-octen-3-ol foram encontrados em traços somente com 24 horas de fermentação (Tabela 5)

O acetaldeído (Tabela 5 e Figura 2) teve a sua maior concentração (12,8ppm) com 24 horas de fermentação no início da fase estacionária, seguido de queda em 72 horas (traços) (Tabela 5). Já com 96 horas de fermentação observa-se um novo pico de concentração (9,2ppm) ,coincidindo com a aproximação do pH a neutralidade (pH – 6,0) (Figura 1).

Os compostos butirato de etila e álcool isoamilico foram produzidos nos 6 dias de fermentação sendo as melhores concentrações com 48 horas de fermentação: 8,7ppm e 4,9ppm, respectivamente (Tabela 5 e Figura 2).

O acetato de etila foi o composto encontrado com a maior concentração (89,5ppm) com 48 horas de fermentação.

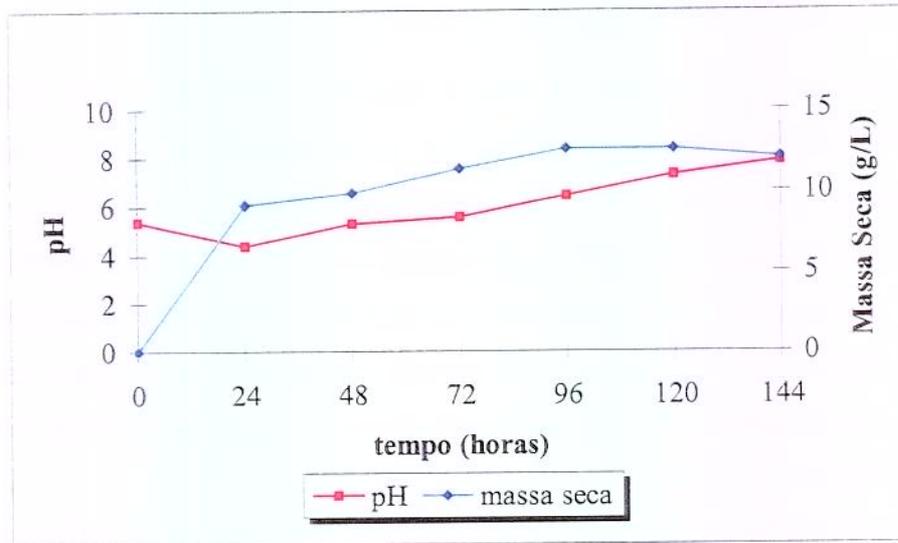


Figura 1- Curva de crescimento *Neurospora* sp1 em Caldo Extrato de Malte 5%

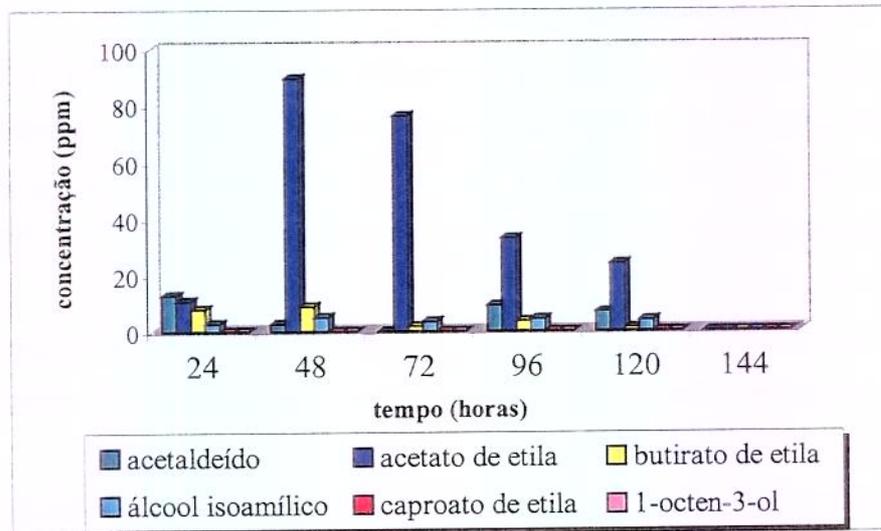


Figura 2 - Avaliação de compostos voláteis produzidos por *Neurospora* sp1 em Caldo Extrato de Malte 5% a 30°C, suspensão de esporos 10^5 /ml de meio.

4.3.2 –Meio Yeast Malt Broth (YMB)

A avaliação sensorial (Tabela 4) realizada por painel não treinado mostrou que a linhagem *Neurospora* sp1 quando cultivada em Meio YMB, em 24 horas já apresenta aroma bastante agradável de maçã, mas a partir de 48 horas de fermentação a nota do aroma muda, caracterizando-se por forte cheiro de cogumelo, que é mais acentuado com 72 horas de fermentação, se mantendo até 144 horas.

A Figura 3 mostra as mudanças na biomassa e nos valores de pH na determinação da curva de crescimento da linhagem *Neurospora* sp1 em meio YMB. Nota-se que a biomassa tem um valor máximo em 48 horas (5,8g/L) .Neste meio o aumento da biomassa foi acompanhado pela elevação do pH durante todo o tempo de fermentação chegando a alcançar o valor de 8,0.

A análise por cromatografia gasosa revelou a presença de acetaldeído e butirato de etila apenas em traços (Tabela 6 e Figura 4). Por outro lado podemos observar a presença de acetato de etila e 1-octen-3-ol, sendo suas maiores concentrações 45ppm e 6,7ppm com 48 horas de fermentação (Tabela 6 e Figura 4).

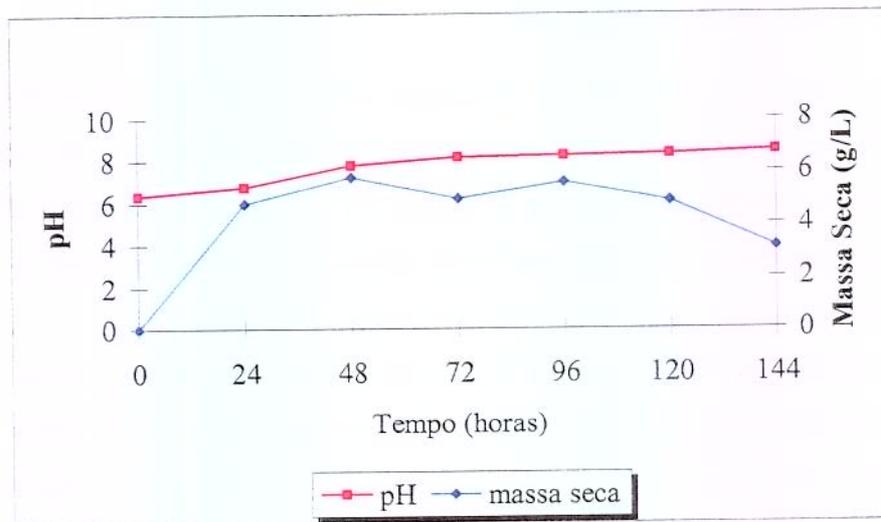


Figura 3 - Curva de crescimento *Neurospora* sp.1 em meio Yeast Malt Broth

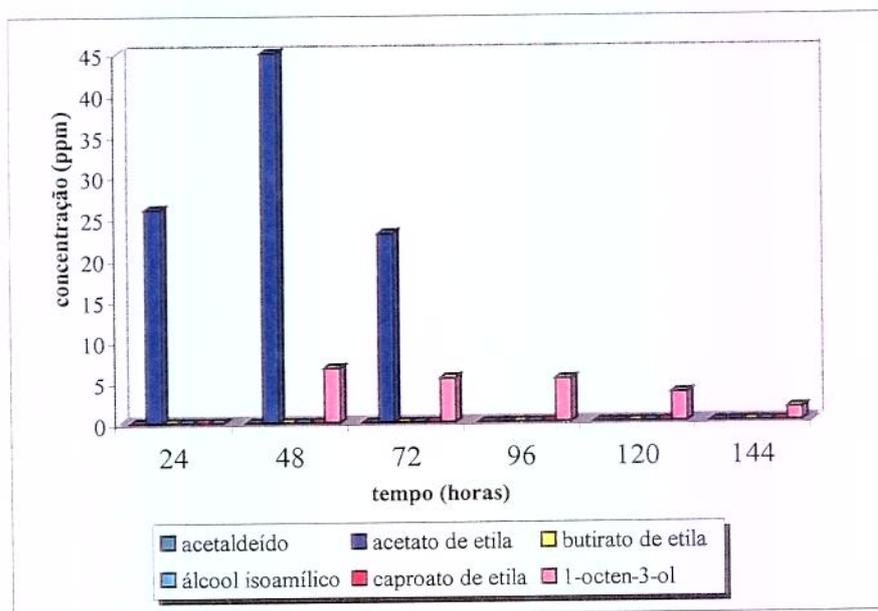


Figura 4 - Gráfico de compostos voláteis produzidos por *Neurospora* sp.1 em Yeast Malt Broth a 30°C, suspensão de esporos 10^5 /ml de meio.

4.3.3 – Meio Czapeck- Dox modificado (Cz. mod)

A avaliação sensorial realizada por painel não treinado mostrou que a linhagem *Neurospora* sp1 quando cultivada em meio Czapeck modificado apresentou aroma leve, porém extremamente agradável e puro de maçã fresca durante os 6 dias de fermentação(Tabela 4).

A Figura 5 mostra as mudanças na biomassa e nos valores de pH na determinação da curva de crescimento da linhagem *Neurospora* sp1 em meio Cz. mod. , onde a biomassa teve um discreto aumento em 24 horas de fermentação (0,16g/L) , aumentando ao longo do tempo ,atingindo seu pico máximo com 96 horas (2,08g/L).Note-se que durante o aumento da biomassa, ocorreu acidificação do meio de cultura alcançando em 96 horas de fermentação um pH 4,0.

A análise por cromatografia gasosa revelou a presença de traços de 1-octen-3-ol e hexanoato de etila e a ausência de álcool isoamílico (Tabela 7 e Figura 6).

As melhores concentrações em meio Cz.mod. foram de acetaldeido (10ppm) , acetato de etila (4,6 ppm) e butirato de etila (0,6ppm) com 96 horas de fermentação (Tabela 7 e Figura 6) coincidindo neste caso com o pico de massa celular (Figura 5).

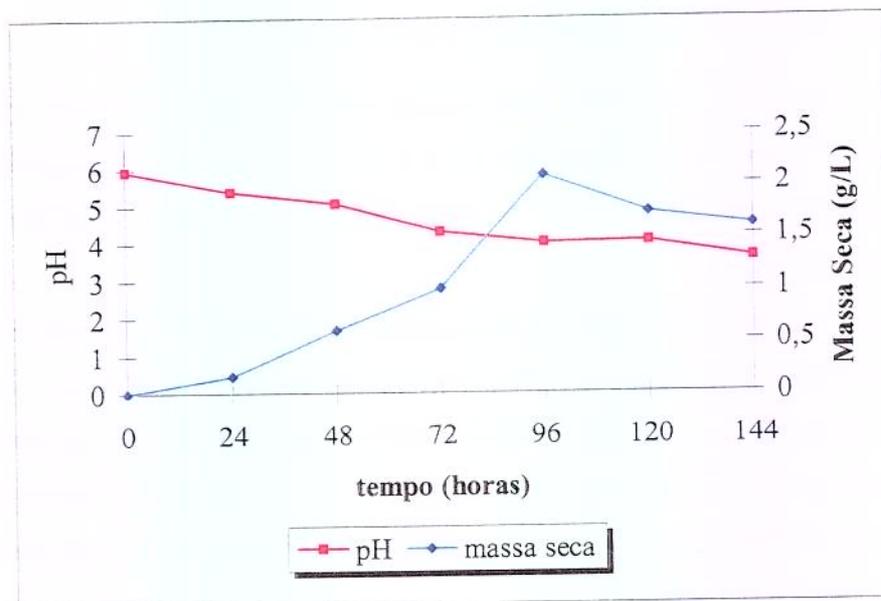


Figura 5 - Curva de crescimento *Neurospora* sp.1 em meio Czapeck

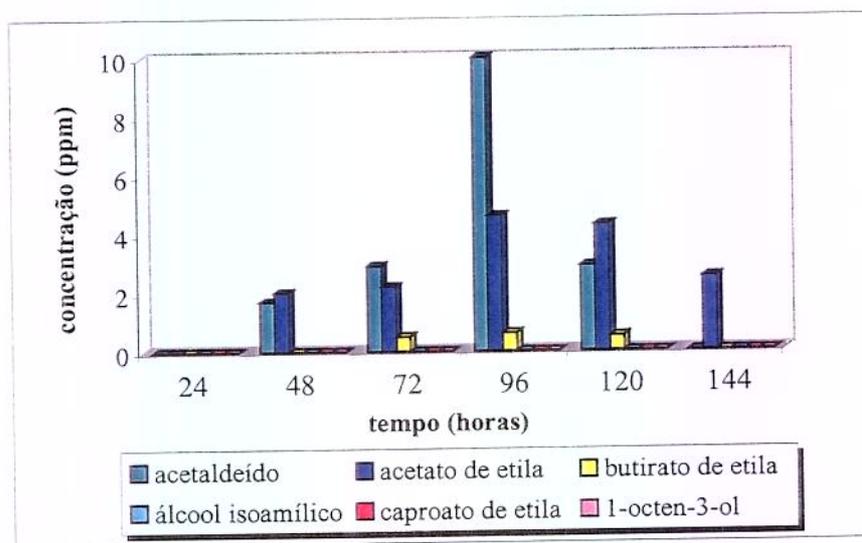


Figura 6 – Análise de compostos voláteis produzidos por *Neurospora* sp.1 em meio Czapeck a 30°C, suspensão de esporos 10^5 /ml de meio.

4.3.4 – Meio Vogel mínimo com sacarose

A avaliação sensorial realizada por painel não treinado mostrou que a linhagem *Neurospora* sp1 quando cultivada neste meio apresentou aroma de fruta muito agradável, lembrando uma mistura de maçã, pêra e abacaxi com uma intensidade maior em 96 horas de fermentação (Tabela 4).

A Figura 7 mostra as mudanças na biomassa e nos valores de pH na determinação da curva de crescimento da linhagem *Neurospora* sp.1 em meio Vogel mínimo com sacarose onde após 24 horas de fermentação a linhagem *Neurospora* sp1 tem um discreto aumento em sua biomassa (1,6g/L), elevando-se gradualmente, até atingir um valor máximo com 72 horas de fermentação. O pH durante o crescimento do microrganismo mostrou apenas discreta acidificação do meio de cultura.

A análise dos compostos voláteis por cromatografia gasosa revelou a presença de hexanoato de etila e álcool isoamílico apenas em traços e a ausência de 1-octen-3-ol (Tabela 8 e Figura 8).

As maiores concentrações foram para acetaldeído (30 ppm) em 48 horas, acetato de etila (58 ppm) com 96 horas de fermentação e butirato de etila (4,5ppm) com 48 horas (Tabela 8 e Figura 8).

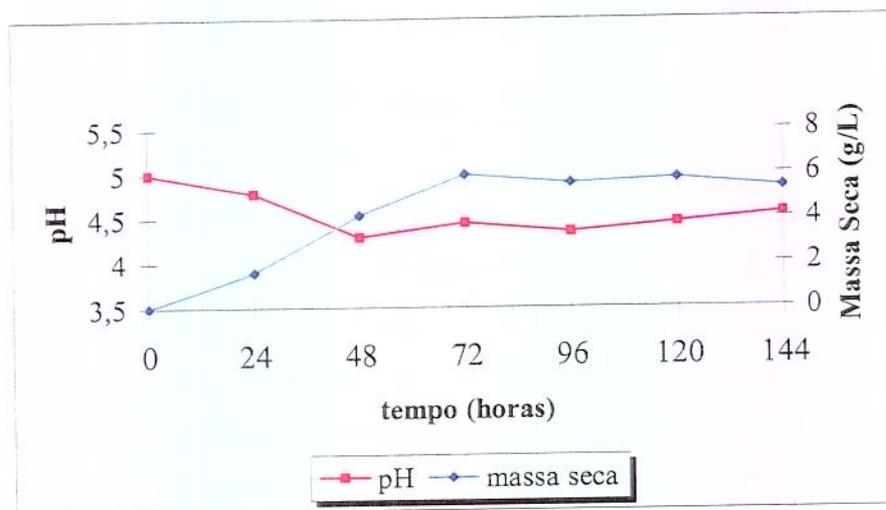


Figura 7 - Curva de crescimento *Neurospora* sp.1 em meio Vogel sacarose

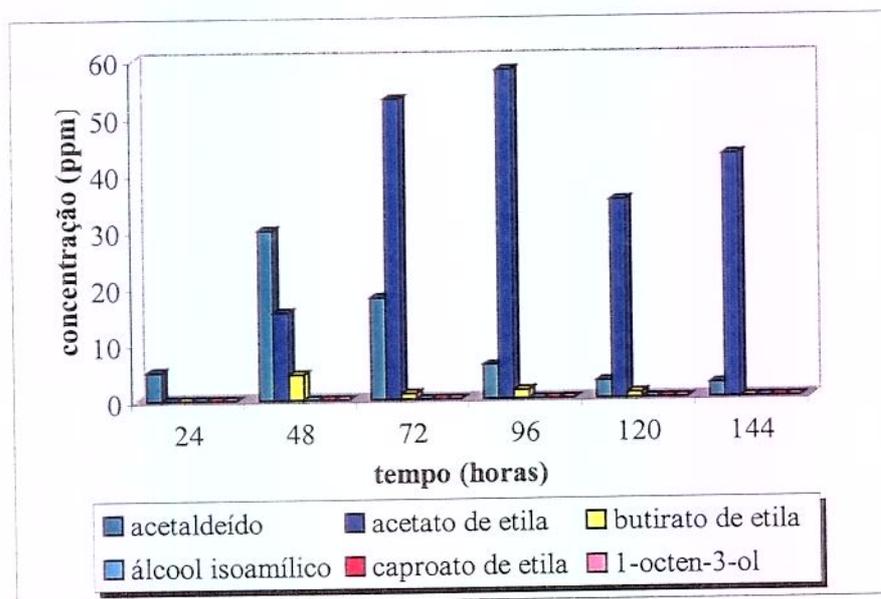


Figura 8 - Análise de compostos voláteis produzidos por *Neurospora* sp.1 em Vogel Sacarose a 30°C, suspensão de esporos 10^5 /ml de meio.

4.3.5 - Meio Vogel mínimo com maltose

A avaliação sensorial realizada por painel não treinado (Tabela 4) mostrou que a linhagem *Neurospora* sp.1 quando cultivada em meio Vogel mínimo maltose apresentou aroma de fruta fresca extremamente agradável, lembrando pêra, abacaxi e maçã, já com 24 horas de fermentação, cuja intensidade máxima foi sentida com 96 horas.

A Figura 9 mostra as variações na biomassa e nos valores de pH na determinação da curva de crescimento da linhagem *Neurospora* sp.1 neste meio, onde podemos observar que após 24 horas de fermentação apenas um discreto aumento na biomassa (0,98g/L) com acentuado aumento após este período obtendo seu pico máximo com 96 horas (9,22g/L). O aumento da massa celular é acompanhado de acidificação discreta do meio de cultura sendo que em 72 horas o pH alcançou o seu valor mínimo de 3,5. Após este tempo o pH volta a aumentar alcançando um valor de 4,5 em 144 horas, próximo ao pH inicial.

A análise por cromatografia gasosa (Tabela 9 e Figura 10) revelou a presença de traços de hexanoato de etila e a ausência de 1-octen-3-ol.

Acetaldeído, acetato de etila, butirato de etila e álcool isoamilico tiveram as suas maiores concentrações com : 62ppm(144hs), 50ppm(120hs), 14ppm(96hs) e 5,8 ppm(144hs), respectivamente (Tabela 9 e Figura 10).

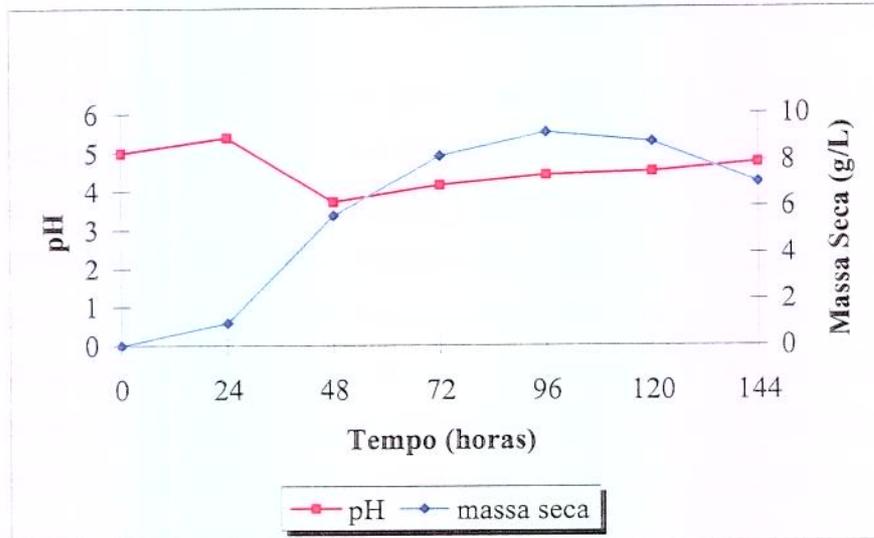


Figura 9 - Curva de crescimento *Neurospora* sp.1 em meio Vogel Maltose

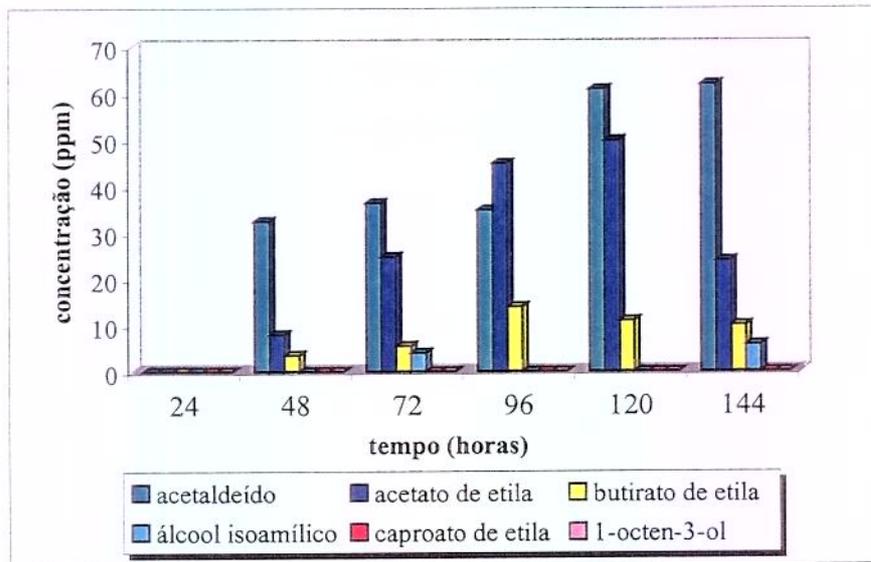


Figura 10 - Análise de compostos voláteis produzidos por *Neurospora* sp.1 em Vogel maltose a 30°C, suspensão de esporos 10^5 /ml de meio.

4.3.6 - Meio Corn Steep Liquor sem glicose (CSL)

A avaliação sensorial realizada por painel não treinado (Tabela 4) mostrou que a linhagem *Neurospora sp. 1* quando cultivada em CSL apresentou aroma indefinido, desagradável e muito fraco.

A Figura 11 mostra as variações na biomassa e nos valores de pH na determinação da curva de crescimento da linhagem *Neurospora sp 1* em meio CSL . Com 24 horas de fermentação já se observa aumento de massa celular (1,8g/L) com crescimento máximo em 48 hs (2,6g/L). O pH do meio de cultura durante o tempo de fermentação sofre um aumento variando de 5,0 para 8,23.

A análise por cromatografia gasosa (Tabela 10 e Figura 12) revelou a presença de um único composto, acetato de etila cuja maior concentração foi 94ppm em 96hs de fermentação.

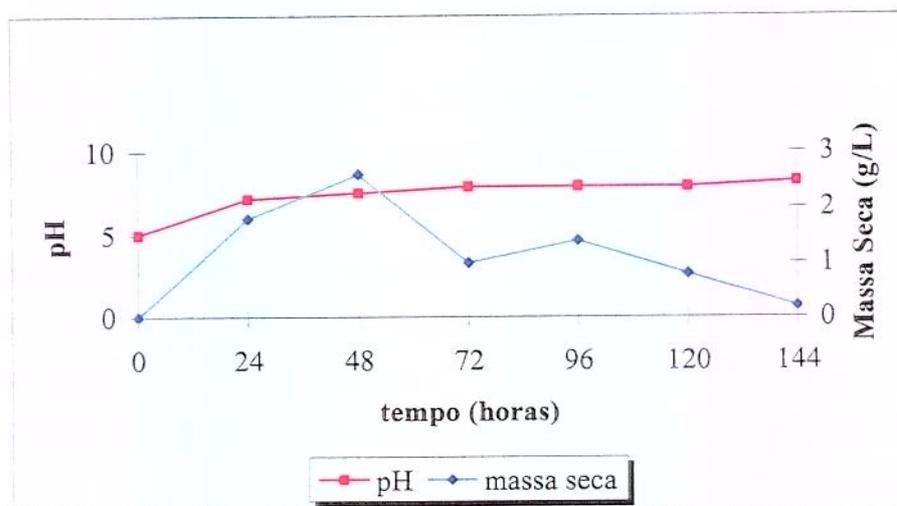


Figura 11 - Curva de crescimento *Neurospora* sp.1 em meio Corn steep sem glicose

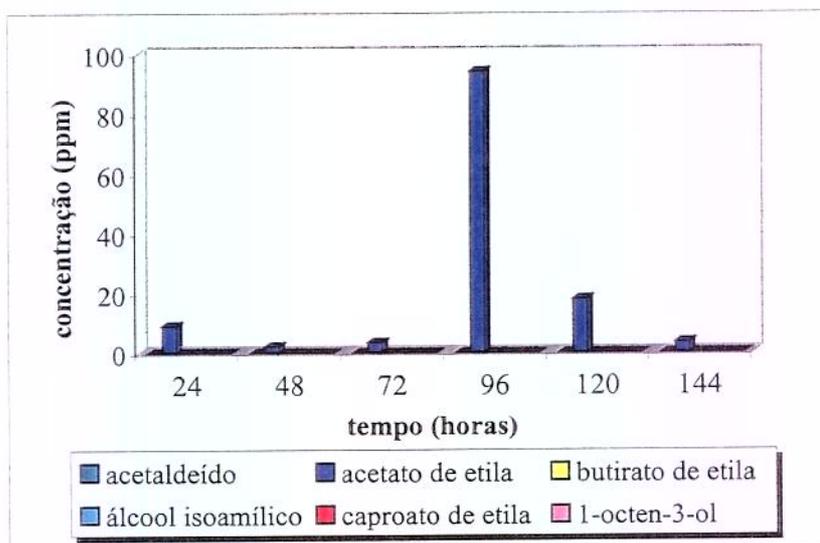


Figura 12 – Análise de compostos voláteis produzidos por *Neurospora* sp.1 em meio Corn steep sem glicose a 30°C, suspensão de esporos 10^5 /ml de meio.

4.3.7 - Meio “Corn Steep Liquor” com glicose (CSLG)

A avaliação sensorial realizada por painel não treinado (Tabela 4) mostrou que a linhagem *Neurospora* sp. 1 quando cultivada em CSLG ,com 24 hs apresenta aroma moderado puro e bastante agradável de fruta (abacaxi). Com 48 hs ,além da nota frutal (mais leve), mostrou aroma moderado de cogumelo ,continuando até 120 hs de fermentação.

A Figura 13 mostra as variações na biomassa e nos valores de pH na determinação da curva de crescimento da linhagem *Neurospora* sp1 em meio CSLG ,onde ocorreu aumento gradual na massa celular com um pico máximo em 72 hs de fermentação (11,2g/L). Até 24 horas de fermentação, não há mudanças no pH, sendo que a partir deste tempo, o meio de cultura sofre uma alcalinização, alcançando um valor de 8,0 em 144 horas.

A análise por cromatografia gasosa revelou a presença de álcool isoamílico apenas em traços com 24 horas, não estando presente mais em nenhum outro tempo de fermentação (Tabela 11 e Figura 14).

Os compostos acetaldeído, acetato de etila, butirato de etila, 1-octen-3-ol , tiveram suas maiores concentrações: 12,8ppm/24hs, 50,6ppm/ 24hs, 1,5ppm/24hs, 0,5ppm/24hs e 2,3ppm/48hs, respectivamente (Tabela 11 e Figura 14).

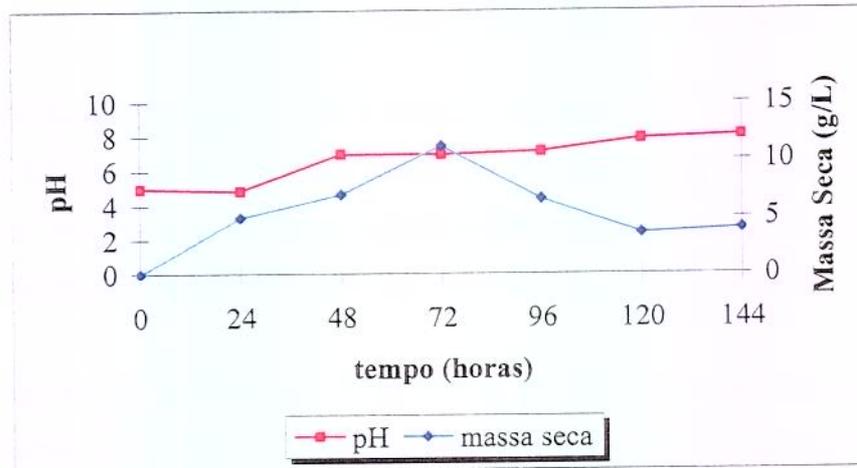


Figura 13 - Curva de crescimento *Neurospora* sp.1 em meio Corn steep com glicose

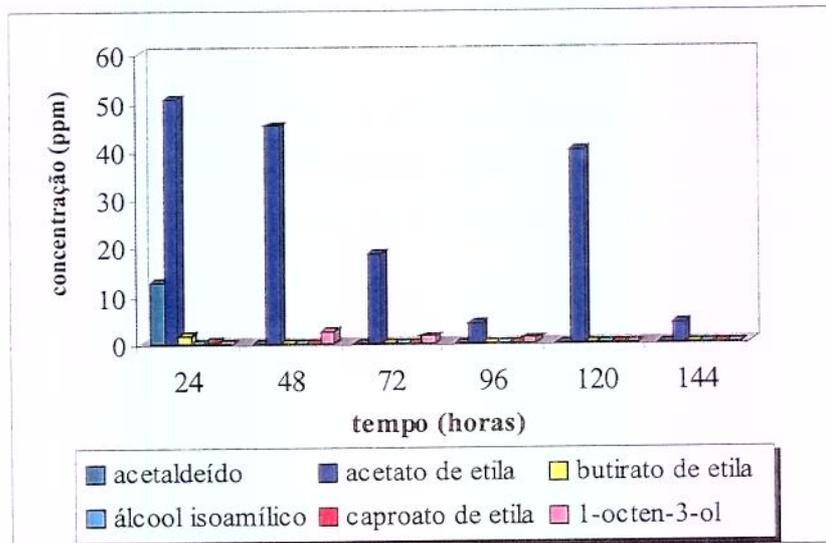


Figura 14 - Análise de compostos voláteis produzidos por *Neurospora* sp.1 em meio Corn steep com glicose a 30°C, suspensão de esporos 10^5 /ml de meio.

4.3.8 - Meio Frutose /Extrato de Levedura

A avaliação sensorial realizada por painel não treinado (Tabela 4) mostrou que a linhagem *Neurospora* sp. 1 quando cultivada em meio Frutose/Extrato de Levedura apresentou nos 6 dias de fermentação aroma agradável de fruta variando de leve a moderado . Com 72 e 120 horas de fermentação além do aroma frutal, foi possível notar a formação de aroma moderado de cogumelo.

A Figura 15 mostra as variações na biomassa e nos valores de pH na determinação da curva de crescimento da linhagem *Neurospora* sp. 1 em meio Frutose /Extrato de Levedura onde observa -se que o máximo de biomassa é alcançado com 48 horas de fermentação (1,29g/L) . Os valores de pH durante o tempo de fermentação sofrem um aumento variando do pH inicial de 5,0 para 6,3 com 144 hs de fermentação.

A análise por cromatografia gasosa (Tabela12 e Figura 16) revelou a presença de acetaldeído ,acetato de etila , butirato de etila, álcool isoamílico ,hexanoato de etila e 1-octen - 3 - ol onde suas melhores concentrações foram: 55ppm/48hs, 67ppm/144hs, 11,4ppm/96hs, 8,1ppm/96hs, 1,3ppm/144hs e 5,9ppm/144hs respectivamente.

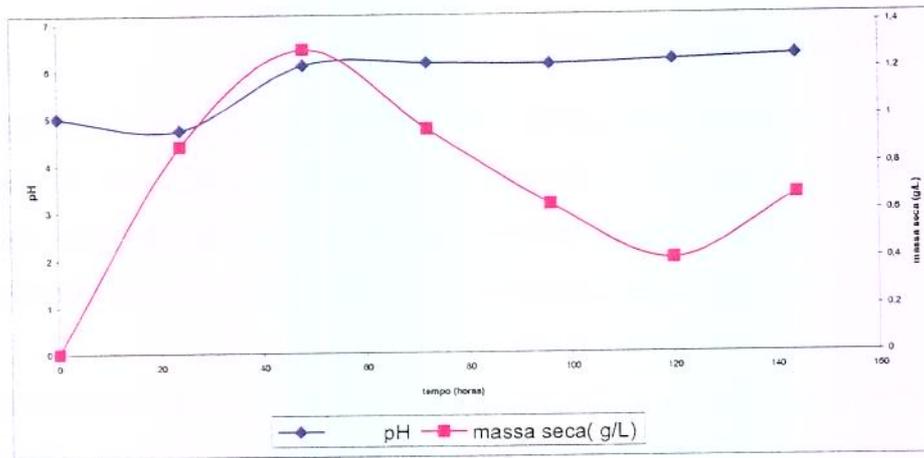


Figura 15-Curva de crescimento *Neurospora* sp.1 em meio Frutose/Extrato de Levedura

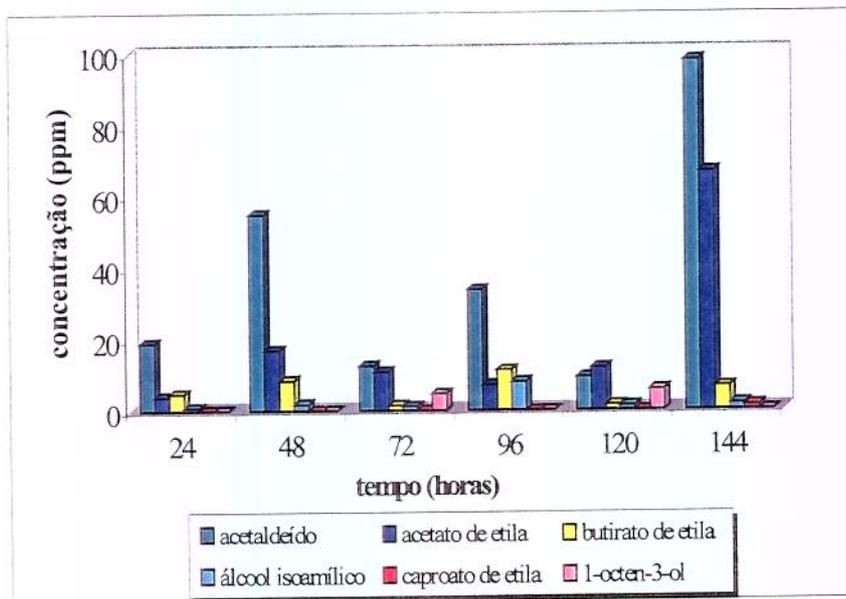


Figura 16 - Análise de compostos voláteis produzidos por *Neurospora* sp.1 em meio Frutose/Extrato de Levedura a 30 °C, suspensão de esporos 10⁵ /ml de meio.

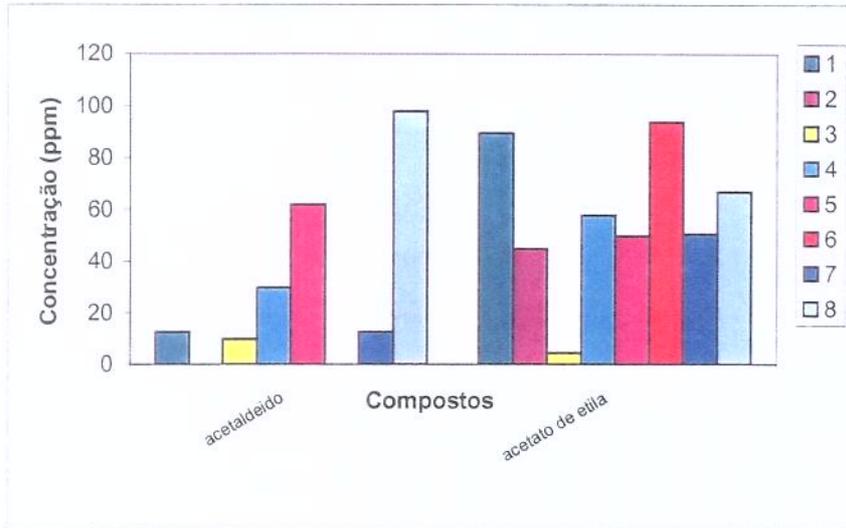


Figura 17a – Concentrações máximas dos compostos voláteis nos meios selecionados produzidos por *Neurospora* sp1

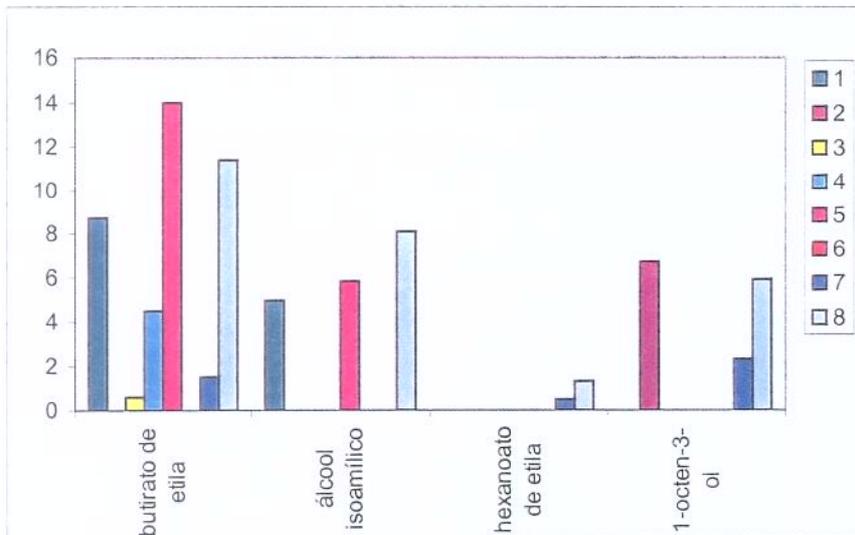


Figura 17b – Concentrações máximas dos compostos voláteis nos meios selecionados produzidos por *Neurospora* sp1

Legenda: 1- CEM 5%; 2- YMB; 3- CZ; 4- VS; 5- VM; 6- CS; 7- CSG; 8-F/EL

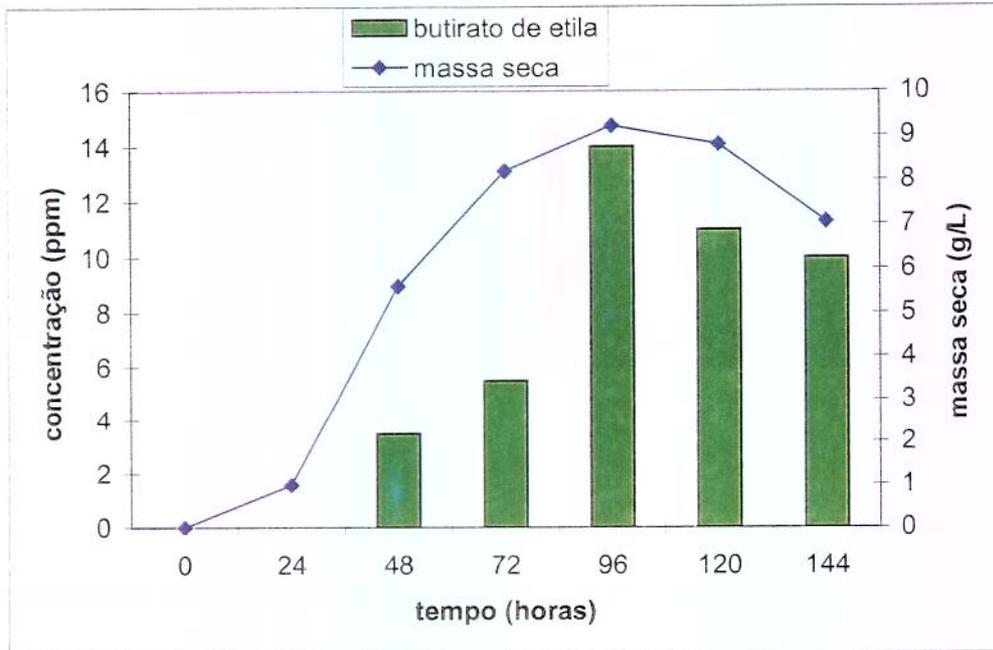


Figura 18 - Relação entre a produção de butirato de etila e a curva de crescimento da linhagem *Neurospora* sp1 em meio Vogel Maltose

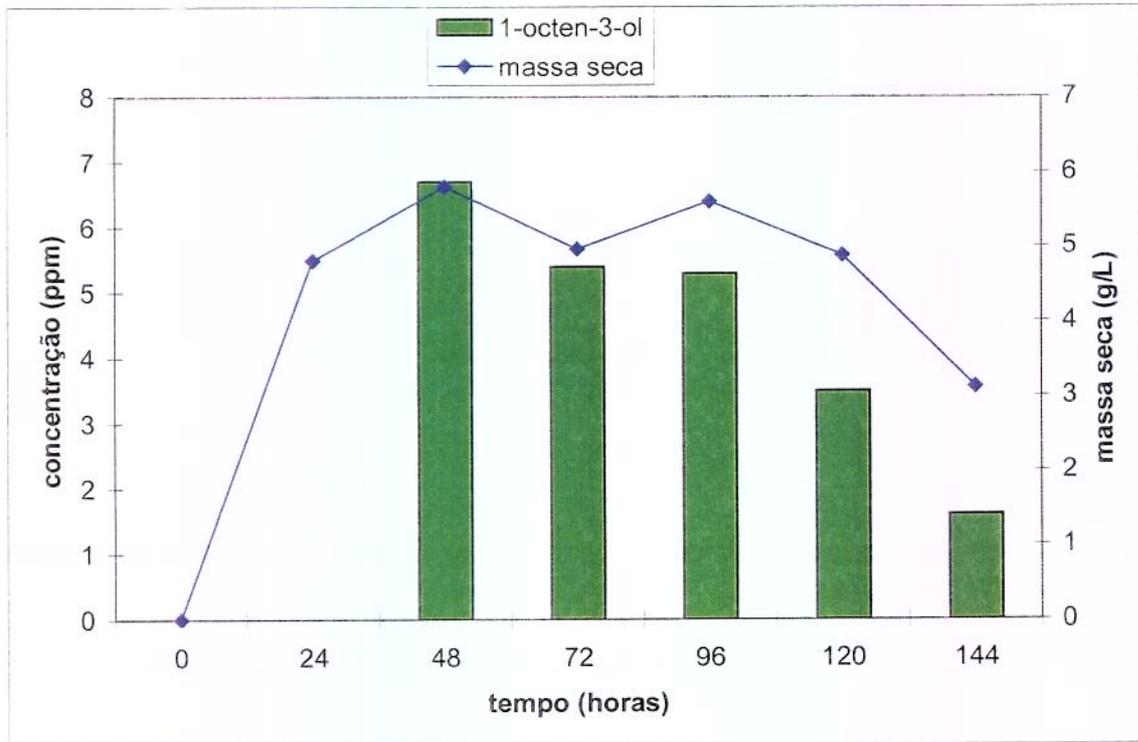


Figura 19- Relação entre a produção de 1-octen-3-ol e a curva de crescimento da linhagem *Neurospora* sp1 em meio Yeast Malt Broth

Tabela 5: Composição de compostos voláteis produzidos por *Neurospora* sp.1 em Caldo Extrato de Malte 5% a 30°C, suspensão de esporos 10⁵/ml de meio.

COMPOSTOS(ppm)	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
Acetaldeído	12,8	2,7	traços	9,2	6,8	traços
acetato de etila	10,7	89,5	76,3	33	24	traços
butirato de etila	7,9	8,7	1,8	3,5	1,2	traços
alcool isoamílico	2,6	4,9	3,3	4,2	3,8	traços
hexanoato de etila	traços	-	-	-	-	-
1 - octen - 3 - ol	traços	-	-	-	-	-

Tabela 6: Composição de compostos voláteis produzidos por *Neurospora* sp.1 em Yeast Malt Broth a 30°C, suspensão de esporos 10⁵/ml de meio.

COMPOSTOS(ppm)	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
Acetaldeído	traços	-	traços	-	Traços	traços
acetato de etila	26	45	23	-	-	traços
butirato de etila	traços	-	-	-	-	-
alcool isoamílico	-	-	-	-	-	-
Hexanoato de etila	-	-	-	-	-	-
1 - octen - 3 - ol	traços	6,7	5,4	5,3	3,5	1,6

Tabela 7: Composição de compostos voláteis produzidos por *Neurospora* sp.1 em Meio Czapeck modificado a 30°C, suspensão de esporos 10⁵/ml de meio.

COMPOSTOS(ppm)	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
Acetaldeído	traços	1,7	2,9	10	2,9	traços
acetato de etila	traços	2,0	2,2	4,6	4,3	2,5
butirato de etila	-	-	0,5	0,6	0,5	traços
alcool isoamílico	-	-	-	-	-	-
Hexanoato de etila	-	traços	traços	traços	traços	traços
1 - octen - 3 - ol	-	traços	traços	-	-	Traços

Tabela 8 : Composição de compostos voláteis produzidos por *Neurospora* sp.1 em Meio Vogel sacarose a 30°C, suspensão de esporos 10⁵/ml de meio.

COMPOSTOS(ppm)	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
Acetaldeído	5,0	30	18	6,0	3,0	2,5
acetato de etila	traços	15,5	53	58	35	43
butirato de etila	traços	4,5	1,0	1,5	0,9	traços
alcool isoamílico	-	-	-	-	Traços	-
Hexanoato de etila	-	traços	-	-	Traços	traços
1 - octen - 3 - ol	-	-	-	-	-	-

Tabela 9: Composição de compostos voláteis produzidos por *Neurospora* sp.1 em Meio Vogel maltose a 30°C, suspensão de esporos 10⁵/ml de meio.

COMPOSTOS(ppm)	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
Acetaldeído	traços	32,5	36,5	35	61	62
Acetato de etila	-	8,0	24,8	45	50	24
Butirato de etila	-	3,5	5,5	14	11	10
Alcool isoamílico	-	-	4,0	-	traços	5,8
Hexanoato de etila	-	traços	traços	-	traços	traços
1 - octen - 3 - ol	-	-	-	-	-	-

Tabela 10 - Composição de compostos voláteis produzidos por *Neurospora* sp1 em Meio Corn Steep Liquor sem glicose a 30°C, suspensão de esporos 10⁵/ml de meio :

COMPOSTOS(ppm)	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
Acetaldeído	-	-	-	-	-	-
acetato de etila	9,0	2,1	3,4	94	18	3,5
butirato de etila	-	-	-	-	-	-
alcool isoamílico	-	-	-	-	-	-
Hexanoato de etila	-	-	-	-	-	-
1 - octen - 3 - ol	-	-	-	-	-	-

Tabela 11: Composição de compostos voláteis produzidos por *Neurospora* sp1 em Meio CornSteep Liquor com glicose a 30°C, suspensão de esporos 10⁵/ml de meio.

COMPOSTOS(ppm)	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
Acetaldeído	12,8	-	-	-	-	-
acetato de etila	50,6	45	18,5	4,2	40	40
butirato de etila	1,5	-	-	-	-	-
alcool isoamílico	traços	-	-	-	-	-
Hexanoato de etila	0,5	-	-	-	-	-
1 - octen - 3 - ol	-	2,3	1,4	1,0	traços	traços

Tabela 12: Composição de compostos voláteis produzidos por *Neurospora* sp1 em Meio Frutose/Extrato de Levedura a 30°C, suspensão de esporos 10⁵/ml de meio :

COMPOSTOS(ppm)	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
Acetaldeído	19	55	12,7	34	9,4	98
acetato de etila	4,0	17	11	7,2	12	67
butirato de etila	4,8	8,4	1,5	11,4	1,53	6,6
alcool isoamílico	0,85	1,8	1,2	8,1	1,3	1,8
hexanoato de etila	-	Traços	-	-	-	1,3
1 - octen - 3 - ol	-	-	4,8	-	5,9	-

A análise dos resultados obtidos pela fermentação da linhagem *Neurospora* sp1 mostram que o meio Frutose/Extrato de Levedura foi o mais adequado para a produção de acetaldeído cuja maior concentração, 98 ppm, foi alcançada com 144 horas de fermentação. O meio Vogel Maltose produz a segunda maior concentração, 62 ppm. Nos meios Yeast malt Broth e Corn Steep Liquor não houve a produção de acetaldeído pela linhagem de *Neurospora* sp1 (figura 17 a).

O composto acetato de etila foi produzido em todos os meios estudados. O meio Corn Steep Liquor mostrou-se o mais adequado para a produção desse composto com 94 ppm após 96 horas de fermentação, seguido do meio Caldo Extrato de Malte, com 89,5 ppm após 48 horas. (figura 17 a).

A linhagem *Neurospora* sp1 produziu álcool isoamílico em apenas 3 dos 8 meios testados: Caldo Extrato de Malte 5%, Vogel Maltose e Frutose/EL. A maior concentração , 81 ppm foi obtida após 96 horas de fermentação em meio Frutose/Extrato de Levedura. Nos demais meios o composto foi detectado em traços (figura 17 b).

O composto butirato de etila foi produzido na maioria dos meios selecionados com exceção de os meios Yeast Malt Broth e Corn Steep Liquor, sendo que a maior concentração, 14 ppm, foi obtida em meio Vogel Maltose após 96 horas de fermentação. A figura 18 mostra que a máxima produção desse composto se dá durante a fase estacionária de crescimento.

Hexanoato de etila foi produzido em meio Corn Steep Glicose e Frutose/Extrato de Levedura. A maior concentração, 1,3 ppm se deu em F/EL após 144 horas de fermentação(figura 17 b).

Apenas os meios Yeast Malt Broth, CSG e Frutose/Extrato de Levedura produziram o composto 1-octen-3-ol quando fermentados pela linhagem *Neurospora* sp1. A maior concentração 67 ppm foi detectada após 48 horas de fermentação em meio Yeast Malt Broth(figura 17 b). A figura 19 mostra que a máxima produção desse composto se dá durante a fase estacionária de crescimento.

4.4 - Estudo da composição do meio de cultura para produção de compostos voláteis em relação ao tempo de fermentação pela linhagem *Neurospora sp2*

Na tabela abaixo encontram-se os dados referentes a avaliação sensorial realizada nos oito meios de cultura selecionados, com avaliação da nota e intensidade do aroma produzido pela linhagem *Neurospora sp2*.

A seguir os dados referentes a variação de pH do meio de cultura, da massa celular seca e a composição dos compostos voláteis produzidos em cada meio selecionado.

Tabela 13 – Avaliação sensorial da linhagem *Neurospora sp.2* nos meios de cultura selecionados.

	CEM 5%	YMB	CZA	VS	VM	CS	CSG	F/EL
24h	Doce +	Frutal +	Maçã+	Frutal +	Sem aroma	Desag.	Frutal ++	Frutal +
48h	Frutal ++	Cogumelo ++	Maçã +	Frutal +	Frutal <+	Desag.	Frutal +++	Frutal +
72h	Frutal ++	Cogumelo ++ Maçã ++	Maçã +	Frutal +	Frutal +	Desag.	Cogumelo +	Frutal ++
96h	Abacaxi++	Cogumelo ++	Maçã +	Frutal <+	Frutal ++	Desag.	Cogumelo +	Frutal +
120h	Abacaxi ++	Cogumelo / Desag. ++	Maçã +	Frutal <+	Frutal + +	Desag.	Cogumelo +	Frutal +
144h	Indefinido +	Cogumelo/ Desag. ++	Maçã +	Frutal <+	Frutal ++	Desag.	Cogumelo +	Frutal +

CEM - Caldo extrato de malte 5%

CZA - Czapeck

VM- Vogel maltose

CSG- Corn Steep Liquor com glicose

YMB- Yeast malt Broth

VS- Vogel sacarose

CS- Corn Steep Liquor sem glicose

F/EL- Frutose/ Extrato de Levedura

A linhagem *Neurospora sp2* produziu aroma agradável em todos os meios selecionados, com exceção do meio Corn Steep Liquor sem glicose, que produziu um aroma indefinido e desagradável.

De maneira geral o aroma desenvolvido nos meios estudados variou de frutal indefinido, abacaxi e maçã e de cogumelo.

Em meio Caldo extrato de Malte 5% o aroma encontrado foi o de maior intensidade, salientando-se o aroma frutal que prevaleceu até 72 horas e entre 96 e 120 horas caracterizou-se como de abacaxi na mesma intensidade.

Em meio Czapeck o aroma obtido foi puro e muito agradável de maçã.

O aroma de cogumelo foi detectado nos meios Yeast Malt Broth, Corn Steep Liquor com glicose, sendo que sua maior intensidade foi alcançada no meio Yeast Malt Broth entre 48 e 72 horas de fermentação.

4.4.1 Meio Caldo Extrato de Malte 5% (CEM5%)

A avaliação sensorial realizada por painel não treinado (Tabela 13) revelou que a linhagem *Neurospora* sp2 quando cultivada em CEM5% apresentou aroma de fruta , lembrando maçã e abacaxi maduro após 24horas de fermentação. Este aroma se intensificou a partir de 48 horas passando a moderado com 120 horas e chegando ao final de 144 horas com ligeiro aroma de cogumelo. A Figura 20 mostra as variações na biomassa e nos valores de pH na determinação da curva de crescimento da linhagem *Neurospora* sp2 em CEM5% onde observa-se rápido crescimento de massa celular em 24 horas (6,8g/L) e que atinge o máximo em 120horas (12g/L).

A análise por cromatografia gasosa (Tabela 14 e Figura 21) revelou a presença de hexanoato de etila e 1-octen-3-ol , em fases da fermentação , apenas em traços .

Os compostos acetaldeído, acetato de etila, butirato de etila, álcool isoamílico e 1-octen-3-ol tiveram suas maiores concentrações : 13,2ppm (48hs,) 64ppm (72hs), 9,5ppm (48hs), 10,4ppm (48hs), 2,0ppm (144hs) , respectivamente (Tabela 14 e Figura 21).

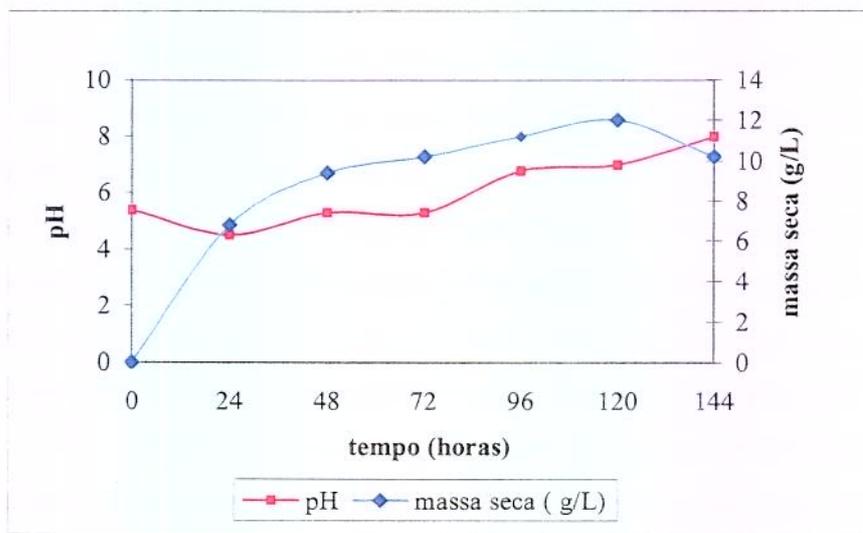


Figura 20 – Curva de Crescimento *Neurospora* sp.2 em meio Caldo Extrato de Malte 5%

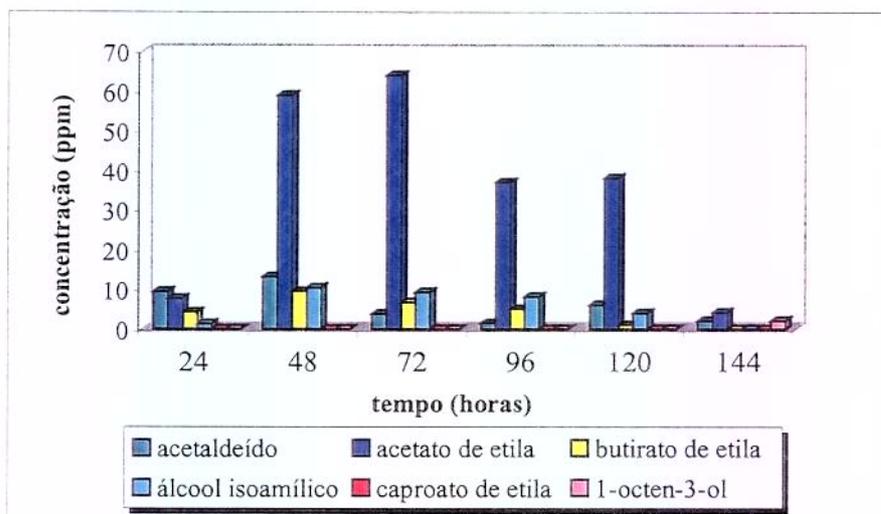


Figura 21 - Análise de compostos voláteis produzidos por *Neurospora* sp.2 em Caldo Extrato de Malte 5% a 30°C, suspensão de esporos 10^5 /ml de meio.

4.4.2 - Meio Yeast Malt Broth (YMB)

A avaliação sensorial realizada por painel não treinado (Tabela 13) mostrou que a linhagem *Neurospora* sp.2 quando fermentada em meio YMB apresentou aroma leve e agradável de frutas após 24 horas de fermentação. Após este período o aroma predominante foi moderado de cogumelo após 144 horas de fermentação .

A Figura 22 mostra as variações na biomassa e nos valores de pH na determinação da curva de crescimento da linhagem *Neurospora* sp2 em meio YMB, onde observa-se rápido aumento de massa celular com 24 horas (4,0g/L) e cujo valor máximo é atingido com 48 horas de fermentação (6,0g/L). A partir deste período o pH do meio de cultura passa a ser alcalino, saindo de pH 6,0 (24 hs) para 8,5 (48 hs)

A análise por cromatografia gasosa revelou (Tabela 15 e Figura 23) a presença de álcool isoamílico apenas em traços e a ausência de hexanoato de etila.

Os outros compostos voláteis encontrados, acetaldeído, acetato de etila, butirato de etila e 1-octen-3-ol tiveram suas maiores concentrações: 6,0ppm (24hs); 81ppm (24hs); 3,0ppm (24hs) e 4,7ppm (144hs), respectivamente (Tabela 15 e Figura 23), sendo que dentre eles o melhor foi o acetato de etila com 24 horas de fermentação.

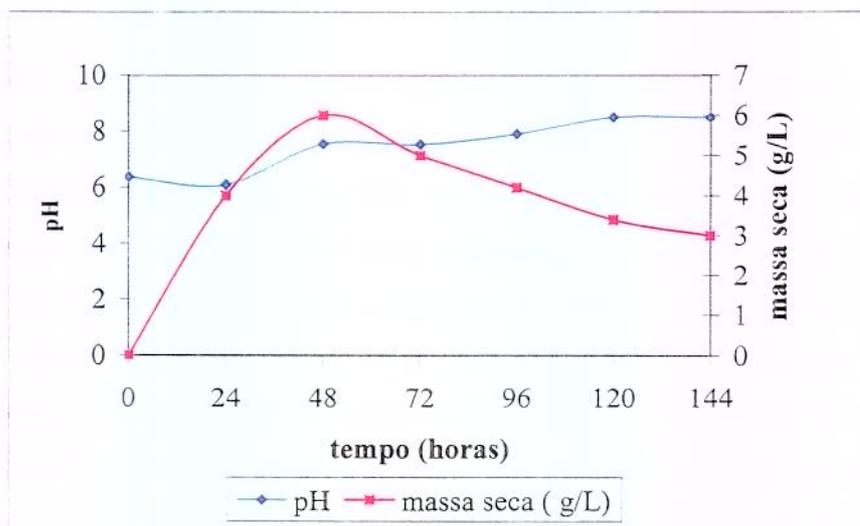


Figura 22 – Curva de Crescimento *Neurospora* sp.2 em meio Yeast Malt Broth

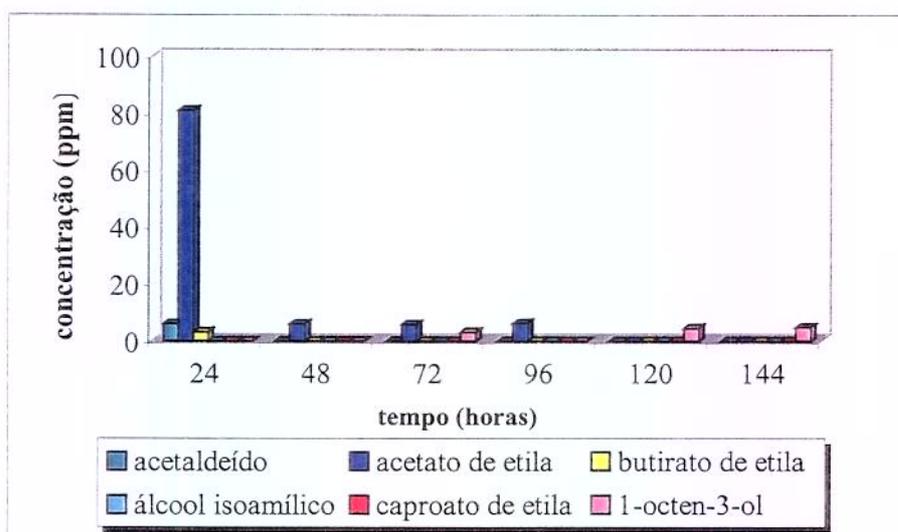


Figura 23 Análise de compostos voláteis produzidos por *Neurospora* sp.2 em Yeast Malt a 30°C, suspensão de esporos 10^5 /ml de meio.

4.4.3 – Meio Czapeck Dox modificado (Cz.mod.)

A avaliação sensorial realizada por painel não treinado (Tabela 13) mostrou que a linhagem *Neurospora* sp.2 em meio Czapeck modificado apresentou aroma muito agradável e puro de maçã fresca nas 144hs de fermentação.

A Figura 24 mostra as variações na biomassa e nos valores de pH na determinação da curva de crescimento da linhagem *Neurospora* sp. 2 em meio Cz. mod. Com 24 horas de fermentação o aumento da massa celular é muito pequeno (0,3g/L) alcançando seu máximo em 48 hs (2,62g/L). Em relação ao pH verificamos que há uma acidificação do meio com pH variando de 6,0 para 3,0 .

A análise dos compostos voláteis por cromatografia gasosa (Tabela 16 e Figura 25) revela a presença de butirato de etila, álcool isoamílico e hexanoato de etila apenas em traços e a ausência de 1-octen-3-ol.

Os outros voláteis encontrados, acetaldeído e acetato de etila tiveram suas maiores concentrações: 7,2 ppm (144hs) e 60ppm (72hs), respectivamente gasosa (Tabela 16 e Figura 25).

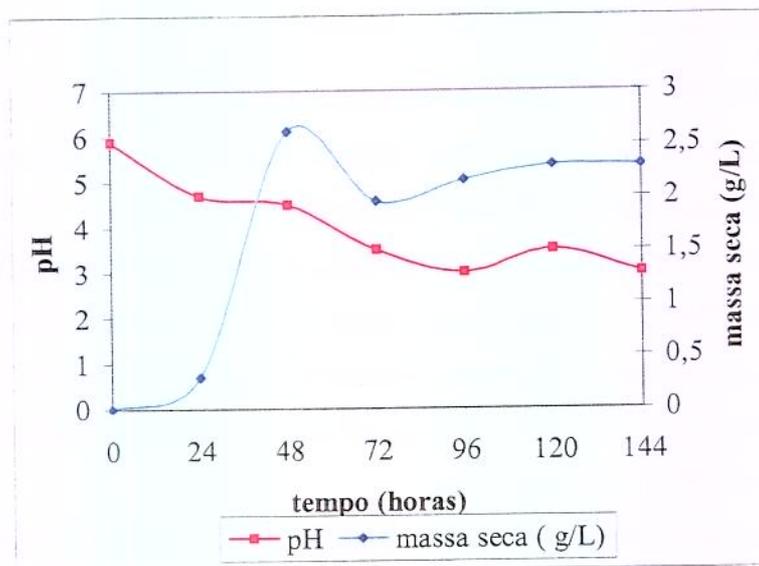


Figura 24 – Curva de Crescimento *Neurospora* sp. 2 em meio Czapeck

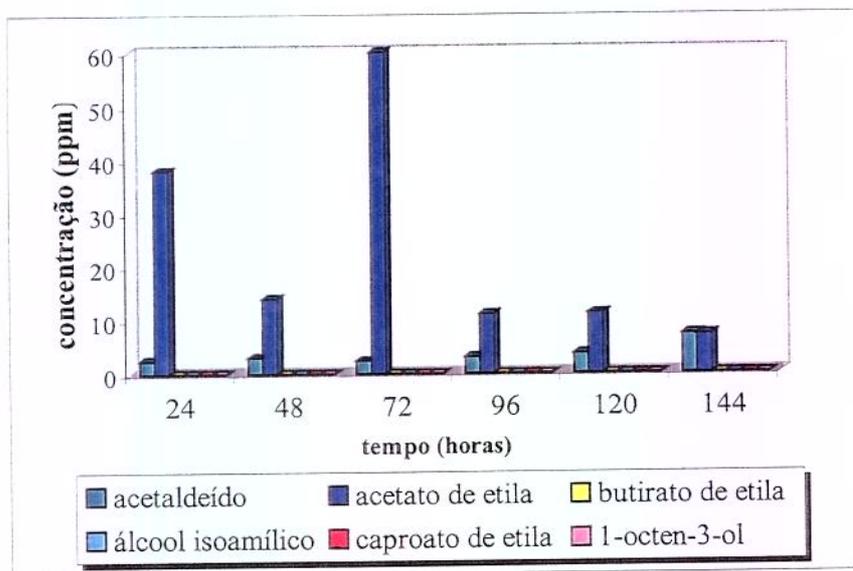


Figura 25 - Análise de compostos voláteis produzidos por *Neurospora* sp.2 em Czapeck a 30°C, suspensão de esporos 10^5 /ml de meio.

4.4.4 - Meio Vogel mínimo sacarose

A avaliação sensorial realizada por painel não treinado (Tabela 13) mostrou que a linhagem *Neurospora* sp.2 quando fermentada em meio Vogel mínimo sacarose apresentou aroma frutal indefinido, agradável porém muito leve ao longo do tempo de fermentação.

A Figura 26 mostra as variações na biomassa e nos valores de pH na determinação da curva de crescimento da linhagem *Neurospora* sp2 em meio Vogel sacarose, onde podemos observar o rápido crescimento da massa celular em 24 horas de crescimento, que coincide com o máximo (7g/L) .Note-se que o pH nas 144 horas de fermentação permanece sempre na faixa ácida.

A análise dos compostos voláteis por cromatografia gasosa (Tabela 17 e Figura 27) revelou a presença de álcool isoamílico apenas em traços e a ausência de hexanoato de etila.

Os outros compostos presentes na amostra, acetaldeído, acetato de etila e butirato de etila tiveram suas maiores concentrações : 28ppm (48hs); 165ppm (48hs) e 3,4ppm (48hs), respectivamente (Tabela 17 e Figura 27). O 1-octen-3-ol se mostrou ausente em quase todo o tempo de fermentação, só se observando a sua presença com 144 hs de fermentação na concentração de 0,94 ppm.

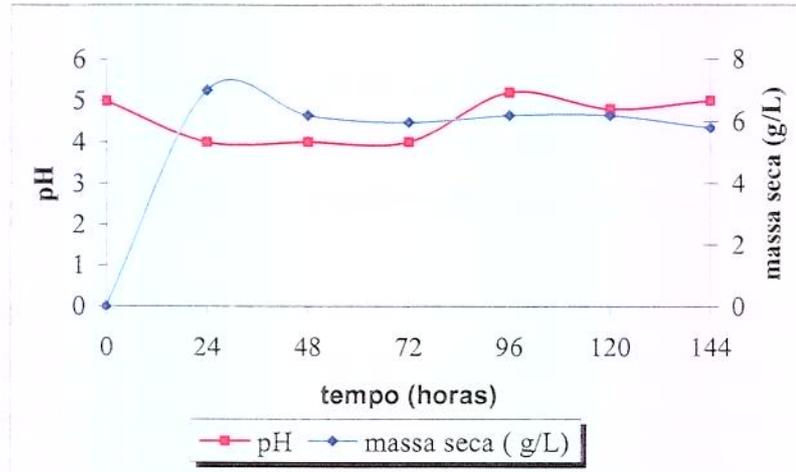


Figura 26 – Curva de Crescimento de *Neurospora* sp.2 em meio Vogel sacarose

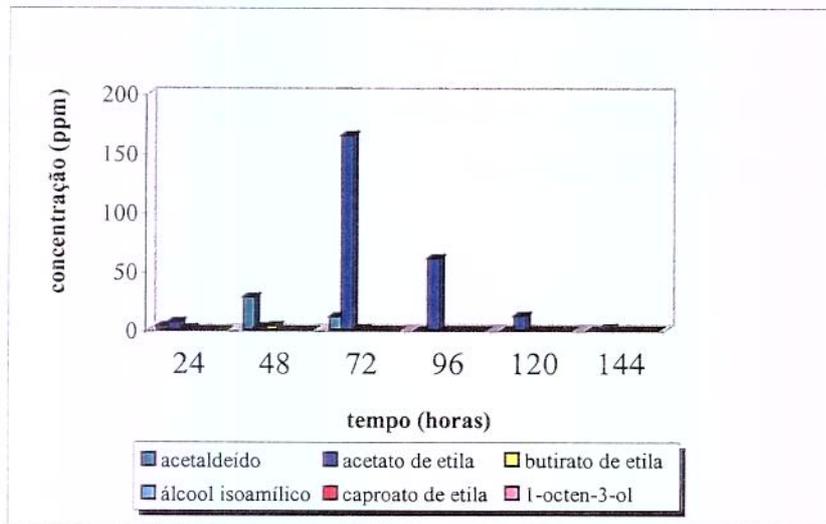


Figura 27- Análise de compostos voláteis produzidos por *Neurospora* sp.2 em meio Vogel sacarose a 30 °C, suspensão de esporos 10^5 /ml de meio.

4.4.5 - Meio Vogel mínimo maltose

A avaliação sensorial realizada por painel não treinado (Tabela 13) mostrou que a linhagem *Neurospora* sp2 quando cultivada em meio Vogel mínimo maltose, nas primeiras 24 horas de fermentação não apresentou aroma, mas partir de 48 horas há o aparecimento de aroma frutal de leve a moderado, persistindo até 144 horas.

A Figura 28 mostra as variações da biomassa e dos valores de pH na determinação da curva de crescimento da linhagem *Neurospora* sp2 onde o valor máximo de massa celular foi alcançado com 72 horas de fermentação (14,8g/L), coincidindo com o menor valor de pH(4,0).

A análise por cromatografia gasosa (Tabela 18 e Figura 29) revelou a presença de álcool isoamilico em traços e a ausência de hexanoato de etila e 1-octen-3-ol.

Os outros compostos, acetaldeido, acetato de etila e butirato de etila apresentaram maiores concentrações: 45ppm (72hs); 99ppm (120hs) e 6,7ppm (120hs), respectivamente (Tabela 18 e Figura 29).

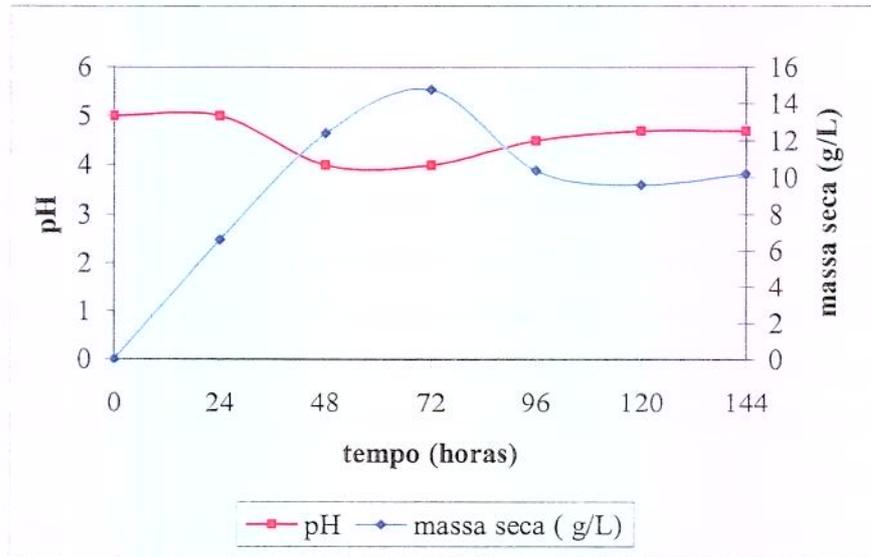


Figura 28 – Curva de Crescimento de *Neurospora* sp.2 em meio Vogel maltose

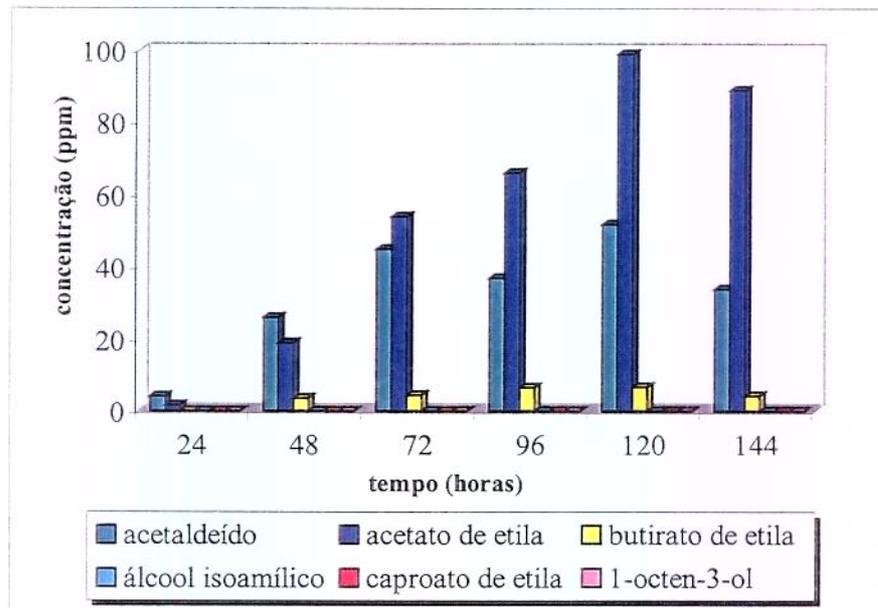


Figura 29 - Análise de compostos voláteis produzidos por *Neurospora* sp.2 em meio Vogel maltose a 30°C, suspensão de esporos 10^5 /ml de meio.

4.4.6 - Meio Corn Steep Liquor sem glicose (CSL)

A avaliação sensorial realizada por painel não treinado (Tabela 13) mostrou que a linhagem *Neurospora* sp2 quando cultivada em CSL, apresentou aroma extremamente desagradável durante as 144 hs de fermentação .

Pela Figura 30 observamos que o pico máximo de biomassa é atingido com 48 horas de fermentação (1,4g/L). O valor de pH passa de ácido (5,0) no início da fermentação para alcalino (8,0) em 72 hs, continuando nesse mesmo patamar até o término da fermentação com 144 hs (Figura 30).

A análise por cromatografia gasosa não revelou a presença de nenhum dos compostos voláteis analisados em nenhum dos tempos de fermentação.

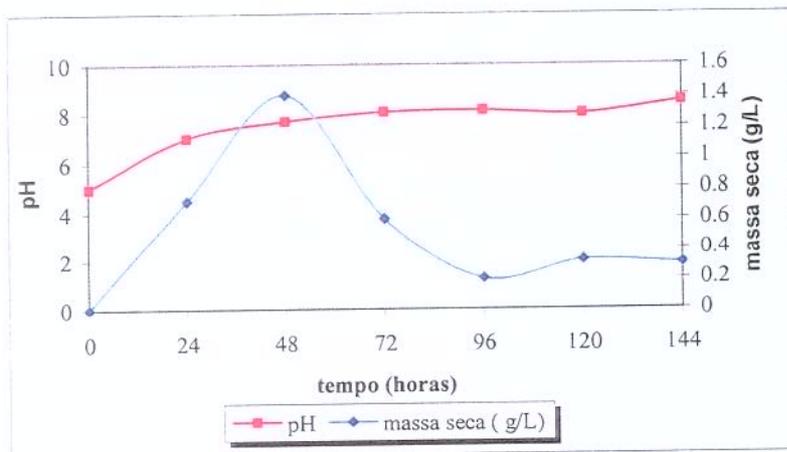


Figura 30 – Curva de Crescimento de *Neurospora* sp.2 em meio Corn steep liquor sem glicose

4.4.7 - Meio Corn Steep Liquor Glicose (CSG)

A avaliação sensorial realizada por painel não treinado (Tabela 13) mostrou que a linhagem *Neurospora* sp.2 quando cultivada em meio CSG apresentou nas primeiras 48 horas de fermentação, aroma agradável de fruta, de leve a moderada intensidade (24 e 48hs), sendo que após este período o aroma adquire uma nota leve de cogumelo (72 a 144 hs).

A Figura 31 mostra as variações da biomassa e dos valores de pH na determinação da curva de crescimento da linhagem *Neurospora* sp2, onde o valor máximo de massa celular é alcançado com 48 horas de fermentação (4,8g/L). O valor de pH de ácido (5,0) do início da fermentação passa para alcalino (8,0) em 48hs.

A análise por cromatografia gasosa (Tabela 19 e Figura 32) revelou a presença de hexanoato de etila em traços apenas em 24 hs de fermentação, e o álcool isoamílico não foi encontrado.

Os outros compostos voláteis, acetaldeído, acetato de etila, butirato de etila e 1-octen-3-ol tiveram suas maiores concentrações : 21ppm (24hs); 32ppm (48hs); 1,4ppm (24hs) e 1,3ppm (72hs) respectivamente (Tabela 19 e Figura 32).

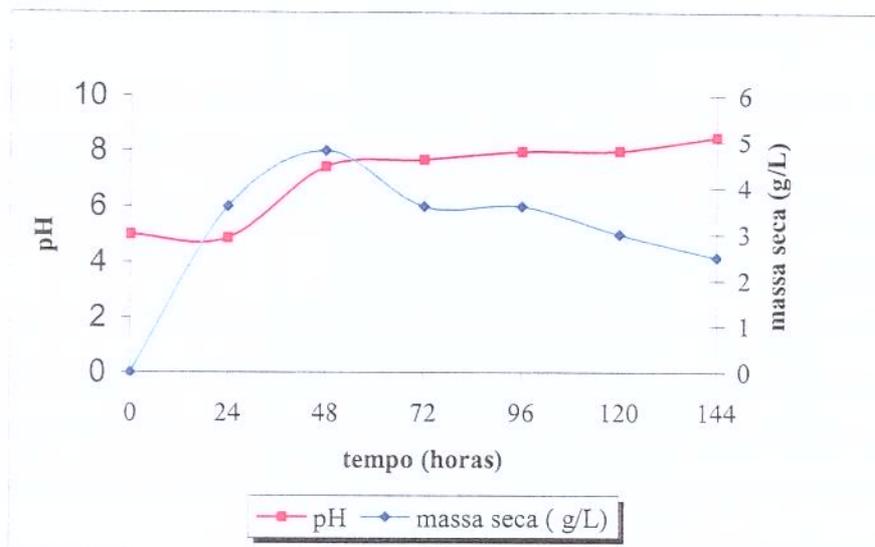


Figura 31 – Curva de Crescimento de *Neurospora* sp.2 em meio Corn steep com glicose

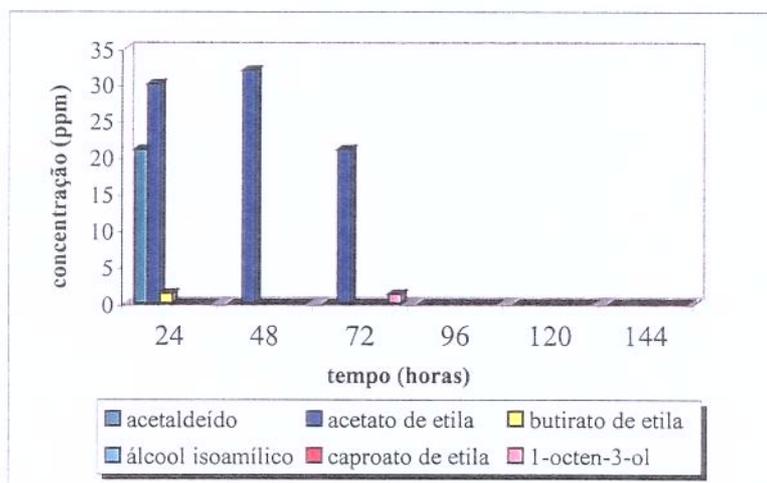


Figura 32 - Análise de compostos voláteis produzidos por *Neurospora* sp.2 em meio corn steep liquor glicose a 30°C, suspensão de esporos 10^5 /ml de meio.

4.4.8 - Meio Frutose/Extrato de Levedura

A avaliação sensorial realizada por painel não treinado (Tabela 13) mostrou que a linhagem *Neurospora* sp.2 quando cultivada em meio Frutose/Extrato de Levedura apresentou aroma frutal de leve intensidade porém bastante agradável, nas 144 horas de fermentação.

A Figura 33 mostra as variações na biomassa e nos valores de pH na determinação da curva de crescimento da linhagem *Neurospora* sp2 em meio Frutose/Extrato de Levedura onde se observa que o pico máximo na produção de massa celular ocorre após 48 horas de fermentação. Os valores de pH durante o tempo de fermentação, a partir de 48 horas, encontram-se próximo da neutralidade.

A análise por cromatografia gasosa (Tabela 20 e Figura 34) revelou a presença dos seguintes compostos : acetaldeído, acetato de etila, butirato de etila, álcool isoamílico e hexanoato de etila cujas concentrações máximas foram: 71ppm/120hs; 30ppm/120hs; 17,9ppm/72hs; 4,4ppm/120hs e 1,2ppm/96hs respectivamente.

Esta linhagem *Neurospora* sp2 cultivada neste meio , não produziu o composto 1-octen-3-ol.

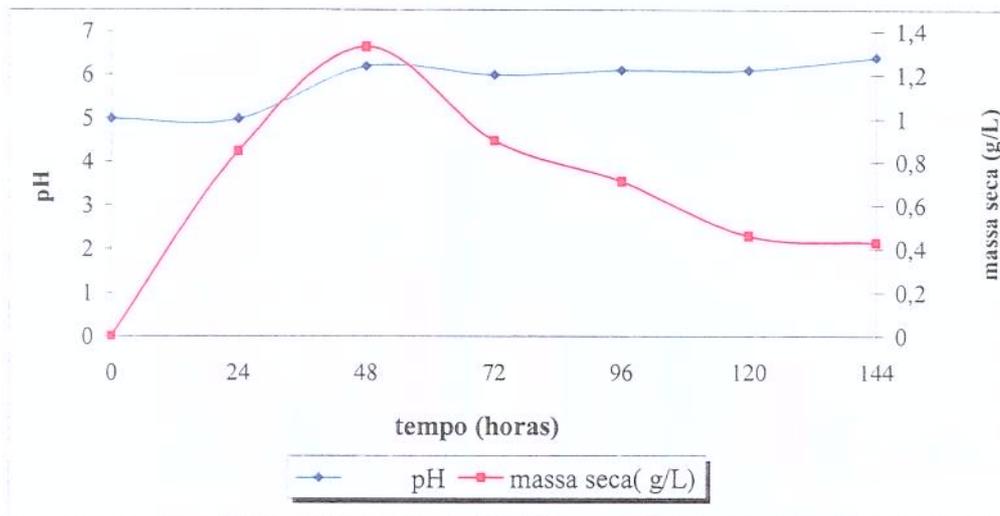


Figura 33 – Curva de Crescimento de *Neurospora* sp.2 em meio Frutose/Extrato de Levedura

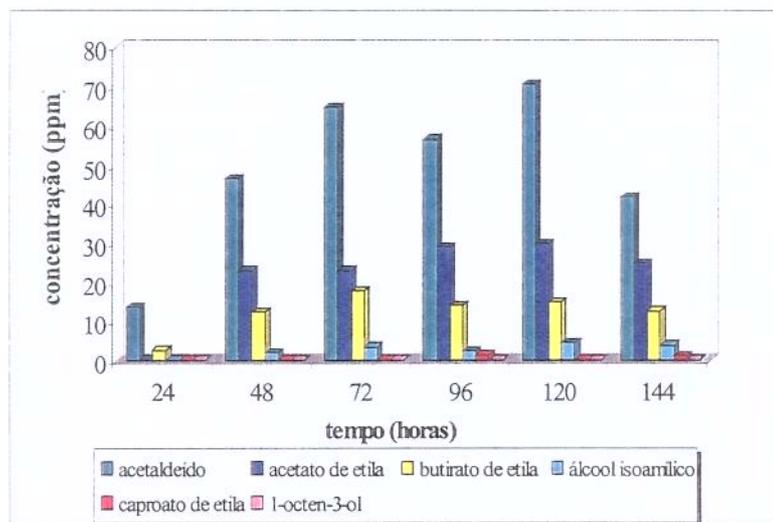


Figura 34 - Análise de compostos voláteis produzidos por *Neurospora* sp.2 em meio Frutose/Extrato de Levedura a 30 °C, suspensão de esporos 10^5 /ml de meio.

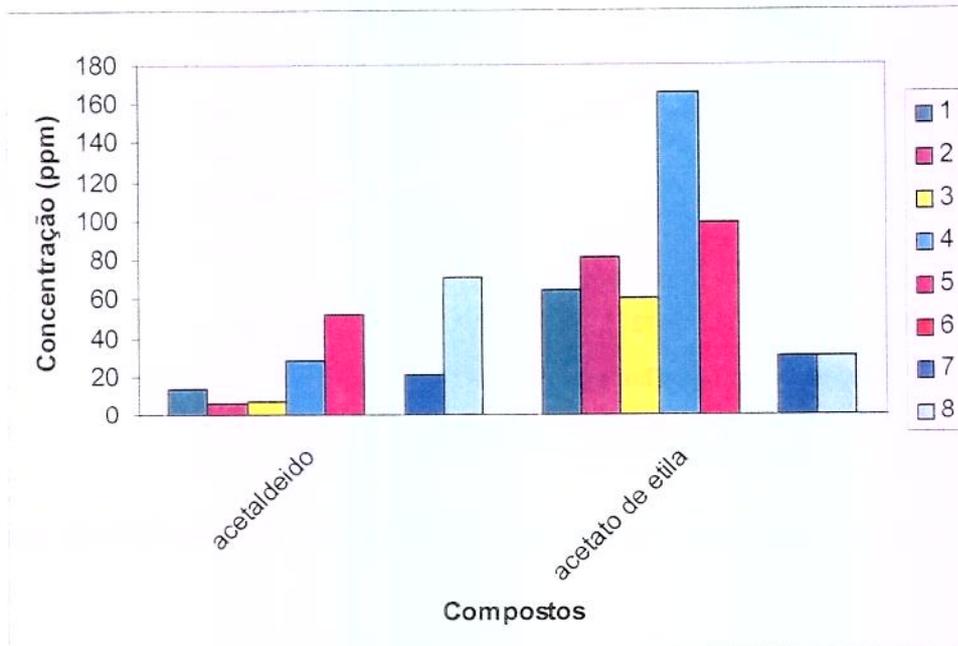


Figura 35 a– Concentrações máximas dos compostos voláteis nos meios selecionados produzidos por *Neurospora* sp2

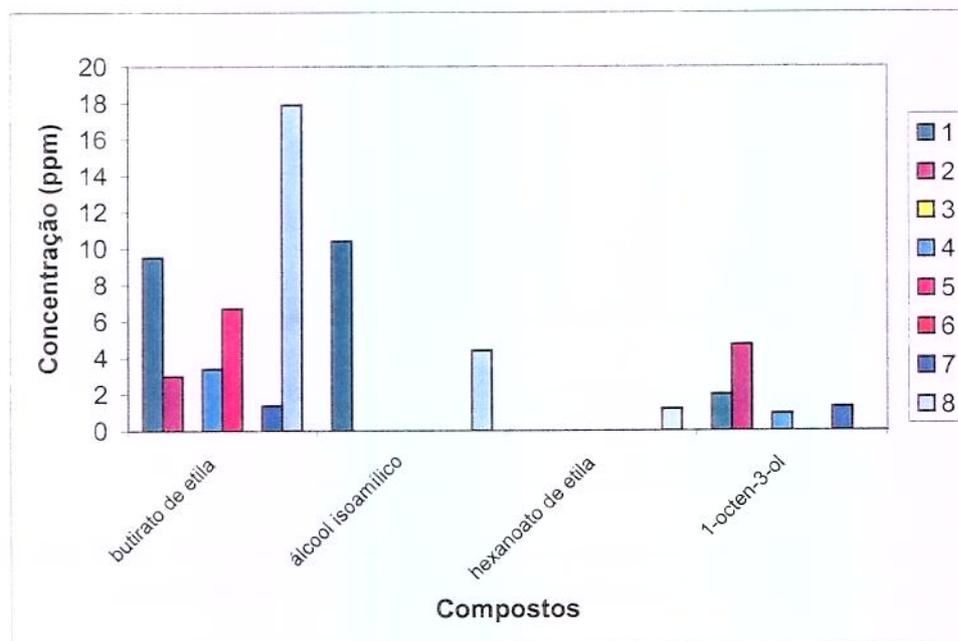


Figura 35 b – Concentrações máximas dos compostos voláteis nos meios selecionados produzidos por *Neurospora* sp2

Legenda: 1- CEM 5%; 2- YMB; 3- CZ; 4- VS; 5- VM; 6- CS; 7- CSG; 8-F/EL

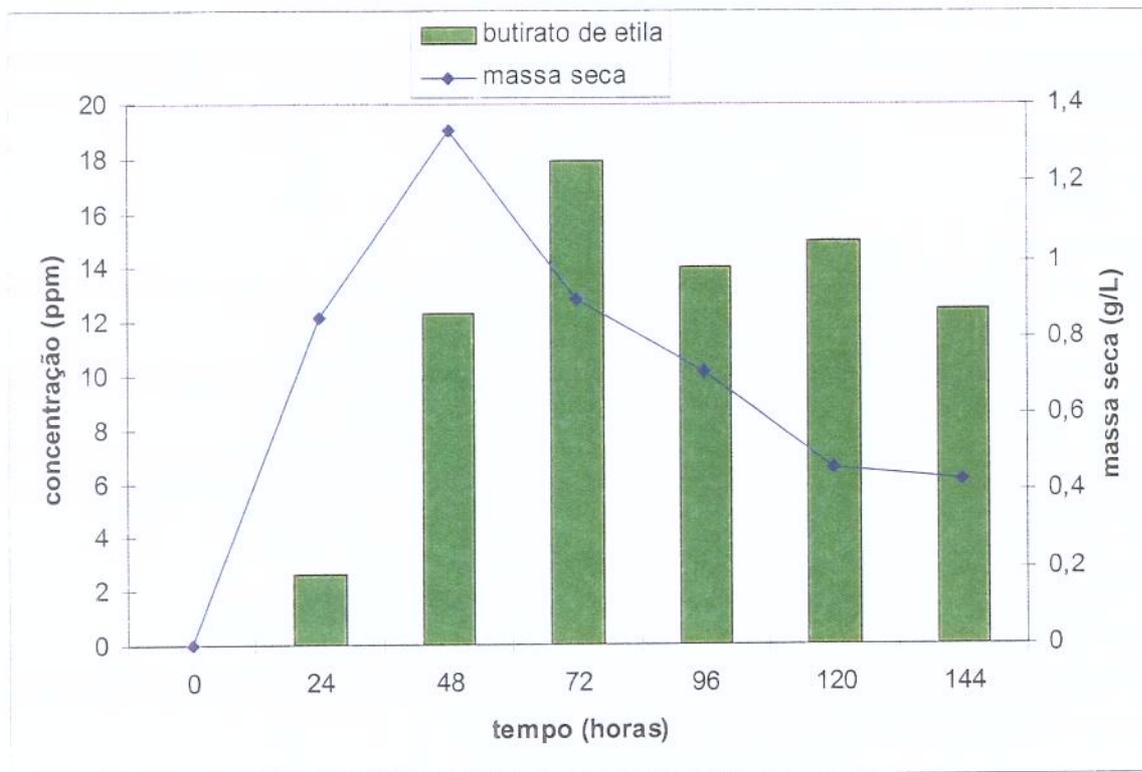


Figura 36 – Relação entre a produção de butirato de etila e a curva de crescimento da linhagem *Neurospora sp2* em meio Frutose/Extrato de Levedura

Tabela 14: Composição de compostos voláteis produzidos por *Neurospora* sp2 em Caldo Extrato de Malte 5% a 30°C, suspensão de esporos 10⁵/ml de meio.

COMPOSTOS(ppm)	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
Acetaldeído	9,4	13,2	3,8	1,5	6,0	2,1
acetato de etila	7,7	59	64	37	38	4,1
butirato de etila	4,2	9,5	6,7	5,0	1,0	-
alcool isoamílico	1,21	10,4	9,2	8,12	4,0	traços
hexanoato de etila	traços	traços	-	-	-	-
1 - octen - 3 - ol	-	-	traços	-	traços	2,0

Tabela 15 : Composição de compostos voláteis produzidos por *Neurospora* sp.2 em Yeast Malt Broth a 30°C, suspensão de esporos 10⁵/ml de meio.

COMPOSTOS(ppm)	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
acetaldeído	6,0	-	traços	traços	traços	-
acetato de etila	81	6,0	5,8	6,2	traços	traços
butirato de etila	3,0	-	-	-	-	-
alcool isoamílico	traços	traços	traços	traços	-	-
hexanoato de etila	-	-	-	-	-	-
1 - octen - 3 - ol	-	-	3	-	4,4	4,7

Tabela 16: Composição de compostos voláteis produzidos por *Neurospora* sp.2 em Meio Czapeck modificado a 30°C, suspensão de esporos 10⁵/ml de meio.

COMPOSTOS(ppm)	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
acetaldeído	2,5	3,0	2,4	3,1	3,7	7,2
acetato de etila	38	14	60	11	11	7,1
butirato de etila	-	traços	traços	traços	traços	traços
alcool isoamílico	-	traços	traços	-	-	-
hexanoato de etila	-	-	traços	traços	traços	-
1 - octen - 3 - ol	-	-	-	-	-	-

Tabela 17: Composição de compostos voláteis produzidos por *Neurospora* sp2 em Meio Vogel sacarose a 30°C, suspensão de esporos 10⁵/ml de meio.

COMPOSTOS(ppm)	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
acetaldeído	3,1	28	11,2	-	traços	-
acetato de etila	6,6	26	165	61	12	1,74
butirato de etila	1,2	3,4	1,0	-	-	-
alcool isoamílico	traços	traços	traços	-	-	-
hexanoato de etila	-	-	-	-	-	-
1 - octen - 3 - ol	-	-	-	-	-	0,94

Tabela 18: Composição de compostos voláteis produzidos por *Neurospora* sp.2 em Meio Vogel maltose a 30°C, suspensão de esporos 10⁵/ml de meio.

COMPOSTOS(ppm)	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
acetaldeido	4,0	26	45	37	52	34
acetato de etila	1,5	19	54	66	99	89
butirato de etila	traços	3,5	4,3	6,5	6,7	4,1
alcool isoamílico	-	traços	traços	traços	traços	traços
hexanoato de etila	-	-	-	-	-	-
1 - octen - 3 - ol	-	-	-	-	-	-

Tabela 19: Composição de compostos voláteis produzidos por *Neurospora* sp.2 em Meio Corn Steep Liquor glicose a 30°C, suspensão de esporos 10⁵/ml de meio.

COMPOSTOS(ppm)	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
acetaldeido	21	traços	-	-	traços	traços
acetato de etila	30	32	21	traços	traços	-
butirato de etila	1,4	traços	-	-	-	-
alcool isoamílico	-	-	-	-	-	-
hexanoato de etila	traços	-	-	-	-	-
1 - octen - 3 - ol	-	-	1,3	traços	traços	-

Tabela 20- Composição de compostos voláteis produzidos por *Neurospora* sp.2 em Meio Frutose/ Extrato de Levedura a 30°C, suspensão de esporos 10⁵/ml de meio :

COMPOSTOS(ppm)	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
acetaldeido	13,7	47	65	57	71	42
acetato de etila	traços	23	23	29	30	25
butirato de etila	2,6	12,3	17,9	14	15	12,5
alcool isoamílico	traços	2,0	3,4	2,2	4,4	3,7
hexanoato de etila	-	traços	traços	1,2	traços	1,1
1 - octen - 3 - ol	-	-	-	-	-	-

A linhagem de *Neurospora* sp2 mostrou-se capaz de produzir o composto acetaldeído em todos os meios selecionados com exceção de Corn Steep Liquor, sendo que o meio onde foi obtida a maior concentração , 71 ppm após 120 horas de fermentação, foi Frutose/Extrato de Levedura(figura 35 -a)

O composto acetato de etila, tal como o acetaldeído, foi produzido em todos os meios de cultura selecionados, com exceção de Corn Steep Liquor, porém no caso do acetato de etila, o meio Vogel Sacarose foi o que produziu a maior concentração, 165 ppm após 72 horas de fermentação(figura 35-a).

O composto butirato de etila foi produzido na maioria dos meios testados com exceção Czapeck e Corn Steep Liquor , sendo que a maior concentração , 17,9 ppm foi obtida em meio Frutose/Extrato de Levedura após 72 horas de fermentação(figura 35- b). A figura 36 mostra que a máxima produção desse composto se dá durante a fase estacionária de crescimento.

O composto álcool isoamílico foi produzido pela linhagem *Neurospora* sp2 em apenas dois meios testados, Caldo Extrato de Malte 5% e Frutose/Extrato de Levedura, sendo que a maior concentração, 10,4 ppm, foi alcançada em meio Caldo Extrato de Malte 5% após 48 horas de fermentação(figura 35-b).

A produção de hexanoato de etila foi obtida apenas em meio Frutose/Extrato de Levedura após 144 horas de fermentação na concentração de 1,1 ppm(figura 35-b).

O álcool 1-octen-3-ol foi produzido na maioria dos meios de cultura selecionados, com exceção dos meios Czapeck, Vogel Malose e Corn Steep Liquor. A maior concentração foi alcançada após 120 horas de fermentação em meio Yeast Malt Broth(figura 35-b).

4.5 - Estudo da composição do meio de cultura para produção de compostos voláteis em relação ao tempo de fermentação pela linhagem *Neurospora sp5*

Na tabela abaixo encontram-se os dados referentes a avaliação sensorial realizada nos oito meios de cultura selecionados, com avaliação da nota e intensidade do aroma produzido pela linhagem *Neurospora sp5*.

A seguir os dados referentes a variação de pH do meio de cultura, da massa celular seca e a composição dos compostos voláteis produzidos em cada meio selecionado.

Tabela 21 – Avaliação sensorial da linhagem *Neurospora sp.5* nos meios de cultura selecionados.

	CEM 5%	YMB	CZA	VS	VM	CS	CSG	F/EL
24h	Frutal ++	Frutal +	Maçã +	Frutal +	Frutal +	Desag.	Frutal +	Frutal / Desag. +
48h	Maçã ++	Cogumelo +	Maçã + Cogumelo +	Frutal ++	Frutal ++	Desag.	Frutal ++	Frutal / Desag. ++
72h	Maçã +++	Cogumelo ++	Maçã <+	Frutal + Cogumelo <+	Frutal ++	Desag.	Frutal ++	Frutal / Desag. ++
96h	Maçã +++ Cogumelo +	Desag.	Maçã <+	Frutal + Cogumelo <+	Frutal ++	Desag.	Frutal ++	Frutal / Desag. ++
120h	Maçã ++ Cogumelo +	Desag.	Maçã <+	Frutal <+ Cogumelo <+	Frutal ++	Desag.	Frutal ++	Frutal / Desag. ++
144h	Maçã + Cogumelo +	Desag.	Indefinido <+	Frutal <+	Frutal +	Desag.	Frutal +	-----

CEM - Caldo extrato de malte 5%

CZA- Czapeck

VM- Vogel maltose

CSG- Corn Steep Liquor com glicose

YMB- Yeast malt Broth

VS- Vogel sacarose

CS- Corn Steep Liquor sem glicose

F/EL- Frutose/ Extrato de Levedura

A linhagem *Neurospora sp 5* produziu aroma agradável em todos os meios selecionados, com exceção do meio Corn Steep Liquor sem glicose, que produziu um aroma indefinido e desagradável.

O aroma obtido variou de frutal indefinido, maçã pura e cogumelo.

O aroma frutal foi encontrado com intensidade moderada na maioria dos meios estudados. O aroma de maçã aparece puro em Caldo extrato de Malte 5% entre 48 e 72 horas sendo mais intenso no último período.

O aroma de cogumelo foi encontrado nos meios Caldo Extrato de Malte 5%, Yeast Malt Broth e Vogel sacarose com fraca intensidade.

4.5.1- Meio Caldo Extrato de Malte 5% (CEM5%)

A avaliação sensorial realizada por painel não treinado (Tabela 21) mostrou que a linhagem *Neurospora* sp.5 quando cultivada em meio CEM5% apresentou aroma bastante agradável de fruta madura cuja intensidade máxima foi percebida entre 72 e 96 horas de fermentação. Entre 96 e 144 horas além do aroma frutal, desenvolveu-se aroma leve de cogumelo.

A Figura 37 mostra as variações na biomassa e nos valores de pH na determinação da curva de crescimento da linhagem *Neurospora* sp5 em meio CEM5%, apresenta uma biomassa com 48 hs de fermentação de 9 g/L e alcançando 13 g/L com 120 hs de fermentação. Os valores de pH durante os 6 dias de fermentação permanecem na faixa ácida mas próximo da neutralidade.

A análise por cromatografia gasosa (Tabela 22 e Figura 38) revelou a presença de acetaldeído, acetato de etila, butirato de etila, álcool isoamílico, hexanoato de etila e 1-octen-3-ol cujos valores máximos de concentração foram: 6,1ppm (72hs); 8,2ppm (96hs); 11,8ppm (48hs); 137ppm (72hs); 1,65ppm (120hs) e 1,78ppm (120hs). Destes compostos observamos que durante todo o processo de fermentação o álcool isoamílico apresenta concentrações elevadas quando comparadas com os demais compostos, sendo o seu pico máximo entre 48 e 72 hs (134 ppm e 137 ppm). Já o hexanoato de etila e o 1-octen-3-ol, apresentam concentrações traços ou estão ausentes quase que durante todo o tempo de fermentação. Sendo apenas em 120 hs que encontra-se 1,65 ppm e 1,78 ppm de hexanoato de etila e 1-octen-3-ol, respectivamente.

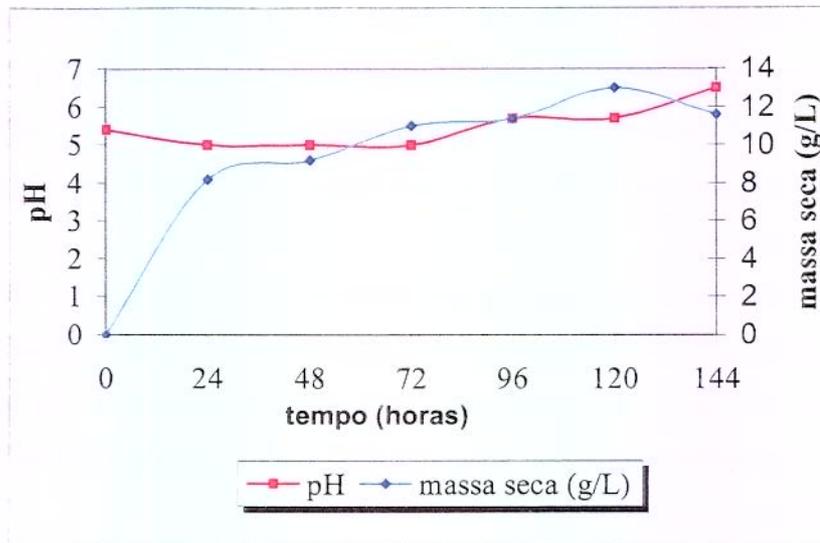


Figura 37–Curva de Crescimento de *Neurospora* sp.5 em meio Caldo extrato de malte 5%

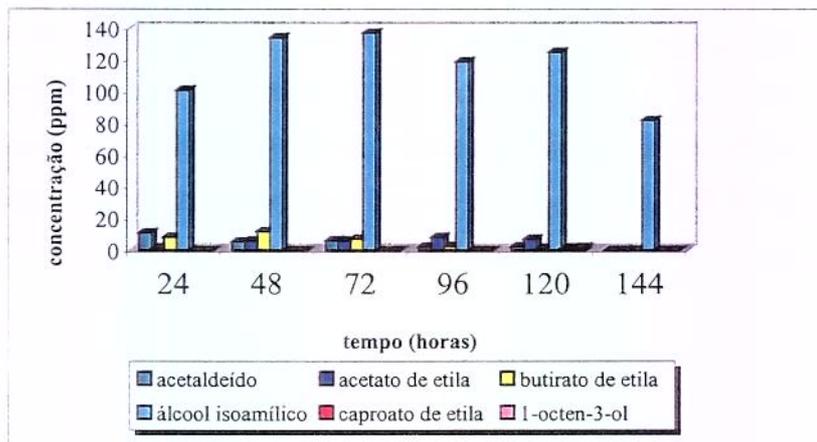


Figura 38 - Análise de compostos voláteis produzidos por *Neurospora* sp.5 em caldo extrato de malte 5% a 30°C, suspensão de esporos 10^5 /ml de meio.

4.5.2 - Meio YEAST MALT BROTH (YMB)

A avaliação sensorial realizada por painel não treinado (Tabela 22) mostrou que a linhagem *Neurospora* sp5 quando cultivada em YMB apresentou após 24 horas de fermentação aroma frutal de intensidade moderada, porém após este período a nota do aroma muda para cogumelo com moderada intensidade (48hs e 72 hs). Com 120 e 144 horas, além do aroma de cogumelo o painel notou um fundo desagradável.

A Figura 39 mostra as variações na biomassa e nos valores de pH na determinação da curva de crescimento da linhagem *Neurospora* sp.5 em meio YMB onde o máximo de biomassa (5,8g/L) é alcançado com 48 horas de fermentação. O pH após atingir seu menor valor (5,7) com 48 horas de fermentação, passa para faixa de neutralidade após as 48hs, permanecendo assim até o final da fermentação.

A análise por cromatografia gasosa (Tabela 23 e Figura 40) revelou a presença de hexanoato de etila apenas em traços, somente com 24 horas de fermentação.

O acetaldeído, acetato de etila, butirato de etila, álcool isoamílico e 1-octen-3-ol tiveram suas maiores concentrações nos seguintes tempos: 1,1ppm (24hs); 17ppm (24hs); 2,7ppm (24hs); 55ppm (48hs) e 10,3ppm (48hs), respectivamente (Tabela 23 e Figura 40). Sendo que o acetaldeído e o acetato de etila só foram encontrados com 24 hs de fermentação. Nos outros tempos obtém-se traços ou a ausência dos referidos compostos.

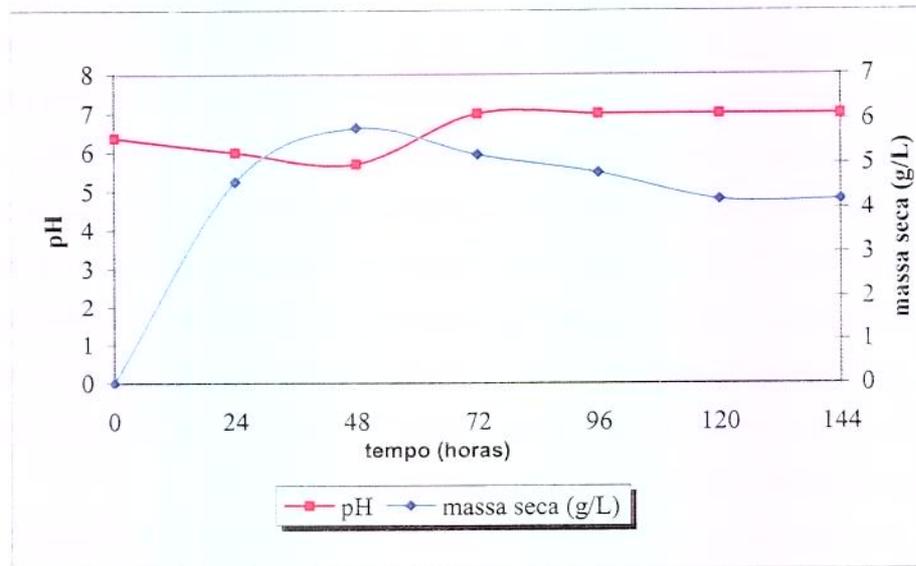


Figura 39– Curva de Crescimento de *Neurospora* sp.5 em meio Yeast malt broth

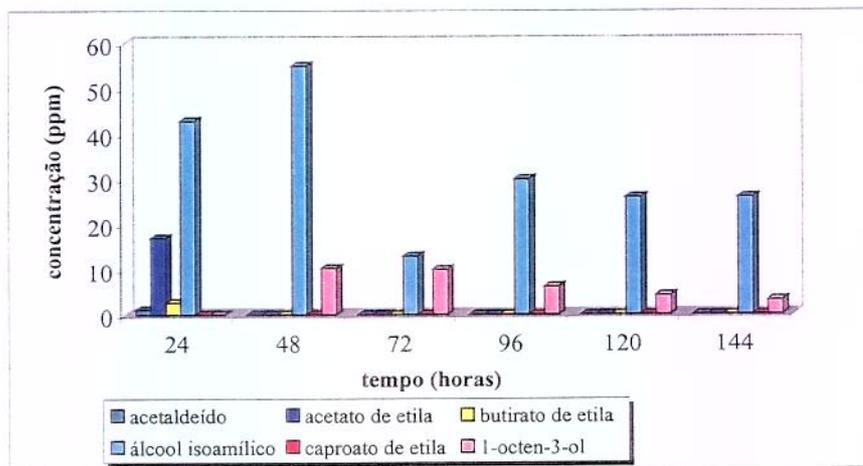


Figura 40 - Análise de compostos voláteis produzidos por *Neurospora* sp.5 em meio Yeast Malt a 30°C, suspensão de esporos 10^5 /ml de meio.

4.5.3 - Meio Czapeck Dox modificado(Cz.mod.)

A avaliação sensorial realizada por painel não treinado (Tabela 21) revelou que a linhagem *Neurospora* sp.5 quando cultivada em meio Czapeck apresentou aroma frutal de fraca intensidade.

A Figura 41 mostra as variações na biomassa e nos valores de pH na determinação da curva de crescimento da linhagem *Neurospora* sp 5 onde a massa celular apresentou um crescimento com concentração celular de 2,7g/L (24 hs) e 3,2 g/L (144 hs). O pH já com 24 hs de fermentação torna-se bastante ácido (pH 4,5) diminuindo ainda mais após 72 hs ficando o pH entre 3,5 e 4,0, entre 96 e 144 hs de fermentação.

A análise por cromatografia gasosa (Tabela 24e Figura 42) revelou a presença de butirato de etila e hexanoato de etila apenas em traços.

Os outros compostos presentes, acetaldeido, álcool isoamílico e 1-octen-3-ol apresentaram suas maiores concentrações respectivamente: 11ppm (24hs); 27ppm (96hs) e 1,5ppm (96hs) (Tabela 24 e Figura 42).

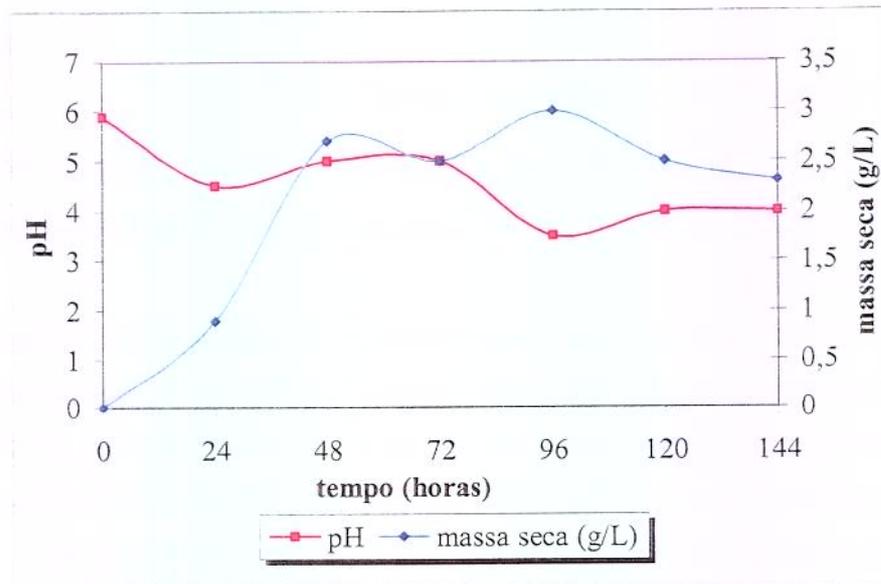


Figura 41 – Curva de Crescimento de *Neurospora* sp.5 em meio Czapeck

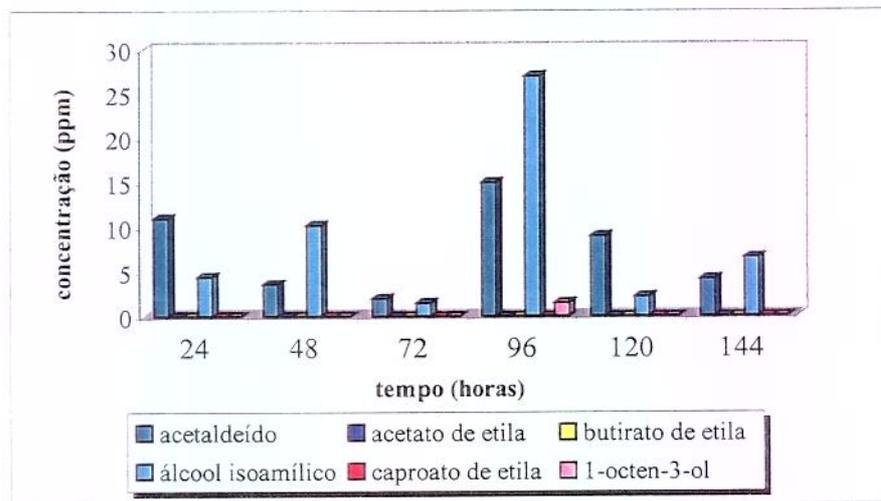


Figura 42 - Análise de compostos voláteis produzidos por *Neurospora* sp.5 em meio Czapeck a 30°C, suspensão de esporos 10^5 /ml de meio.

4.5.4 – Meio Vogel mínimo sacarose

A avaliação sensorial realizada por painel não treinado (Tabela 21) revelou que a linhagem *Neurospora* sp.5 quando cultivada em meio Vogel mínimo sacarose apresentou aroma agradável de fruta com intensidade mais acentuada em 48 horas de fermentação. Nos tempos 96 e 120 horas, além da diminuição do aroma frutal, o painel notou leve aroma de cogumelo.

A Figura 43 mostra as variações na biomassa e nos valores de pH na determinação da curva de crescimento da linhagem *Neurospora* sp5 em meio Vogel mínimo sacarose onde a massa celular atinge sua concentração máxima (8,4g/L) com 48 horas de fermentação. O pH do meio cai em 24 hs de fermentação (pH 3,5) aumentando em seguida (após 24 hs) alcançando a sua neutralidade com 96 hs e permanecendo assim até o final da fermentação (144 hs).

A análise por cromatografia gasosa (Tabela 25 e Figura 44) revelou a presença de hexanoato de etila apenas em 48 horas de fermentação (2,6 ppm). O acetato de etila 1- apresentou valor máximo de 1,5 ppm (24 hs) e o 1-octen-3-ol de 1,0 ppm (72hs). Os outros compostos revelados, acetaldeído, butirato de etila e álcool isoamílico apresentaram suas maiores concentrações: 16ppm/48hs; 1,5ppm (24hs) e 94ppm (120hs) (Tabela 25 e Figura 44).

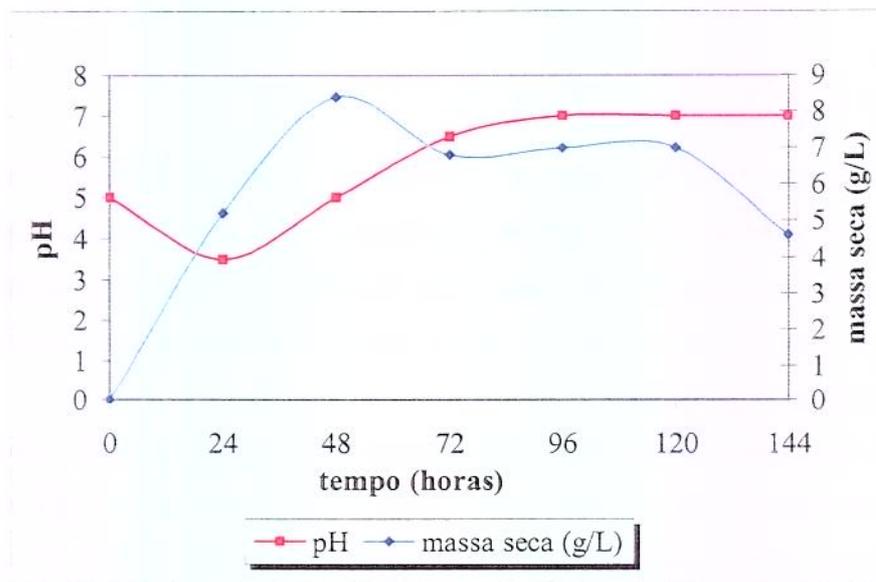


Figura 43– Curva de Crescimento de *Neurospora* sp.5 em meio Vogel sacarose

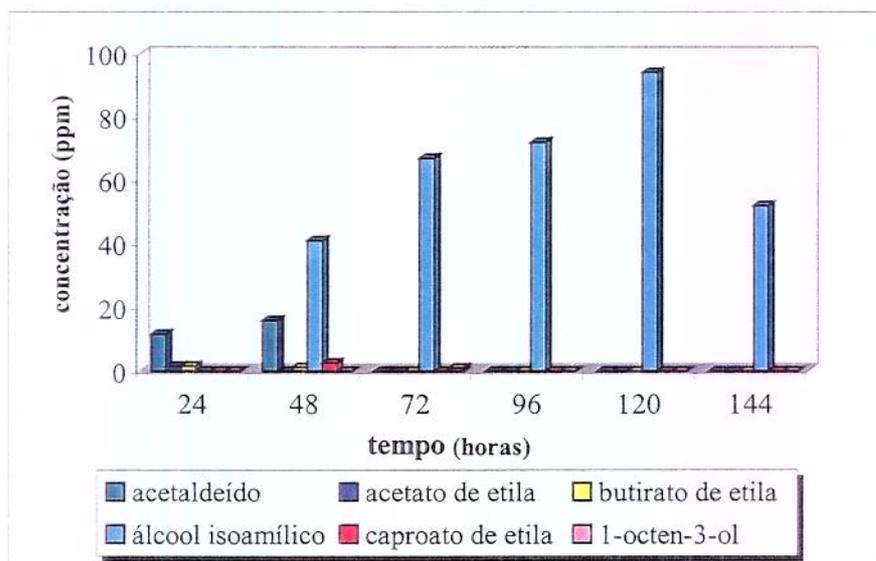


Figura 44 – Análise de compostos voláteis produzidos por *Neurospora* sp.5 em meio Vogel Sacarose a 30°C, suspensão de esporos 10^5 /ml de meio.

4.5.5 - Meio Vogel mínimo maltose

A avaliação sensorial realizada por painel não treinado (Tabela 21) mostrou que a linhagem *Neurospora* sp.5 quando cultivada em meio Vogel mínimo maltose apresentou aroma agradável de fruta com intensidade moderada durante os 6 dias de fermentação. A Figura 45 mostra as variações na biomassa e nos valores de pH na determinação da curva de crescimento da linhagem *Neurospora* sp5 em meio Vogel mínimo maltose onde a massa celular atinge sua concentração máxima (19,9g/L) com 48 horas de fermentação. O pH diminui em 24 hs, de 5,0 para 4,0 e ao longo da fermentação aumenta linearmente com o tempo, até alcançar o máximo em 120 hs de fermentação, com pH próximo de 6,0 (Figura 45).

A análise por cromatografia gasosa (Tabela 26 e Figura 46) revelou a presença de 1-octen-3-ol apenas em traços com 72 horas de fermentação e do hexanoato de etila de 1,3 ppm em 48 hs de fermentação. O acetaldeído, acetato de etila, butirato de etila e álcool isoamílico tiveram suas maiores concentrações : 28ppm (144hs); 5ppm (48hs); 6,2ppm (144hs) e 61,3ppm (144hs), respectivamente (Tabela 26 e Figura 46).

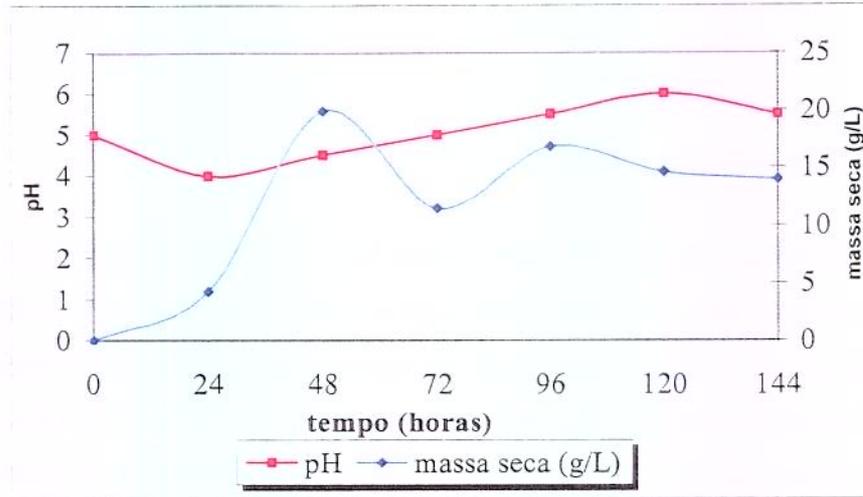


Figura 45– Curva de Crescimento de *Neurospora* sp.5 em meio Vogel maltose

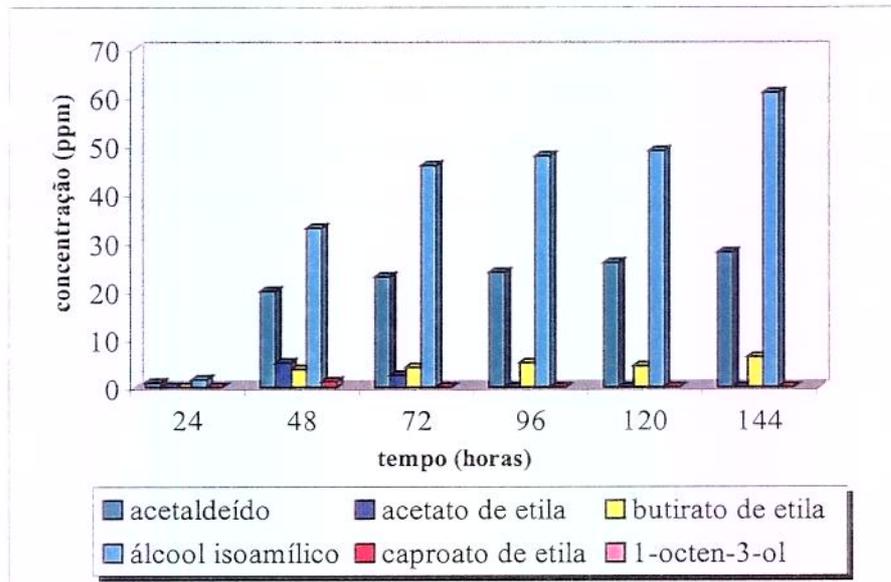


Figura 46 - Análise de compostos voláteis produzidos por *Neurospora* sp.5 em meio Vogel maltose a 30°C, suspensão de esporos 10^5 /ml de meio.

4.5.6 – Meio Corn Steep Liquor sem glicose (CSL)

A avaliação sensorial realizada por painel não treinado (Tabela 21) mostrou que a linhagem *Neurospora* sp5 quando cultivada em CSL apresentou aroma indefinido e desagradável nos 6 dias de fermentação .

A Figura 47 mostra as variações na biomassa e nos valores de pH na determinação da curva de crescimento da linhagem *Neurospora* sp5 em CSL. A biomassa apresenta um aumento com 24 hs permanecendo praticamente constante até 72 hs, observando-se me seguida uma queda desta biomassa (96hs), permanecendo constante até o final da fermentação, 144 hs .O pH (Figura 47) tem um aumento gradativo ao longo da fermentação até alcançar o valor de 8,0.

A análise por cromatografia gasosa revelou unicamente a presença do álcool isoamílico, em traços.

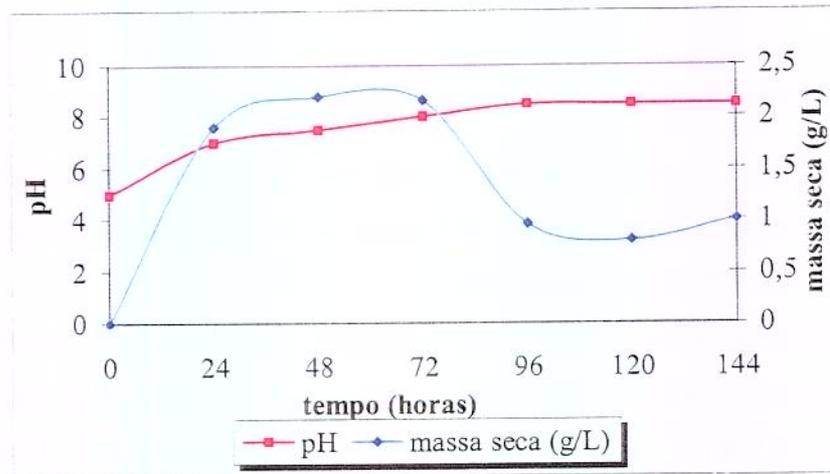


Figura 47 – Curva de Crescimento de *Neurospora* sp.5 em meio Corn steep liquor sem glicose

4.5.7 - Meio Corn Steep Liquor com Glicose (CSG)

A avaliação sensorial realizada por painel não treinado (Tabela 21) mostrou que a linhagem *Neurospora* sp.5 quando fermentada em meio CSG apresentou aroma de fruta nos 6 dias de fermentação. A Figura 48 mostra as variações na biomassa e nos valores de pH. A massa celular tem um pico com 72 hs (5,9g/L) de fermentação; e após esse tempo há uma queda da biomassa. O pH (Figura 45) fica ácido (pH 5,0) até 24 hs de fermentação, aumentando em 48 hs para o pH neutro (7,0), permanecendo assim até o final da fermentação (144hs).

A análise por cromatografia gasosa (Tabela 27 e Figura 49) revelou a presença de traços de acetaldeído, butirato de etila, hexanoato de etila e 1-octen-3 – ol.

A maior concentração de acetato de etila (4,4,ppm) e de álcool isoamílico (87ppm) foi obtida com 24 hs de fermentação (Tabela 27 e Figura 49).

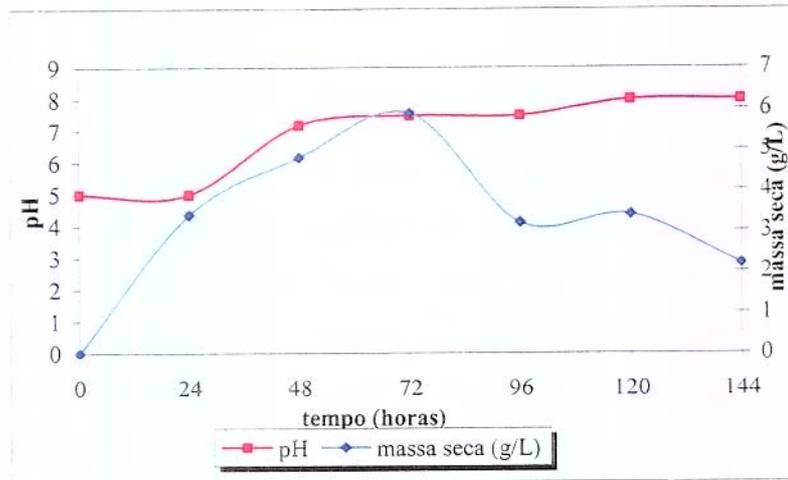


Figura 48 – Curva de Crescimento de *Neurospora* sp.5 em meio Corn steep liquor com glicose

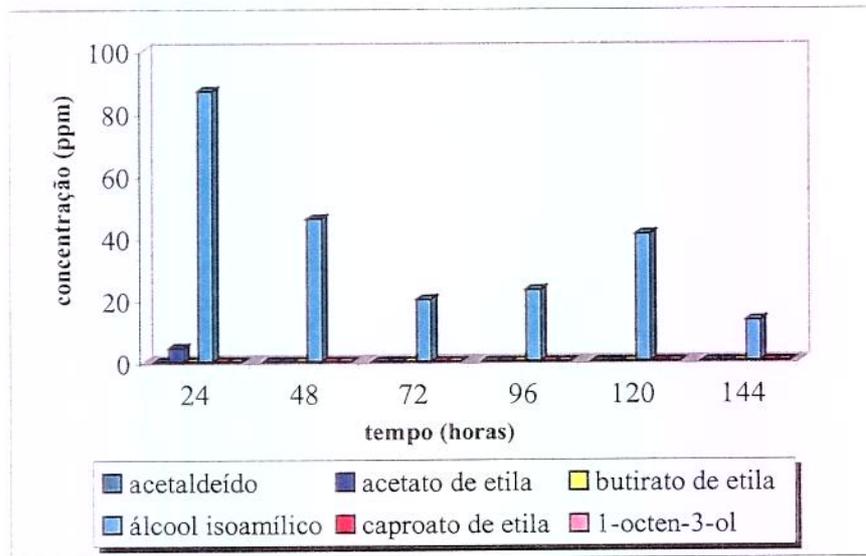


Figura 49 - Análise de compostos voláteis produzidos por *Neurospora* sp.5 em meio Corn steep liquor com glicose a 30 °C, suspensão de esporos 10^5 /ml de meio.

4.5.8 - Meio Frutose /Extrato de levedura

A avaliação sensorial realizada por painel não treinado (Tabela 21) mostrou que a linhagem *Neurospora* sp.5 apresentou aroma bastante desagradável e indefinido durante as 144 horas de fermentação em meio Frutose /Extrato de levedura.

A Figura 50 mostra as variações na biomassa e nos valores de pH na determinação da curva de crescimento da linhagem *Neurospora* sp5 em meio Frutose/Extrato de Levedura onde se pode notar que o pico máximo na produção de massa celular ocorre com 48 horas de fermentação.

A análise por cromatografia gasosa (Tabela 28 e Figura 51) revelou a presença de acetato de etila, hexanoato de etila e 1-octen-3-ol em traços.

Os outros compostos identificados, acetaldeído, butirato de etila e álcool isoamílico tiveram suas maiores concentrações: 51ppm/48hs; 6,7ppm/120hs e 213ppm/96hs respectivamente (Tabela 28 e Figura 51).

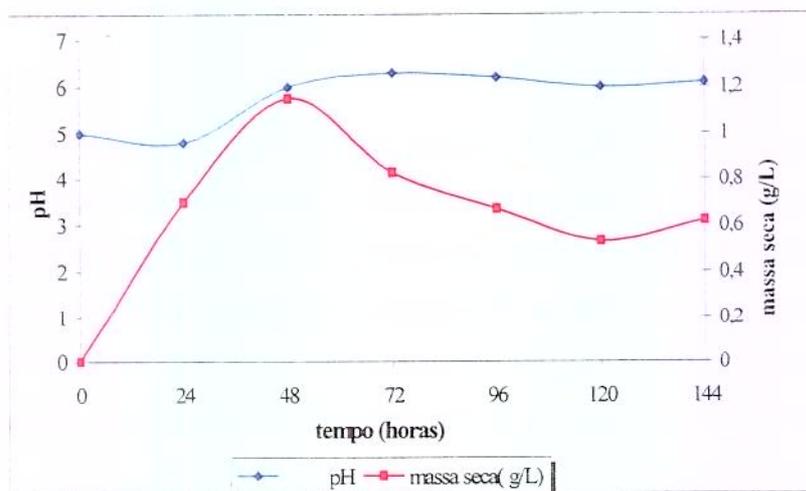


Figura 50 – Curva de Crescimento de *Neurospora* sp.5 em meio Frutose/Extrato de levedura

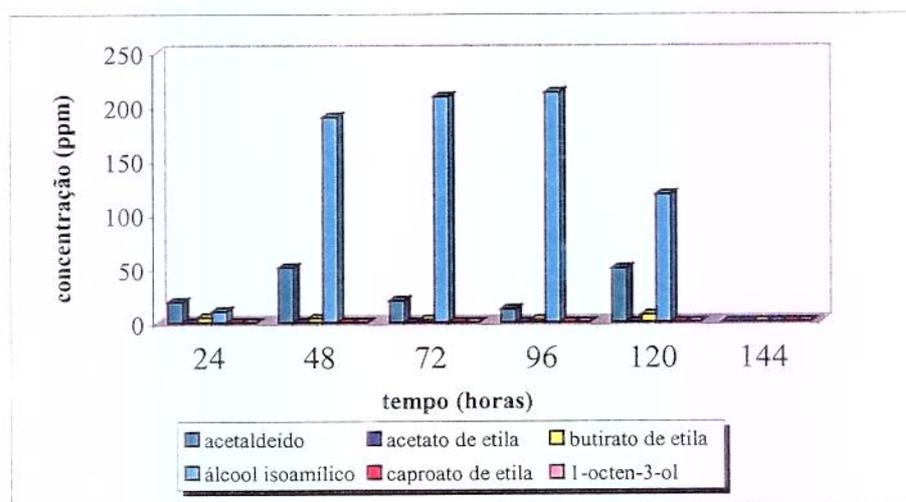


Figura 51 - Análise de compostos voláteis produzidos por *Neurospora* sp.5 em meio Frutose/Extrato de Levedura a 30°C, suspensão de esporos 10^5 /ml de meio.

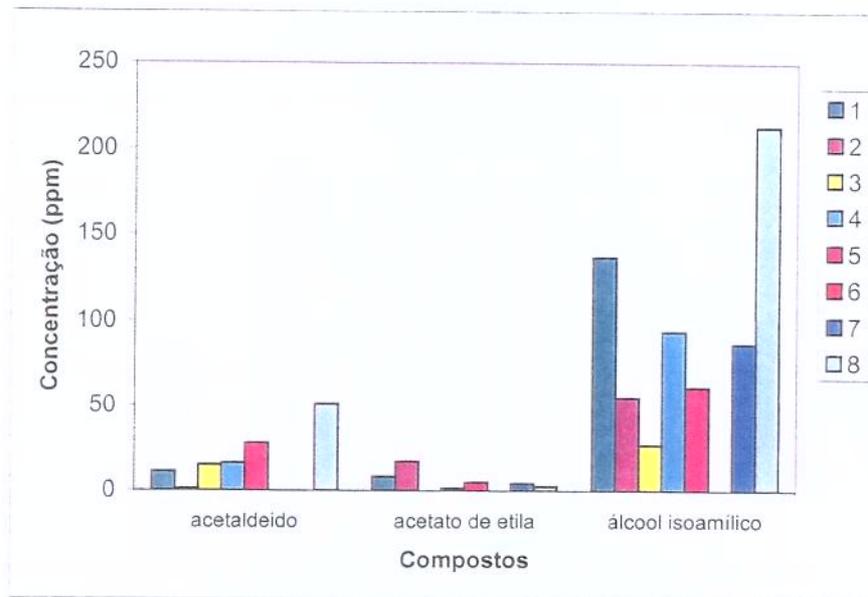


Figura 52-a – Concentrações máximas dos compostos voláteis nos meios selecionados produzidos por *Neurospora* sp5

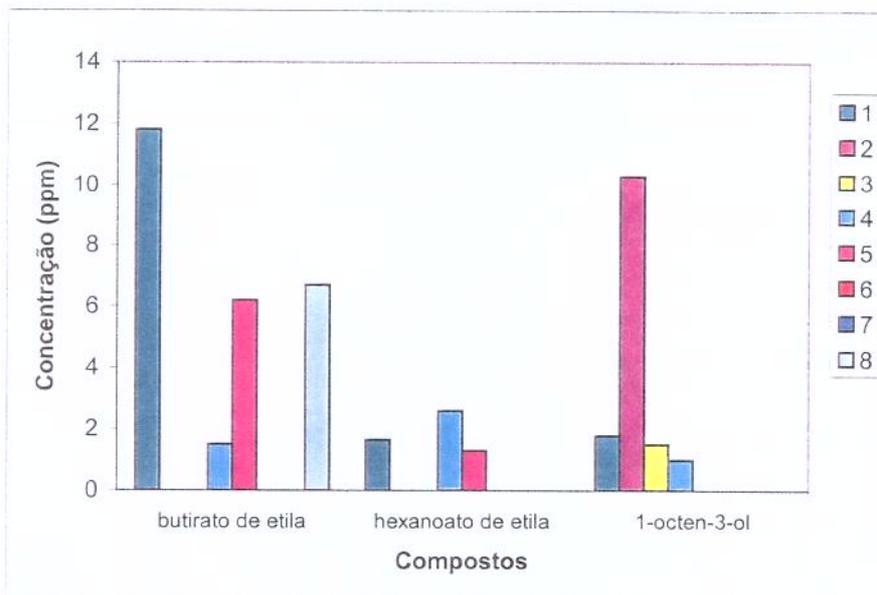


Figura 52-b – Concentrações máximas dos compostos voláteis nos meios selecionados produzidos por *Neurospora* sp5

Legenda: 1- CEM 5%; 2- YMB; 3- CZ; 4- VS; 5- VM; 6- CS; 7- CSG; 8-F/EL

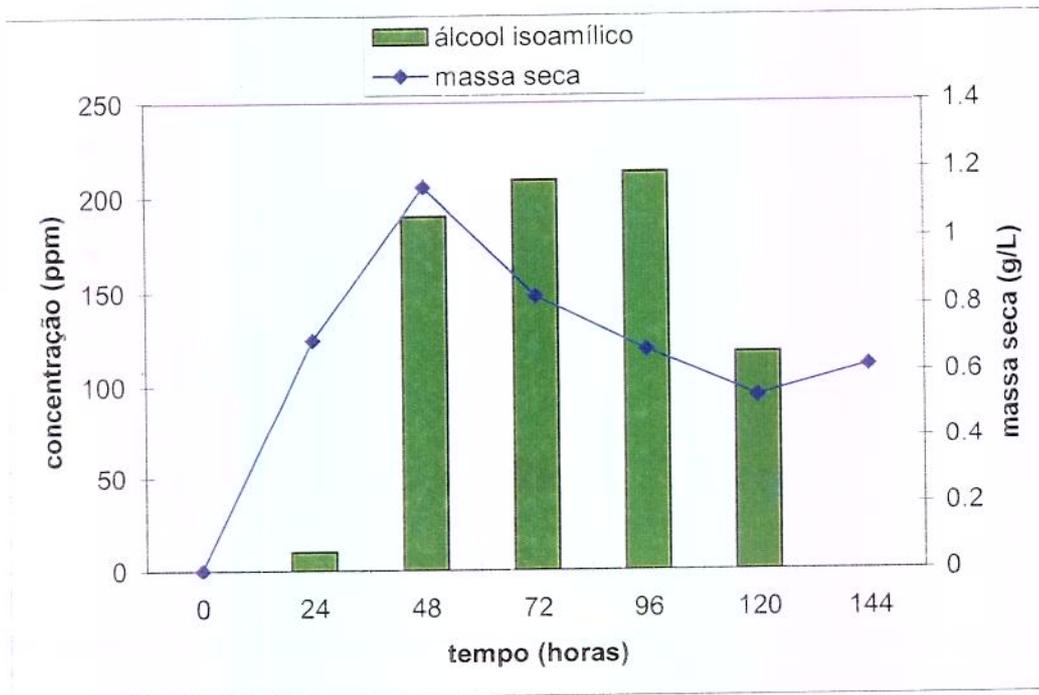


Figura 53 – Relação entre a produção de álcool isoamílico e a curva de crescimento da linhagem *Neurospora sp5* em meio Frutose/Extrato de Levedura

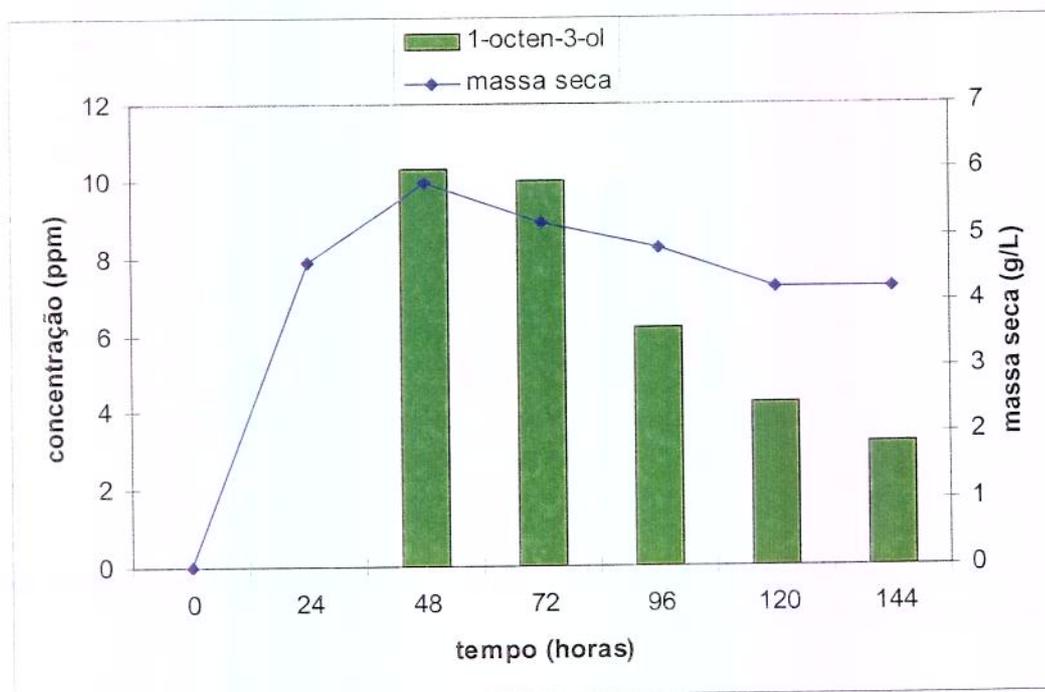


Figura 54- Relação entre a produção de 1-octen-3-ol e a curva de crescimento da linhagem *Neurospora sp5* em meio Yeast Malt Broth

Tabela 22- Composição de compostos voláteis produzidos por *Neurospora* sp.5 em Meio Caldo Extrato de Malte 5% a 30°C, suspensão de esporos 10⁵/ml de meio.

COMPOSTOS(ppm)	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
Acetaldeido	11	5,4	6,1	2,2	2,3	traços
acetato de etila	1,5	5,9	6,0	8,2	7,0	traços
butirato de etila	8,2	11,8	7,2	2,5	1,3	-
alcool isoamílico	101	134	137	119	125	82
hexanoato de etila	traços	traços	traços	-	1,65	-
1 - octen - 3 - ol	-	-	-	Traços	1,78	traços

Tabela 23: Composição de compostos voláteis produzidos por *Neurospora* sp.5 em meio Yeast Malt Broth a 30°C, suspensão de esporos 10⁵/ml de meio.

COMPOSTOS(ppm)	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
acetaldeido	1,1	-	traços	-	-	-
acetato de etila	17	traços	traços	Traços	-	-
butirato de etila	2,7	-	-	-	-	-
alcool isoamílico	43	55	13	30	26	26
hexanoato de etila	traços	-	-	-	-	-
1 - octen - 3 - ol	-	10,3	10	6,2	4,2	3,2

Tabela 24: Composição de compostos voláteis produzidos por *Neurospora* sp5. em Meio Czapeck a 30°C, suspensão de esporos 10⁵/ml de meio :

COMPOSTOS(ppm)	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
acetaldeido	11	3,6	2,0	15	9,1	4,2
acetato de etila	-	-	-	-	-	-
butirato de etila	traços	traços	-	Traços	traços	-
alcool isoamílico	4,4	10,2	1,5	27	2,2	6,6
hexanoato de etila	-	traços	-	Traços	traços	-
1 - octen - 3 - ol	-	traços	traços	1,5	-	traços

Tabela 25: Composição de compostos voláteis produzidos por *Neurospora* sp.5 em Meio Vogel sacarose a 30°C, suspensão de esporos 10⁵/ml de meio.

COMPOSTOS(ppm)	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
acetaldeido	11,5	16	traços	traços	-	-
acetato de etila	1,5	traços	traços	-	-	-
butirato de etila	1,5	1,1	-	-	-	-
alcool isoamílico	traços	41	67	72	94	52
hexanoato de etila	traços	2,6	-	traços	traços	-
1 - octen - 3 - ol	-	traços	1,0	-	-	Traços

Tabela 26: Composição de compostos voláteis produzidos por *Neurospora* sp.5 em Meio Vogel maltose a 30°C, suspensão de esporos 10⁵/ml de meio.

COMPOSTOS(ppm)	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
acetaldeido	1,0	20	22,6	24,4	26,4	28
acetato de etila	-	5,0	2,5	traços	traços	traços
butirato de etila	traços	3,8	4,2	5,0	4,4	6,2
alcool isoamilico	1,72	33	46	48	48,6	61,3
hexanoato de etila	traços	1,3	traços	traços	traços	traços
1 - octen - 3 - ol	-	-	traços	-	-	-

Tabela 27: Composição de compostos voláteis produzidos por *Neurospora* sp.5 em Meio Corn Steep Liquor com glicose a 30°C, suspensão de esporos 10⁵/ml de meio.

COMPOSTOS(ppm)	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
Acetaldeido	traços	-	-	-	-	-
acetato de etila	4,4	Traços	traços	traços	traços	traços
butirato de etila	traços	-	-	-	-	-
alcool isoamilico	87	46	20	23	41	13
hexanoato de etila	traços	-	-	-	-	-
1 - octen - 3 - ol	-	Traços	traços	Traços	traços	-

Tabela 28: Composição de compostos voláteis produzidos por *Neurospora* sp.5 em Meio Frutose/ Extrato de Levedura a 30°C, suspensão de esporos 10⁵/ml de meio

COMPOSTOS(ppm)	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
Acetaldeido	19	51	20	12	50	-
Acetato de etila	traços	traços	traços	traços	traços	2,7
Butirato de etila	4,7	4,0	2,7	2,3	6,7	-
alcool isoamilico	10,2	190	209	213	118	-
Hexanoato de etila	traços	-	-	-	traços	-
1 - octen - 3 - ol	-	-	traços	traços	-	-

A análise dos resultados obtidos pela fermentação da linhagem *Neurospora* sp5 revelaram que o composto acetaldeído foi obtido em sua maior concentração (51ppm) após 48 horas de fermentação no meio Frutose/Extrato de Levedura. Esse composto foi obtido na maioria dos meios estudados com exceção de Corn Steep Liquor e Corn Steep Liquor Glicose(figura 52-a).

Para o composto acetato de etila, a maior concentração foi de 17 ppm em meio Yeast Malt Broth após 24 horas de fermentação(figura 52-a).

O álcool isoamílico, dentre todos os compostos produzidos pela linhagem *Neurospora* sp5 foi o que obteve a maior concentração, 213 ppm após 96 horas de fermentação em meio Frutose/Extrato de Levedura, embora tenha sido produzido em todos os meios selecionados com exceção de Corn Steep Liquor(figura 52-a). A figura 53 mostra que a máxima produção desse composto se dá durante a fase estacionária de crescimento.

O composto butirato de etila foi produzido em apenas 50% dos meios selecionados e foi encontrado em maior concentração, 11,8 ppm, após 48 horas de fermentação em meio Caldo Extrato de Malte 5%(figura 52-b) .

O composto hexanoato de etila foi produzido em três dos meios selecionados, Caldo Extrato de Malte 5%, Vogel Sacarose e Vogel Maltose. Foi obtido na maior concentração, 2,6 ppm, após 48 horas de fermentação em meio Vogel Sacarose(figura 52-b).

Apenas os meios Caldo Extrato de Malte 5%, Yeast Malt Broth, Czapeck e Vogel Sacarose produziram o composto 1-octen-3-ol quando fermentado pela linhagem *Neurospora* sp5, sendo que a maior concentração, 10,3 ppm, foi obtida após 48 horas de fermentação em meio Yeast Malt Broth(figura 52-b). A figura 54 mostra que a máxima produção desse composto se dá durante a fase estacionária de crescimento.

As linhagens *Neurospora* sp1, *Neurospora* sp2 e *Neurospora* sp5 , conforme já descrito anteriormente foram isoladas de Beiju e coletadas em várias regiões do Maranhão e todas produzem aroma agradável de fruta e de cogumelo com maior ou menor intensidade conforme o meio de cultura utilizado.

Segundo ARMSTRONG et al (1994), a especificidade das linhagens é fator importante para a produção de aroma e pode variar entre linhagens de um mesmo microrganismo.

YAMAUCHI et al. (1991) examinaram 12 linhagens de *Neurospora* sp , incluindo a linhagem ATCC 46892 isolada de beiju , quanto a produção de aroma de frutas. Os autores observaram que apenas a linhagem isolada de beiju produziu aroma de frutas.

PASTORE et al.(1994) estudaram a produção de aroma por sete linhagens isoladas de beiju de várias regiões do Maranhão em meio líquido Caldo Extrato de malte 5% Outras linhagens que não isoladas de beiju ,pertencentes ao NRRL(Northern Regional Research Laboratory) e 12 linhagens isoladas do solo do Estado de São Paulo, também foram incluídas no estudo. Os resultados da avaliação sensorial mostraram que apenas as linhagens isoladas de beiju produziram aroma de frutas

Nos meios de cultura deste trabalho foram selecionados como fonte de carbono: glicose (YMB, CSG), sacarose (VS, Cz), frutose (F/EL) e maltose (CEM 5%, VM).

As fontes de carbono são de grande importância para os fungos porque fornecem o carbono necessário para a biossíntese de vários componentes celulares, como carboidratos, proteínas , lipídios , além do que sua oxidação fornece energia para a célula.

Vários compostos podem ser utilizados como fonte de carbono e energia pelos fungos, sendo que a glicose é a mais largamente utilizada, seguida de frutose, manose e galactose, embora esta última, necessite de algum período de adaptação. Alguns dissacarídeos podem ser utilizados intactos pelos fungos , como por exemplo, maltose.(GADD,G.M., 1988)

Como fonte de nitrogênio, foram utilizadas fontes orgânicas ,como extrato de levedura e peptona (CEM5%, YMB, F/EL) e fontes inorgânicas , como sais de nitrato (Cz, VS, VM, CS, CSG). A importância do nitrogênio tem influencia no crescimento dos fungos (GADD,G.M., 1988).

Pela avaliação sensorial (Tabela 4) nota-se que o aroma mais intenso de frutas foi produzido no meio CEM5% pela linhagem *Neurospora* sp1, seguido do meio Vogel maltose, com uma intensidade mais fraca.

Observa-se que em meio Corn Steep Liquor (sem adição de açúcar), não houve desenvolvimento de aroma pela linhagem *Neurospora* sp1 e com as linhagens *Neurospora* sp2 e *Neurospora* sp5, o aroma obtido foi desagradável. Desse modo, observamos a importância da fonte de carbono no desenvolvimento do aroma Nos meios de cultura onde foi utilizada a glicose (YMB e CSG), além do aroma de fruta, desenvolve-se aroma de cogumelo, sendo de maior intensidade na linhagem *Neurospora* sp1 em 72 horas de fermentação.

Nos meios de cultura onde foram utilizados sacarose como fonte de carbono e fontes inorgânicas de nitrogênio , observou-se que nas três linhagens estudadas, o aroma de fruta desenvolvido foi de fraca intensidade. É interessante a observação de que mesmo fraco, o aroma produzido em meio Czapeck, era muito agradável e puro de maçã , também nas três linhagens.

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

MARQUES (1998) observou que *Pichia membranefaciens* mostrou-se capaz de produzir aroma de frutas em determinados meios de cultura. Dentre as fontes de carbono testadas verificou-se que *Pichia membranefaciens* produziu aroma de banana madura quando as fontes de carbono foram glicose, frutose ou manose, juntamente com as

fontes nitrogenadas: autolisado de levedura ou extrato de levedura Quando a fonte de nitrogênio foi a uréia, *Pichia membranefaciens* não produziu compostos de aroma agradáveis.

YOSHIZAWA et al.(1988) estudaram a produção de aroma de frutas produzido por *Neurospora* sp ATCC 46892 em quatro meios de cultura: Caldo Extrato de Malte 5%, Vogel minimum medium (maltose), Vogel minimum medium (sacarose),e Czapeck . Os autores verificaram que o aroma mais intenso foi produzido em meio Caldo Extrato de Malte 5%, sendo que o composto hexanoato de etila foi identificado como responsável pelo aroma de frutas produzido no meio de cultura na concentração de 30 ppm em 3-4 dias de fermentação.

PASTORE et al.(1994) observaram a relação entre o crescimento de *Geotrichium* sp e a produção de compostos de aroma (etil isovalerato e etil hexanoato), em diferentes meios de cultura: Meio G, contendo glicose e autolisado de levedura ; Meio F, contendo frutose e extrato de levedura e Yeast Malt Broth. A Produção de etil isovalerato e etil hexanoato foi consideravelmente maior após 5 dias de fermentação, nos meios G e YMB enquanto o meio F, produziu uma pequena quantidade de etil hexanoato e não produziu etil isovalerato.

Os compostos voláteis encontrados nos meios de fermentação produzidos pelas linhagens *Neurospora* sp1, *Neurospora* sp2 e *Neurospora* sp5 e identificados por cromatografia gasosa foram: (aldeídos) acetaldeído;(ésteres) acetato de etila, butirato de etila, hexanoato de etila e (álcoois) álcool isoamílico e 1-octen-3-ol.

Embora as concentrações dos compostos voláteis produzidos nos meios estudados tenham sido encontrados em baixos níveis, os seus valores de “threshold” são muito mais baixos, sendo da ordem de ppb. Mesmo nessas concentrações baixas podem ser detectados e identificados e portanto podem contribuir de forma significativa para o aroma final.

Tabela 29- Valores de threshold dos compostos voláteis de acordo com FOIS et al.,1988,FAZZALANI, 1978 e BUTTERY et al., 1988

COMPOSTOS	THRESHOLD
Acetaldeido	15-120ppb
Acetato de etila	5-5000ppb
Butirato de etila	1ppb
Álcool isoamilico	250-300ppb
Hexanoato de etila	1ppb
1-octen-3-ol	1ppb

O acetaldeido foi obtido em maior concentração no meio Frutose /Extrato de Levedura para as três linhagens de *Neurospora* estudadas. A maior produtividade e o melhor rendimento também foram obtidos em meio Frutose/Extrato de Levedura para as linhagens *Neurospora* sp 1 e *Neurospora* sp 5; já para a linhagem *Neurospora* sp2, a maior produtividade foi encontrada em meio Corn Steep Glicose e o melhor rendimento em Frutose/Extrato de Levedura(Tabela30).

O acetaldeido é um líquido sem cor, extremamente volátil, inflamável e com ponto de ebulição de 20,8°C; possui odor pungente e penetrante , com “threshold” de 15-120ppb (FOIS et al.,1988). Ocorre naturalmente em folhas de tabaco e carvalho e em aromas frutais de pêra, maçã, morango, abacaxi e framboesa. É utilizado industrialmente em: bebidas não alcoólicas (3,9ppm), sorvetes (25ppm), produtos de panificação(12ppm) e gelatina(6,8ppm). É considerado GRAS (FENAROLI’S, 1971)

ARMSTRONG & BROWN (1994) verificaram que *Candida utilis* é capaz de oxidar etanol a acetaldeido com bons rendimentos. O rendimento máximo foi obtido quando o meio de cultura estava deficiente em ferro e o nível de álcool em aproximadamente 65g/l. .A deficiência de ferro diminui a velocidade do Ciclo do Ácido Cítrico pela inibição de enzimas envolvidas e que são dependentes de ferro, como a succinato desidrogenase e aconitase.

As maiores concentrações de acetato de etila foram obtidas em meios diferentes para as linhagens estudadas: *Neurospora* sp1 em meio Corn Steep Liquor, *Neurospora* sp2 em Vogel sacarose e *Neurospora* sp5 em Yeast Malt Broth. Em termos de produtividade o melhor meio para *Neurospora* sp1 foi Corn Steep Liquor e para *Neurospora* sp2 e *Neurospora* sp5 foi Yeast Malt. Os melhores rendimentos para as três linhagens foi obtida em meio Frutose/Extrato de Levedura (tabela 31).

O acetato de etila é um líquido sem cor, com odor remanescente, semelhante a éter de abacaxi com ponto de ebulição entre 75°C e 76°C; está presente em vários aromas naturais de frutas e em alguns destilados (rum). É utilizado em bebidas não alcoólicas (67ppm), bebidas alcoólicas (50-65ppm) e em produtos de panificação (170ppm). (FENAROLI'S, 1971).

Seu "threshold" está entre 5 e 5000ppb (FAZZALANI, 1978)

Butirato de etila foi obtido em maior concentração no Meio Vogel Maltose para *Neurospora* sp1, diferindo da linhagem 2, onde a maior concentração foi encontrada em meio Frutose/Extrato de Levedura e também da linhagem 5 onde o melhor meio foi CEM5%. As maiores produtividades foram alcançadas em meio CEM5% para as três linhagens e os melhores rendimentos em meio Frutose/Extrato de Levedura (tabela 32). O butirato de etila é um líquido sem cor; seu ponto de ebulição é de 121°C e tem aroma forte de abacaxi; ocorre naturalmente em suco de morango, tendo sido identificado por cromatografia gasosa em óleo de oliva e em outros óleos vegetais. É utilizado em bebidas não alcoólicas (28ppm), sorvetes (44ppm), produtos de panificação (93ppm) e em gelatinas (54ppm) (FENAROLI'S, 1971). Possui "threshold" de 1ppb (FAZZALANI, 1978)

O hexanoato de etila foi produzido em concentração suficiente de ser analisada quantitativamente apenas em meio Frutose/Extrato de Levedura pela linhagem *Neurospora* sp2, sendo que nos outros meios apresentou-se em traços ou ausente. Para as linhagens *Neurospora* sp1 e *Neurospora* sp5 as maiores concentrações foram obtidas em meios diferentes, Frutose/Extrato de Levedura e Vogel Sacarose

respectivamente. No caso da *Neurospora* sp5 observa-se que o meio Vogel Sacarose foi o melhor também em termos de produtividade e rendimento. Para a linhagem *Neurospora* sp1, a maior produtividade foi obtida em meio Corn Steep Glicose e o melhor rendimento em Frutose/Extrato de Levedura.(tabela 34)

O hexanoato de etila é um líquido sem cor até amarelo, com forte aroma de fruta com nota de abacaxi e banana, cujo ponto de ebulição é 168°C. Ocorre naturalmente *Ananas sativus*. É utilizado em bebidas alcoólicas (70ppm), em sorvetes(18ppm), em produtos de panificação(12ppm), doces(12ppm) e em geleias(1,3ppm) (FENAROLI'S, 1971).

Possui "threshold" de 1ppb(FOIS et al., 1988).

Segundo LATRASSE et al (1988), os ésteres são normalmente os compostos responsáveis pelo aroma de frutas, podendo-se desse modo considerar que os ésteres acetato, butirato e hexanoato de etila produzidos pelas três linhagens de *Neurospora* sp nos vários meios líquidos de fermentação são muito provavelmente os principais responsáveis pelo aroma de fruta exalado durante o cultivo.

A produção de ésteres pode ocorrer por duas vias, alcoólise dos compostos acil, pela ação da enzima álcool aciltransferase e pela esterificação direta de um radical álcool e um ácido, pela atividade reversa de lipase(ARMSTRONG & BROWN, 1984).

YAMAUCHI et al.(1989) relatam a presença de atividade de uma álcool aciltransferase em extratos livres de células de *Neurospora* ATCC46892, como sendo a responsável pela formação de hexanoato de etila a partir de hexanoil CoA e etanol. Este extrato produziu pouca ou nenhuma quantidade de ésteres de acetato sugerindo a não existência da enzima álcool acetiltransferase.

Nas linhagens de *Neurospora* sp deste estudo observa-se que hexanoato de etila é produzido em concentrações muito baixas(traços) ou mesmo ausente em alguns meios e que butirato de etila é produzido em concentrações mais significativas, o que pode ser explicado pela maior afinidade da enzima álcool aciltransferase destas linhagens por n-

butiril coenzima A e não por n-hexanoil coenzima A. Verifica-se também através dos dados obtidos que ao contrário do que ocorre com *Neurospora* ATCC46892 onde quase não há formação de acetato de etila, as linhagens estudadas produzem quantidades significativas deste composto, como por exemplo a linhagem *Neurospora* sp1 que produz 165ppm em meio Vogel sacarose, sugerindo assim a presença de uma álcool acetiltransferase, responsável pela formação de acetato de etila.

PASTORE et al.(1994) estudaram a produção de aroma por oito linhagens de *Neurospora* sp, também isoladas de beiju, em meio líquido Caldo Extrato de Malte5%. O aroma de frutas produzido no meio de cultura era extremamente agradável e intenso, onde o composto hexanoato de etila foi identificado através de cromatografia gasosa como sendo o responsável pelo aroma produzido. Das linhagens estudadas, *Neurospora* sp 6 foi a que teve maior concentração, 26ppm.

DAMASCENO (1999) estudou a produção de compostos de aroma de frutas por *Geotrichium fragrans* em manipueira complementada com glicose, frutose e autolisado de levedura. Entre os compostos identificados por cromatografia gasosa, o acetato de etila apresenta sua maior concentração de 11,96ppm em meio de manipueira suplementado com glicose e autolisado de levedura.

O álcool isoamilico foi obtido em maior concentração no meio Frutose /Extrato de Levedura para as linhagens *Neurospora* sp1 e *Neurospora* sp5; já para *Neurospora* sp2 o melhor meio foi CEM 5%. As maiores produtividades de álcool isoamilico foram obtidas em meio CEM5% para as linhagens *Neurospora* sp1 e para *Neurospora* sp2; Frutose/Extrato de Levedura mostrou-se o melhor meio para *Neurospora* sp5. Nas três linhagens estudadas o meio Frutose/Extrato de Levedura mostrou-se o mais adequado em termos de rendimento.(tabela 33)

O álcool isoamílico (3-metil 1-butanol) é um líquido claro, de aparência oleosa com odor pungente e sabor repulsivo, com ponto de ebulição de 132°C; é o maior constituinte do óleo fusel e tem sido identificado em vários óleos essenciais, em aroma

de morango e framboesa e em bebida alcoólica (rum).É utilizada em bebidas não alcoólicas (17ppm), bebidas alcoólicas (100ppm), sorvetes (7,6ppm), gelatinas (46ppm)e doces(52ppm) (FENAROLI'S, 1971). Possui "threshold" entre 250 – 300ppb (BUTTERY et al.,1988).

O álcool 1-octen-3-ol tem suas maiores concentrações em meio Yeast Malt Broth, coincidindo com as maiores produtividades para as três linhagens estudada. No caso dos melhores rendimentos, para *Neurospora* sp2 e *Neurospora* sp5 o Yeast Malt Broth também foi o melhor meio de cultura; para *Neurospora* sp1 o melhor rendimento ocorreu em meio Frutose/Extrato de Levedura(tabela 35)

O 1-octen-3-ol é um líquido oleoso sem cor, com ponto de ebulição de 175°C, de forte aroma de terra com nota remanescente herbal, tendo sido identificado pela primeira vez em extrato do cogumelo *Armillaria matsutake* (parasita que cresce em *Pinus densiflora* nas florestas do Japão), e é considerado o mais importante dos compostos voláteis em cogumelos. Ocorre na forma de dois isômeros opticamente ativos sendo que a forma (-) tem um aroma mais forte e abundante(DIJSTRA,1976; MOSANDL,1986).

É utilizado em bebidas não alcoólicas (0,2ppm), em sorvetes(1,0ppm), em produtos de panificação (6,0ppm) ((FENAROLI'S, 1971). Possui "threshold" de 1ppb((BUTTERY et al.,1988).

Os álcoois tem a menor contribuição no aroma, a menos que estejam presentes em concentrações relativamente altas ou sejam insaturados como é o caso do 1-octen-3-ol (HEATH & REINECCIUS,1986).

O álcool isoamílico geralmente possui um odor desagradável ; porém pode contribuir de forma favorável ao aroma de produtos fermentados quando presente em concentrações apropriadas (CORMIER et al 1991).

PASTORE et al , 1994 verificaram que a linhagem de *Neurospora* sp ATCC 46892 foi capaz de produzir quantidades bastante significativas de álcool isoamilico e de 1-octen-3-ol em meio Caldo Extrato de Malte5%, 318 e 40 ppm respectivamente.

É interessante a observação de que embora a linhagem de *Neurospora* sp ATCC 46892 produza 40ppm de 1-octen-3-ol YAMAUCHI et al, 1991, não detectaram este composto a partir da mesma linhagem utilizando o método de extração com acetato de etila. Das outras linhagens também isoladas de beiju, *Neurospora* sp6 obteve a melhor concentração de álcool isoamílico(208ppm) em relação às outras linhagens. Com relação ao composto 1-octen-3-ol a linhagem *Neurospora* sp5 foi a que produziu maior concentração de todas as linhagens .

DAMASCENO (1999) verificou que o microrganismo *Geotrichium fragrans* foi capaz de produzir álcool isoamílico em meio de cultura composto por manipueira complementada por glicose, com uma concentração de 89,5ppm.

Tabela 30 – Concentração de acetaldeído (ppm), tempo de produção do aroma (h), concentração celular (g/L), Produtividade (P) (mg/L.h⁻¹), rendimento do produto em relação a concentração celular (Y_{p/x}) (ppm.L/g) para a *Neurospora* sp 1 (a), *Neurospora* sp 2 (b) e *Neurospora* sp 5 (c), nos diversos meios testados.

(a)

	Concentração (ppm)	t (h)	Concentração celular (g/L)	P (mg/L.h ⁻¹)	Y _{p/x} (ppm.L/g)
Caldo Extrato de Malte 5%	12,8	24	9,12	0,53	1,40
Yeast Malt Broth	traços	-----	-----	-----	-----
Czapeck	10	96	2,08	0,10	4,81
Vogel Sacarose	30	48	4,14	0,63	7,25
Vogel maltose	62	144	7,6	0,43	8,16
Corn Steep sem glicose	-----	-----	-----	-----	-----
Corn Steep glicose	12,8	24	5	0,53	2,56
Frutose / Extrato de Levedura	98	144	0,68	0,68	144

(b)

	Concentração (ppm)	t (h)	Concentração celular (g/L)	P (mg/L.h ⁻¹)	Y _{p/x} (ppm.L/g)
Caldo Extrato de Malte 5%	13,2	48	9,4	0,28	1,40
Yeast Malt Broth	6	24	4	0,25	1,5
Czapeck	7,2	144	2,3	0,05	3,13
Vogel Sacarose	28	48	6,2	0,58	4,5
Vogel maltose	52	120	9,6	0,43	5,41
Corn Steep sem glicose	-----	-----	-----	-----	-----
Corn Steep glicose	21	24	3,6	0,88	5,8
Frutose / Extrato de Levedura	71	120	0,43	0,59	165

(c)

	Concentração (ppm)	t (h)	Concentração celular (g/L)	P (mg/L.h ⁻¹)	Y _{p/x} (ppm.L/g)
Caldo Extrato de Malte 5%	11	24	8,2	0,46	1,3
Yeast Malt Broth	1,1	24	4,6	0,05	0,24
Czapeck	15	96	3,0	0,16	5,0
Vogel Sacarose	16	48	8,4	0,33	1,9
Vogel maltose	28	144	14,0	0,19	2,0
Corn Steep sem glicose	-----	-----	-----	-----	-----
Corn Steep glicose	-----	-----	-----	-----	-----
Frutose / Extrato de Levedura	51 ppm	48	1,2	1,0	42,5

Tabela 31- Concentração de acetato de etila (ppm), tempo de produção do aroma (h), concentração celular (g/L), Produtividade (P) (mg/L.h⁻¹), rendimento do produto em relação a concentração celular (Y_{p/x}) (ppm.L/g) para a *Neurospora* sp 1 (a), *Neurospora* sp 2 (b) e *Neurospora* sp 5 (c), nos diversos meios testados.

(a)

	Concentração (ppm)	t (h)	Concentração celular (g/L)	P (mg/L.h ⁻¹)	Y _{p/x} (ppm.L/g)
Caldo Extrato de Malte 5%	89,5	48	9,88	1,86	9,06
Yeast Malt Broth	45	48	5,8	0,94	7,76
Czapeck	4,6	96	2,08	0,05	2,21
Vogel Sacarose	58	96	5,6	0,60	10,36
Vogel maltose	50	120	8,8	0,42	5,68
Corn Steep sem glicose	94	24	5,0	3,91	18,8
Corn Steep glicose	50,6	96	1,4	0,52	36,1
Frutose / Extrato de Levedura	67	144	0,44	0,47	152

(b)

	Concentração (ppm)	t (h)	Concentração celular (g/L)	P (mg/L.h ⁻¹)	Y _{p/x} (ppm.L/g)
Caldo Extrato de Malte 5%	64	72	10,2	0,89	6,27
Yeast Malt Broth	81	24	4,0	3,38	20,25
Czapeck	60	72	1,96	0,83	30,61
Vogel Sacarose	165	72	5,98	2,29	27,59
Vogel maltose	99	120	9,60	0,83	10,32
Corn Steep sem glicose	----	----	----	-----	-----
Corn Steep glicose	30	24	3,60	1,25	8,33
Frutose / Extrato de Levedura	30	120	0,41	0,25	73,0

(c)

	Concentração (ppm)	t (h)	Concentração celular (g/L)	P (mg/L.h ⁻¹)	Y _{p/x} (ppm.L/g)
Caldo Extrato de Malte 5%	8,2	96	11,4	0,89	0,72
Yeast Malt Broth	17	24	4,6	3,38	3,70
Czapeck	-----	----	----	-----	-----
Vogel Sacarose	1,5	24	5,98	5,2	0,29
Vogel maltose	5,0	48	9,60	19,9	0,25
Corn Steep sem glicose	----	----	----	-----	-----
Corn Steep glicose	4,4	24	3,60	3,4	1,29
Frutose / Extrato de Levedura	2,7	120	0,5	0,02	5,4

Tabela 32– Concentração de butirato de etila (ppm), -+tempo de produção do aroma (h), concentração celular (g/L), Produtividade (P) (mg/L.h⁻¹), rendimento do produto em relação a concentração celular (Y_{p/x}) (ppm.L/g) para a *Neurospora* sp 1 (a), *Neurospora* sp 2 (b) e *Neurospora* sp 5 (c), nos diversos meios testados.

(a)

	Concentração (ppm)	t (h)	Concentração celular (g/L)	P (mg/L.h ⁻¹)	Y _{p/x} (ppm.L/g)
Caldo Extrato de Malte 5%	8,72	48	9,88	0,18	0,88
Yeast Malt Broth	Traços	-----	-----	-----	-----
Czapeck	0,6	96	2,08	0,006	0,29
Vogel Sacarose	4,5	48	4,14	0,09	1,09
Vogel maltose	14	96	9,22	0,15	1,52
Corn Steep sem glicose	-----	-----	-----	-----	-----
Corn Steep glicose	1,5	24	5	0,063	0,3
Frutose / Extrato de Levedura	11,4	96	0,63	0,12	18,10

(b)

	Concentração (ppm)	t (h)	Concentração celular (g/L)	P (mg/L.h ⁻¹)	Y _{p/x} (ppm.L/g)
Caldo Extrato de Malte 5%	9,5	48	9,40	0,20	1,01
Yeast Malt Broth	3,0	24	4,00	0,13	0,75
Czapeck	Traços	-----	-----	-----	-----
Vogel Sacarose	3,4	48	6,20	0,07	0,55
Vogel maltose	6,7	120	9,60	0,06	0,70
Corn Steep sem glicose	-----	-----	-----	-----	-----
Corn Steep glicose	1,4	24	3,60	0,06	0,39
Frutose / Extrato de Levedura	17,9	96	0,7	0,18	25,6

(c)

	Concentração (ppm)	t (h)	Concentração celular (g/L)	P (mg/L.h ⁻¹)	Y _{p/x} (ppm.L/g)
Caldo Extrato de Malte 5%	11,8	48	9,20	0,20	1,28
Yeast Malt Broth	-----	-----	-----	-----	-----
Czapeck	Traços	-----	-----	-----	-----
Vogel Sacarose	1,5	24	6,20	5,20	0,29
Vogel maltose	6,2	144	9,60	14	0,44
Corn Steep sem glicose	-----	-----	-----	-----	-----
Corn Steep glicose	-----	-----	-----	-----	-----
Frutose / Extrato de Levedura	6,7	120	0,5	0,06	13,4

Tabela 33 – Concentração de álcool isoamilico (ppm), tempo de produção do aroma (h), concentração celular (g/L), Produtividade (P) (mg/L.h⁻¹), rendimento do produto em relação a concentração celular (Y_{p/x}) (ppm.L/g) para a *Neurospora* sp 1 (a), *Neurospora* sp 2 (b) e *Neurospora* sp 5 (c), nos diversos meios testados.

(a)

	Concentração (ppm)	t (h)	Concentração celular (g/L)	P (mg/L.h ⁻¹)	Y _{p/x} (ppm.L/g)
Caldo Extrato de Malte 5%	4,96	48	9,88	0,10	0,50
Yeast Malt Broth	-----	-----	-----	-----	-----
Czapeck	-----	-----	-----	-----	-----
Vogel Sacarose	Traços	-----	-----	-----	-----
Vogel maltose	5,8	144	7,06	0,04	0,82
Corn Steep sem glicose	Traços	-----	-----	-----	-----
Corn Steep glicose	-----	-----	-----	-----	-----
Frutose / Extrato de Levedura	8,1	144	0,68	0,056	11,91

(b)

	Concentração (ppm)	t (h)	Concentração celular (g/L)	P (mg/L.h ⁻¹)	Y _{p/x} (ppm.L/g)
Caldo Extrato de Malte 5%	10,4	48	9,40	0,22	1,11
Yeast Malt Broth	Traços	-----	-----	-----	-----
Czapeck	Traços	-----	-----	-----	-----
Vogel Sacarose	Traços	-----	-----	-----	-----
Vogel maltose	Traços	-----	-----	-----	-----
Corn Steep sem glicose	-----	-----	-----	-----	-----
Corn Steep glicose	-----	-----	-----	-----	-----
Frutose / Extrato de Levedura	4,4	120	0,43	0,04	10,2

(c)

	Concentração (ppm)	t (h)	Concentração celular (g/L)	P (mg/L.h ⁻¹)	Y _{p/x} (ppm.L/g)
Caldo Extrato de Malte 5%	137	72	11,0	1,90	12,45
Yeast Malt Broth	55	48	5,8	1,15	9,48
Czapeck	27	96	3,0	3,0	9,0
Vogel Sacarose	94	120	7,0	7,0	13,43
Vogel maltose	61	144	14,0	0,42	4,36
Corn Steep sem glicose	Traços	-----	-----	-----	-----
Corn Steep glicose	87	24	3,40	3,63	25,59
Frutose / Extrato de Levedura	213	96	0,65	2,2	327

Tabela 34 – Concentração de hexanoato de etila (ppm), tempo de produção do aroma (h), concentração celular (g/L), Produtividade (P) (mg/L.h⁻¹), rendimento do produto em relação a concentração celular (Y_{p/x}) (ppm.L/g) para a *Neurospora* sp 1 (a), *Neurospora* sp 2 (b) e *Neurospora* sp 5 (c), nos diversos meios testados.

(a)

	Concentração (ppm)	t (h)	Concentração celular (g/L)	P (mg/L.h ⁻¹)	Y _{p/x} (ppm.L/g)
Caldo Extrato de Malte 5%	Traços	-----	-----	-----	-----
Yeast Malt Broth	-----	-----	-----	-----	-----
Czapeck	Traços	-----	-----	-----	-----
Vogel Sacarose	Traços	-----	-----	-----	-----
Vogel maltose	Traços	-----	-----	-----	-----
Corn Steep sem glicose	-----	-----	-----	-----	-----
Corn Steep glicose	0,5	24	5,0	0,02	0,01
Frutose / Extrato de Levedura	1,3	144	0,68	0,009	1,91

(b)

	Concentração (ppm)	t (h)	Concentração celular (g/L)	P (mg/L.h ⁻¹)	Y _{p/x} (ppm.L/g)
Caldo Extrato de Malte 5%	Traços	-----	-----	-----	-----
Yeast Malt Broth	-----	-----	-----	-----	-----
Czapeck	Traços	-----	-----	-----	-----
Vogel Sacarose	-----	-----	-----	-----	-----
Vogel maltose	-----	-----	-----	-----	-----
Corn Steep sem glicose	Traços	-----	-----	-----	-----
Corn Steep glicose	-----	-----	-----	-----	-----
Frutose / Extrato de Levedura	1,2	96	0,7	0,01	1,71

(c)

	Concentração (ppm)	t (h)	Concentração celular (g/L)	P (mg/L.h ⁻¹)	Y _{p/x} (ppm.L/g)
Caldo Extrato de Malte 5%	1,65	120	13,0	0,01	0,13
Yeast Malt Broth	Traços	-----	-----	-----	-----
Czapeck	Traços	-----	-----	-----	-----
Vogel Sacarose	2,6	48	8,4	0,05	0,31
Vogel maltose	1,3	48	19,9	0,03	0,065
Corn Steep sem glicose	Traços	-----	-----	-----	-----
Corn Steep glicose	-----	-----	-----	-----	-----
Frutose / Extrato de Levedura	Traços	-----	-----	-----	-----

Tabela 35– Concentração de 1–octen–3–ol (ppm), tempo de produção do aroma (h), concentração celular (g/L), Produtividade (P) (mg/L.h⁻¹), rendimento do produto em relação a concentração celular (Y_{p/x}) (ppm.L/g) para a *Neurospora* sp 1 (a), *Neurospora* sp 2 (b) e *Neurospora* sp 5 (c), nos diversos meios testados.

(a)

	Concentração (ppm)	t (h)	Concentração celular (g/L)	P (mg/L.h ⁻¹)	Y _{p/x} (ppm.L/g)
Caldo Extrato de Malte 5%	Traços	----	----	----	----
Yeast Malt Broth	6,7	48	5,8	0,14	1,16
Czapeck	Traços	----	----	----	----
Vogel Sacarose	----	----	----	----	----
Vogel maltose	----	----	----	----	----
Corn Steep sem glicose	----	----	----	----	----
Corn Steep glicose	2,3	48	7,0	0,05	0,33
Frutose / Extrato de Levedura	5,9	120	0,40	0,05	14,75

(b)

	Concentração (ppm)	t (h)	Concentração celular (g/L)	P (mg/L.h ⁻¹)	Y _{p/x} (ppm.L/g)
Caldo Extrato de Malte 5%	2	144	10,2	0,014	0,20
Yeast Malt Broth	4,7	144	3,0	0,03	1,57
Czapeck	----	----	----	----	----
Vogel Sacarose	0,94	144	5,8	0,007	0,16
Vogel maltose	----	----	----	----	----
Corn Steep sem glicose	----	----	----	----	----
Corn Steep glicose	1,3	72	3,6	0,018	0,36
Frutose / Extrato de Levedura	----	----	----	----	----

(c)

	Concentração (ppm)	t (h)	Concentração celular (g/L)	P (mg/L.h ⁻¹)	Y _{p/x} (ppm.L/g)
Caldo Extrato de Malte 5%	1,78	120	13	0,014	0,14
Yeast Malt Broth	10,3	48	5,8	0,21	1,78
Czapeck	1,5	96	3,0	0,016	0,5
Vogel Sacarose	1,0	72	6,8	0,01	0,15
Vogel maltose	Traços	----	----	----	----
Corn Steep sem glicose	Traços	----	----	----	----
Corn Steep glicose	Traços	----	----	----	----
Frutose / Extrato de Levedura	Traços	----	----	----	----

4.6 – Efeito da temperatura na produção de compostos voláteis pela linhagem *Neurospora* sp1

A linhagem de *Neurospora* sp1 foi inoculada nos meios selecionados nas temperaturas de 25°C, 30°C e 35°C.

Neurospora sp1, quando fermentada em meio CEM5% apresentou o aroma de fruta mais agradável e intenso em relação aos outros meios de cultura, tendo sido portanto selecionado para o estudo do efeito da temperatura em relação a produção de aroma de frutas.

No entanto, quando fermentada em YMB, *Neurospora* sp1, foi obtido além de leve aroma frutal, desenvolveu forte aroma de cogumelo, justificando deste modo a escolha deste meio para o estudo de temperatura

À temperatura de 35°C, a linhagem *Neurospora* sp1 não desenvolveu aroma algum até 6 dias de fermentação nos meios selecionados.

4.6.1 - *Neurospora* sp1 em Caldo Extrato de Malte 5%

A 25°C e a 30°C, a linhagem *Neurospora* sp1 apresentou apenas pequenas variações na intensidade, devido às diferenças nas concentrações dos compostos produzidos nos diferentes tempos de fermentação. Tanto a 25°C como a 30°C, após 24 horas de fermentação já se detecta aroma muito agradável de frutas em CEM5%.

Entre os compostos analisados quantitativamente, acetaldeído, acetato de etila, butirato de etila, álcool isoamílico, hexanoato de etila e 1-octen-3-ol, o acetato de etila foi o que apresentou maior concentração. Esta concentração foi encontrada a temperatura de 25°C, em 96 horas de fermentação (91,4ppm) e a 144 horas (94ppm)(figura55).

Para o composto acetaldeído, à temperatura de 25°C, a sua melhor concentração foi de 27,2ppm. Podemos observar de acordo com a figura que este composto, entre 48 e

96 horas de fermentação , a 25°C apresentou maiores concentrações quando comparada a temperatura de 30°C. Esse mesmo comportamento foi observado para o butirato de etila e álcool isoamílico(figura 55).

No caso do hexanoato de etila, tanto a 25°C quanto a 30°C, não foram detectadas quantidades suficientes para quantificação.(figura 49)

O 1-octen-3-ol só foi encontrado a 25°C em 120 horas (5,4ppm) e 144 horas (2,0ppm) de fermentação(figura 55).

4.6.2 - *Neurospora* sp1 em YEAST MALT BROTH

De acordo com a figura 56, verificamos que o composto acetato de etila é o que apresenta maior concentração entre os compostos analisados. Neste caso a melhor temperatura foi 30°C em contraste aos resultados encontrados para o mesmo composto no meio CEM5%, cuja concentração foi de 45ppm a 48 horas.

O composto butirato de etila apresentou-se somente em traços a temperatura de 30°C ; já a temperatura de 25°C , o composto apresentou em 24 e 48 horas de fermentação , quantidades suficientes para a análise quantitativa, 4,5ppm e 1,0ppm respectivamente.

Para o composto 1-octen-3-ol, observa-se pela figura 56 que a temperatura de 30°C foi a mais adequada para sua produção , sendo que a 48 horas de fermentação encontra-se sua maior concentração (6,7ppm).

Tabela 36- Avaliação sensorial a 25°C e a 30°C da linhagem *Neurospora* sp.1

Tempo (h)	Caldo Extrato de Malte 5%		Yeast Malt Broth	
	25°C	30°C	25°C	30°C
24	Frutal +	Abacaxi +++	Cogumelo +	Maçã +
48	Abacaxi +++	Abacaxi +++	Cogumelo/frutal +	Cogumelo ++
72	Frutal ++	Abacaxi ++	Cogumelo < +	Cogumelo ++++
96	Frutal ++	Abacaxi ++	Desagradável	Cogumelo ++
120	Cogumelo +	Abacaxi ++	Desagradável	Cogumelo ++
144	Abacaxi +	Abacaxi +	desagradável	Cogumelo +

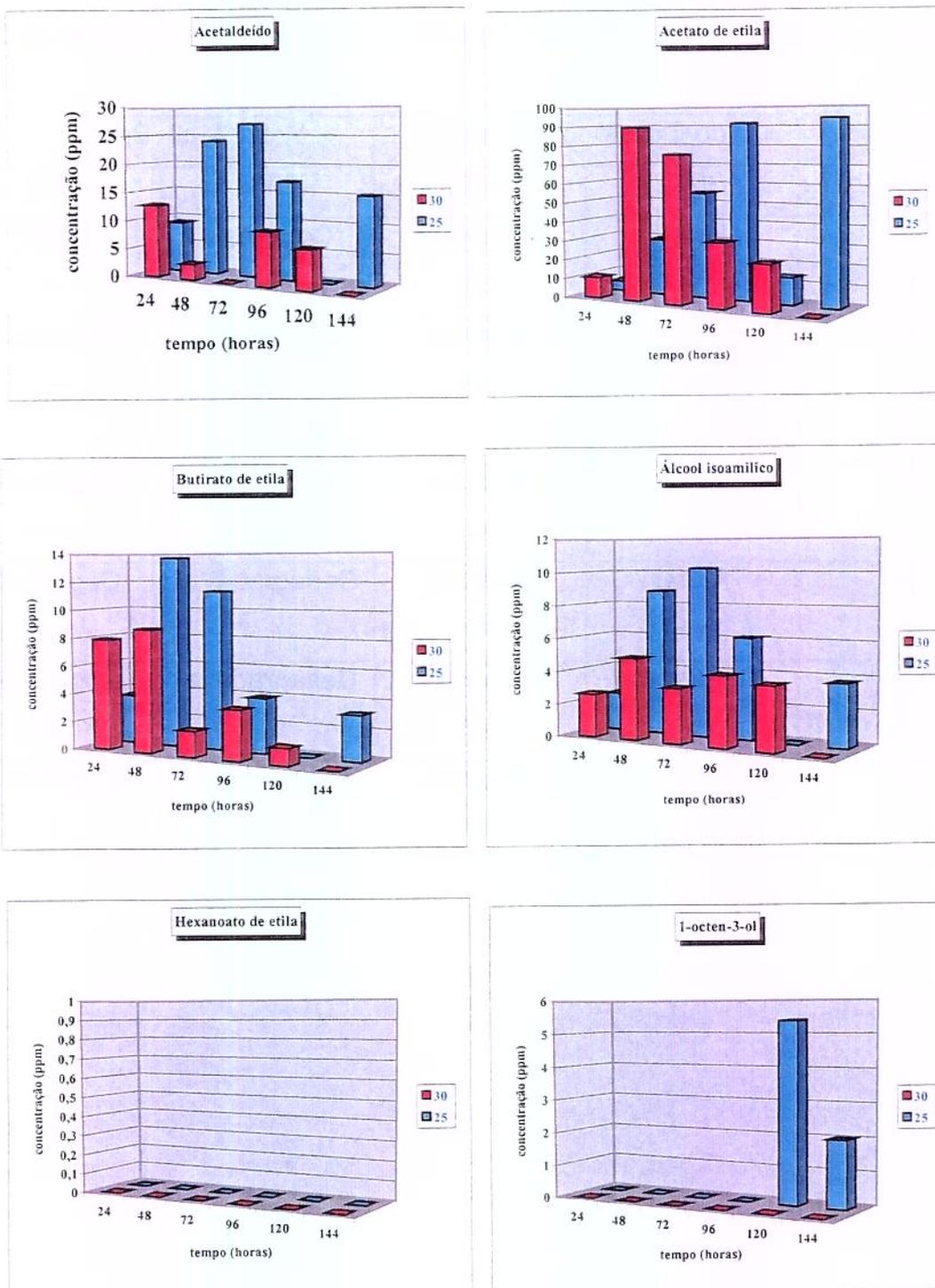


Figura 55 - Efeito da temperatura na produção dos compostos voláteis por *Neurospora sp.1* em meio Caldo Extrato de Malte 5%

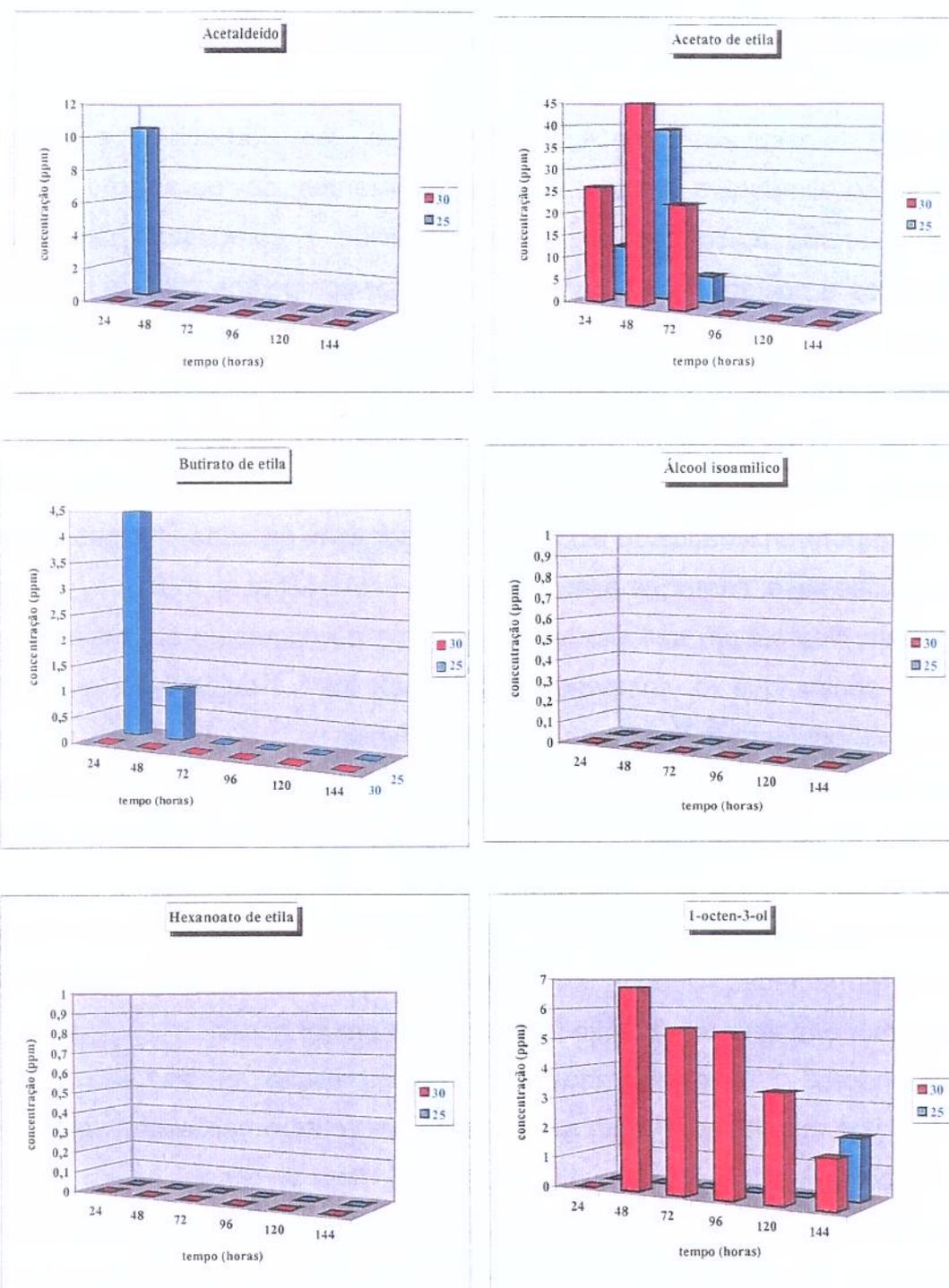


Figura 56 - Efeito da temperatura na produção dos compostos voláteis por *Neurospora* sp.1 em meio Yeast Malt Broth

4.7 – Efeito da adição de óleo de soja em meio Yeast Malt Broth

Cogumelos comestíveis, como *Agaricus bisporus*, tem sido utilizados desde há muito tempo como alimento e também como aromatizantes, devido ao seu raro e delicado aroma; o aroma típico dos cogumelos é devido a compostos não voláteis como aminoácidos e nucleotídeos e principalmente por compostos voláteis com cadeia de 8 carbonos, 1 – octanol, 3-octanol, 3-octanona, 1-octen-3-ol, 2-octen-3-ol, etc. Dentre estes compostos, o 1-octen-3-ol é o mais importante composto volátil associado a cogumelos frescos, constituindo por exemplo 78% da fração volátil em *Agaricus bisporus*, 66% em *C. cibarius*, 72% em *Gyromita esculenta* (PYSALO, 1976) O 1-octen-3-ol é formado a partir da quebra enzimática do ácido linoleico por ação de duas enzimas, lipoxigenase e hidroperóxido liase, conforme esquema abaixo (HADAR et al, 1991).

A linhagem *Neurospora* sp1 produz forte aroma de cogumelo em meio YEAST MALT BROTH, sendo que o composto identificado foi 1-octen-3-ol, o mesmo álcool responsável pelo aroma de cogumelos comestíveis.

O óleo de soja apresenta em sua composição cerca de 49% de ácido linoleico (INDEX MERCK) e foi adicionado ao meio YEAST MALT BROTH como possível precursor de 1-octen-3-ol.

Os resultados mostram que o maior rendimento de 1-octen-3-ol foi de 7,7ppm em 120 horas de fermentação. Quando fermentada em meio YEAST MALT BROTH sem adição de precursor o melhor rendimento foi de 6,7ppm em 48 horas.

Comparando-se os dois resultados, tem-se a impressão de que não é significativa a diferença dos resultados. Porém se levarmos em conta o baixíssimo valor do “treshhold” para 1-octen-3-ol (1 ppb) a diferença de 1 ppm é considerável. Além disso, se comparamos as concentrações encontradas com a quantidade de 1-octen-3-ol presente em algumas espécies de cogumelos, como por exemplo, em *Agaricus bisporus*, de 3,3ppb (DIJKSTRA, 1976), verificamos que a concentração obtida pela linhagem *Neurospora* sp1 é aproximadamente 2000 vezes maior.

No entanto mais estudos são necessários para verificar o efeito do ácido linoleico adicionado diretamente no meio de cultura.

4.8 – Efeito da concentração de esporos na produção de compostos voláteis por *Neurospora* sp1

A linhagem *Neurospora* sp1 quando cultivada em CEM5%, produziu aroma muito agradável de frutas na mesma intensidade, nas duas concentrações de esporos utilizadas, 10^5 e 10^7 esporos /ml

A análise cromatográfica mostrou que não existe grande diferença nas concentrações dos compostos voláteis produzidos nas duas suspensões de esporos estudadas.

O acetaldeído teve suas maiores concentrações em ambas suspensões com 24 horas de fermentação, 12,8ppm (10^5) e 11 ppm (10^7) (figura 57).

O composto acetato de etila teve sua maior concentração com 48 horas de fermentação, 89,5ppm (10^5) e 80ppm (10^7) (figura 58).

Assim como o acetato de etila, o butirato de etila também teve sua maior concentração com 48 horas de fermentação, 8,7ppm (10^5) e 8,4ppm (10^7) (figura 59).

O álcool isoamílico teve seu melhor rendimento com 48 horas de fermentação, 4,9ppm (10^5) e 4,5ppm (10^7) (figura 60).

Pelos resultados obtidos e levando-se em conta os baixos valores de “threshold “ dos compostos em questão (butirato de etila-1ppb e acetato de etila- 5 a 5000 ppb e álcool isoamílico – 250-300ppb) podemos optar pela concentração de 10^5 esporos /ml de meio de meio de cultura.

Os compostos hexanoato de etila e 1-octen-3-ol apresentaram somente traços nas duas concentrações de esporos .

Neurospora sp1 quando cultivada em meio YMB, produziu aroma forte de cogumelo a partir de 48 horas de fermentação nas duas concentrações de esporos estudadas.

Os compostos acetaldeído, butirato de etila e álcool isoamílico não foram detectados ou tiveram presença somente em traços, tanto em 10^5 quanto em 10^7 esporos por ml.

O composto acetato de etila na suspensão 10^5 esporos/ml teve sua melhor concentração (45ppm) em 48 horas, enquanto que na suspensão 10^7 /ml, apresentou-se somente em traços(figura 61).

Para o composto 1-octen-3-ol , a maior concentração na suspensão de 10^5 foi 6,7ppm em 48 horas e a 10^7 , 6,4ppm no mesmo tempo de fermentação(figura 62).

A correlação entre os valores encontrados e o seu "threshold", mostra que a utilização de uma suspensão de esporos 10^5 /ml é a mais indicada.

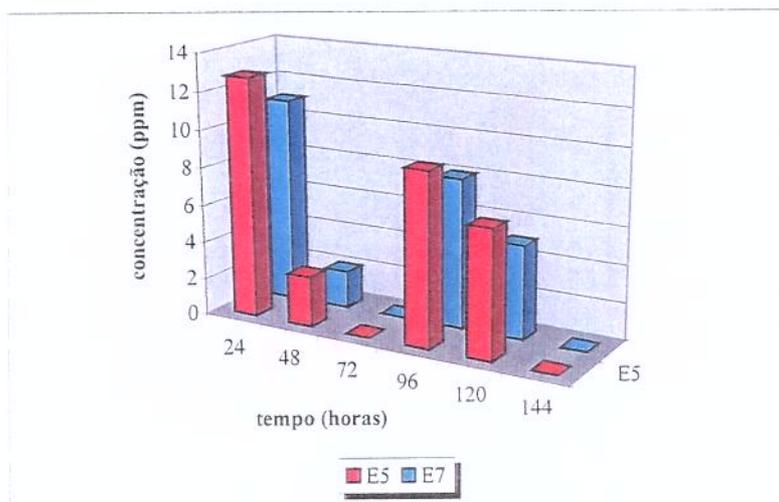


Figura 57–Perfil de obtenção de acetaldeído para *Neurospora* sp.1 em meio CEM5% , com 10^5 (E5) e 10^7 (7) esporos/mL do meio de cultivo

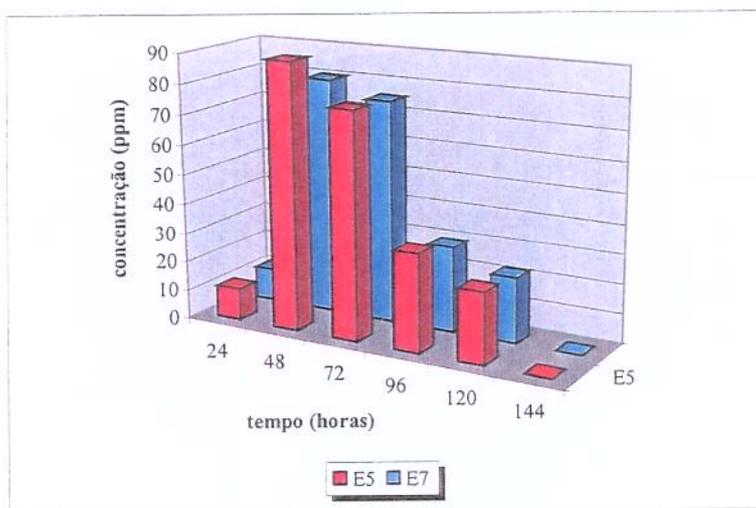


Figura 58–Perfil de obtenção de acetato de etila para *Neurospora* sp.1 em meio CEM5% , com 10^5 (E5) e 10^7 (7) esporos/mL do meio de cultivo

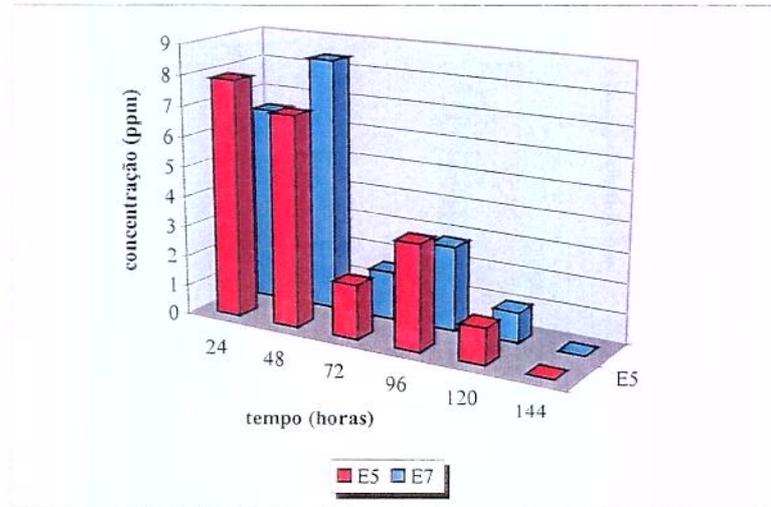


Figura 59 -Perfil de obtenção de butirato de etila para *Neurospora* sp.1 em meio CEM5% , com 10^5 (E5) e 10^7 (7) esporos/mL do meio de cultivo

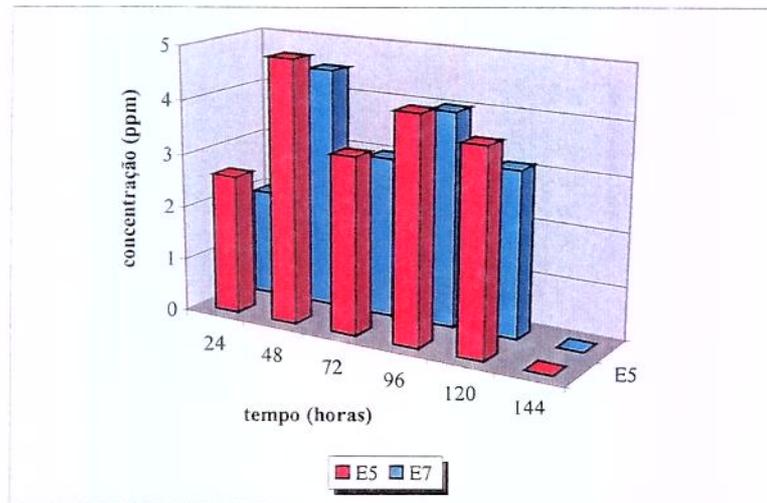


Figura 60-Perfil de obtenção de álcool isoamílico para *Neurospora* sp.1 em meio CEM5% , com 10^5 (E5) e 10^7 (7) esporos/mL do meio de cultivo

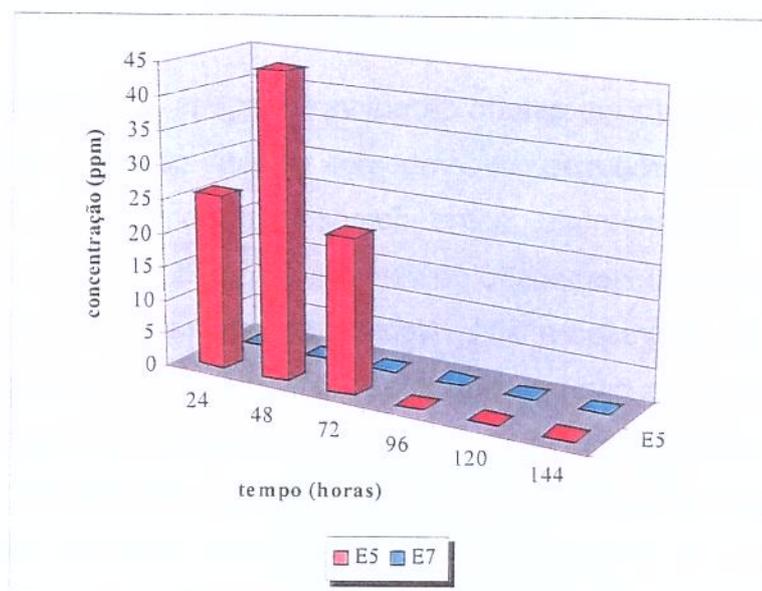


Figura 61 - Perfil de obtenção de acetato de etila para *Neurospora* sp.1 em meio Yest Malt Broth, com 10^5 (E5) e 10^7 (7) esporos/mL do meio de cultivo

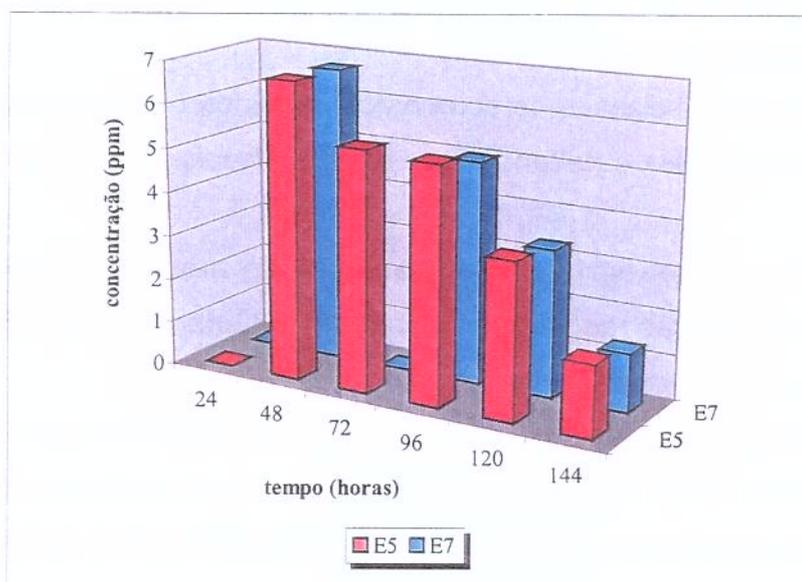


Figura 62 - Perfil de obtenção de 1-octen-3-ol para *Neurospora* sp.1 em meio Yest Malt Broth, com 10^5 (E5) e 10^7 (7) esporos/mL do meio de cultivo

5- CONCLUSÕES

Neste trabalho foi realizado estudo de novas linhagens de *Neurospora* sp , isoladas de beiju, objetivando a produção de compostos voláteis de aroma, verificando-se o efeito de parâmetros fundamentais, como composição do meio de cultura, temperatura, concentração inicial da suspensão de esporos e adição de precursores.

As linhagens de *Neurospora* sp1, *Neurospora* sp2 e *Neurospora* sp5 produziram, aroma de frutas e de cogumelo quando cultivadas em diferentes meios líquidos de cultura a 30°C com agitação de 200rpm, sendo que sua intensidade variou dependendo do meio utilizado e das concentrações dos compostos produzidos.

Dentre as fontes de carbono selecionadas, glicose, sacarose, maltose e frutose , os meios que continham maltose apresentaram os melhores resultados na avaliação sensorial com painel não treinado, com a obtenção de aroma extremamente agradável , embora os meios com frutose e sacarose e glicose em termos de concentração, mostraram resultados melhores em relação ao meio com maltose.

Compostos voláteis de aroma foram produzidos tanto em meios contendo fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio.

Foram identificadas 3 classes de compostos: aldeídos (acetaldeído), ésteres (acetato de etila, butirato de etila e hexanoato de etila) e álcoois (álcool isoamílico e 1-octen-3-ol)

A linhagem *Neurospora* sp1 mostrou-se capaz de produzir a maior concentração de acetaldeído em relação as outras linhagens, 98ppm em meio Frutose /Extrato de levedura com 144 horas de fermentação.

A linhagem *Neurospora* sp2 produziu as maiores concentrações de acetato de etila (165ppm) com 72 horas de fermentação em meio Vogel sacarose e de butirato de etila (17,9ppm) em meio Frutose/Extrato de Levedura com 96 horas de fermentação

A linhagem *Neurospora* sp5 produziu as melhores concentrações de álcool isoamílico (213ppm) , hexanoato de etila (2,6ppm) e de 1-octen-3-ol (10,3ppm) em meios e tempos de fermentação diferentes, 96horas em Frutose/Extrato de Levedura, 48 horas em Vogel sacarose, e 48 horas em Yeast Malt Broth respectivamente.

No estudo do efeito das temperaturas com a linhagem *Neurospora* sp1, a temperatura de 25°C foi a mais adequada para a produção de voláteis na maioria dos compostos em meio Caldo Extrato de malte 5%; já em meio Yeast Malt Broth, a temperatura de 30°C foi melhor para produção de 1-octen-3-ol.

A concentração de 10^5 esporos /ml da suspensão inicial mostrou-se mais interessante para a produção de compostos voláteis nos dois meios estudados.

A adição de ácido linoleico em meio Yeast Malt Broth, aumentou discretamente a produção de 1-octen-3-ol pela linhagem *Neurospora* sp, de 6,7ppm para 7,7ppm.

Os resultados revelaram que as linhagens de *Neurospora* sp deste estudo apresentaram potencialidade para produção de compostos voláteis de aroma de frutas e de cogumelo e que as condições de fermentação devem ser ajustadas para melhoria da produtividade, visando aplicações em indústrias de aromas para alimentos.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, B.; KRINGS, U. & BERGER,R.G. Dynamic Extraction, An Efficient Screening Procedure for Aroma Producing Basidiomycetes.**Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.** V.15, n. 5/6, p. 178-181, 1993.
- ABRAHAM, B. G. & BERGER,R.G. Higher Fungi for Generating Aroma Components through Novel Biotechnologies. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 42, n.10, p. 2344-2348,1994.
- ARMSTRONG, D.W.; MARTIN, S.M.; YAMASAKI,H. Production of Ethyl Acetate from Dilute Ethanol Solutions by *Candida utilis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.26, p. 1038-1041, 1984.
- ARMSTRONG, D.W & BROWN, L. A. Aliphatic, Aromatic and Lactone Compounds. In. Bioprocess Production of Flavor, Fragrance, and Color Ingredients, edited by Alan Gabelman, 1994.
- BERGER, R. G., NEUHAEUSER, K. & DRAWERT, F. Biotechnological Production of Flavour Compounds. III. High Productivity Fermentation of Volatile Flavours Using a Strain of *Ischnoderma benzoinum* . **Biotechnology and Bioengineering**, v.30, n.8, p. 987-990, 1987.
- BERGER, R. G.; DRAWERT, F. & HADRICH, S. Microbial Sources of Flavour Compounds. Bioflavour'87. Analysis-Biochemistry-Biotechnology. Editor Peter Schreier, p.415-434, 1988.
- BERGER, R. G. Aroma Compounds from Microbial De Novo Synthesis. In Aroma Biotechnology, p. 51-75, 1995.
- BRAMORSKI, A.; SOCCOL,C.R.; CHRISTEN,P.& REVAH,S. Fruity Aroma Production by *Ceratocystis fimbriata* in Solid Cultures from Agro-Industrial Wastes. **Revista de Microbiologia**, v.28, p.208-212,1998.
- BUTTERY, R. G., J.G. TURNBAUGH & L.C. LING. Contribution of Volatiles to Rice Aroma . **J. Agric. Food Chem.**, v.36,n.5, p.1006-1009, 1988.
- CORMIER, F.; RAYMOND,Y.; CHAMPAGNE,C.P. & MORIN, A. Analysis of Odor-Active Volatiles from *Pseudomonas fragi* grown in milk. **J. Agric. Food Chem.** V.39, p. 159-161, 1991.
- DAMASCENO, S. Cultivo de *Geotrichium fragrans* em Manipueira. Tese (Doutor em Agronomia) Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, Botucatu,1999.

- DIFCO MANUAL – Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiology, Tenth Edition, p.557-558, 1984.
- DRAWERT, F. & BARTON, H. Biosynthesis of Flavour Compounds by Microorganisms. 3. Production of Monoterpenes by the Yeast *Kuyveromyces lactis*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.26, n.3, p.1207-1212, 1995.
- DIJKTRA, F.I.J. Submerged culture of mushroom mycelium a source of protein and flavor compounds. Ph.D. dissertation, Delft University of Technology, The Netherlands, 1976.
- FABRE, C.E.; DUVIAU, V.J.; BLANC, P.J. & GOMA, G. Identification of Volatile Flavour Compounds Obtained in Culture of *Kuyveromyces marxianus*. **Biotechnology Letters**, v.17, n.11, p.1207-1212, 1995.
- FAZZALANI, F.A. Editor, Compilation of Odor and Taste Threshold Data, ASTM DATA Series DS 48^A, 1978
- FENAROLI'S, HANDBOOK OF FLAVOR INGREDIENTS, edited by Thomas E. Furia and N. Bellanca, p. 259, 373, 380, 386, 444, 556, 1971.
- FERON, G.; BONNARME, P. & DURAND, A. Prospects for the Microbial Production of Food Flavours. **Trends in Food Science & Technology** v.17, p.285-293, 1996.
- FOIS, S. "Sensory Properties of Volatiles Maillard Reaction Products and Related Compounds in: The Maillard Reaction in Foods and Nutrition, ACS Symposium Series 215, G.R Waller and M.S. Feather, editors, ACC Washington, p. 185-286, 1988.
- GADD, G..M. Physiology of Fungal Growth in : Physiology of Industrial Fungi, p.21-26, edited by D.R. Berry, 1988.
- GATFIELD, I. L. Generation of Flavour and Aroma Compounds by Microbial Fermentation and Enzyme Engineering Technology. In Biogenesis of Aromas (T.H. Parliment and Croteau, eds). Washington, D.C., Symposium Series. 317, p. 310-322, 1986.
- GATFIELD, I. L., Production of Flavor and Aroma Compounds by Biotechnology. **Food Technology**, p.110-169, 1988.
- GATFIELD, I. L. Enzymatic and Microbial Generation of Flavor. **Perfumer & Flavorist**, v.20, p.5-14, 1995.

- HADAR, Y. & DOSORETZ, C.G. Mushroom Mycelium as a Potential Source of Food Flavour-.Review. **Trends in Food Science & Technology**, september, p. 214-218, 1991.
- HEATH, H.B. & REINECCIUS, G. Flavor Chemistry and Technology. Biogenesis of Flavor in Fruits and Vegetables, New York, Published by Van Nostrand Reinhold Company, p.43-54, 1986.
- HERRAIZ, T. Produccion Biotecnologica de Compuestos del Aroma de Alimentos. Aplicacion en la Industria Alimentaria. **Alimentaria**, p.35-39, 1990.
- HOSONO, A.; ELLIOT, J. A. & MCGUGAN, W.A. Production of Ethylesters by Some Lactic Acid and Psychrotrophic Bacteria. **Journal of Dairy Science**, v.57, n.5, p.1001-1004, 1974.
- JANSSENS, L.; De POOTER, H.L.; VANDAMME, E.J. & SCHAMP, N.M. Biosynthesis of Esters by *Geotrichium penicillatum*. Bioflavour'87. Analysis – Biochemistry – Biotechnology. Editor Peter Schreier, p.465-471, 1988.
- JANSSENS, L.; De POOTER, H.L.; SCHAMP, N.M. & VANDAMME, E.J. Production of Flavours by Microorganisms. **Process Biochemistry**, v.27, p.195-215, 1992.
- JIANG, J. Volatile Metabolites Produced by *Kluyveromyces lactis* and Their Changes During Fermentation. **Process Biochemistry**, v.30, n.7, p.635-640, 1995.
- KAMINISKI, E.; STAWICKI, S. & WASOWICZ, E. Volatile Flavors Compounds Produced by Molds of *Aspergillus*, *Penicillun* and Fungi imperfect. **Applied and Environmental Microbiology**, v.27, n.6, p.1001-1004, 1974.
- KEMPLER, G.M. Production of Flavor Compounds by Microorganisms **Advances in Applied Microbiology**, v.29, p.29-51, 1983.
- KRINGS, V. & BERGER R.G. Biotechnological Production of Flavours and Fragrances. **Appl. Microbiol. Biotechnology**, v.49, p.1-8, 1998.
- LANZA, E.; KO, K.H. & PALMER, J.K. Aroma Production by Cultures of *Ceratocystis moniliformis*. **Agric. Food Chem.**, v.24, n.6, p.1247-1250, 1976.
- LATRASSE, A. & DAMERON, P. An Ester Producing Microorganism: *Geotrichium candidum* (STARON). Bioflavour'87. Analysis-Biochemistry-Biotechnology. Editor Peter Schreier, p.465-471, 1988.

- LUGAY, J.C. Biogenesis of Aromas . An Industrial Perspective. In: Biogenesis of Aromas (T.H. Parliment and Croteau,eds). Washington, D.C., ACS Symposium Series 317, p.11-17,1986.
- MARQUES, D.B. Produção e Caracterização de Aroma de Fruta por *Pichia membranefaciens*. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 1998.
- MOSANDL, A.; HENSINGER, G. & GESSNOR, M. Analytical and Sensory Differentiation of 1-octen-3-ol enantiomers. **J. Agric.Food Chem.**, v.34, p.119-121,1986.
- OLIVEIRA, J.G. Produção Biotecnológica de Metilcetonas por Linhagem de *Aspergillus* sp. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 1998.
- OMELIANSKI, V.L., Aroma Producing microorganisms **J. Bacteriol.**, v.8, p.393,1923.
- PARK, Y.K.; ZENIN,C.T.; UEDA,S.MARTINS,C.O. & NETO, J.P.M. Microflora in Beijiu and Their Biochemical Characteristics. **J. Ferment. Technol.** V.60,n.1, p. 1-4, 1982.
- PASTORE,G.M.; PARK, Y.K.& MIN,D.B. Production of Fruity Aroma by *Neurospora* from Beijiu. **Mycol. Res.** v.98, p. 1300-1302, 1994.
- PASTORE,G.M.; SATO, H.H.; YANG, T.S.; PARK, Y.K. & MIN,D.B. Production of Fruity Aroma by Newly Isolated Yeast. **Biotechnology Letters**, v.16, n.4, p. 389-392,1994.
- PEREIRA,J.N. & MORGAN,M.E. Identity of Esters Produced in Milk Cultures of *Pseudomonas fragi*. **J. Dairy Sci.** v.41, p.1201-1205,1958.
- PYSALO, H. Identification of Volatile Compounds in Seven Edible Fresh Mushrooms. **Acta Chem.Scand.** v.20, p.234-244,1976.
- RAYMOND. Y.; MORIN.A.; CORMIER, F.; CHAMPAGNE,C.P. & DUBEAU,H. Physical Factors Influencing The Production of Strawberry Aroma by *Pseudomonas fragi* Grown in Skim Milk. **Biotechnology Letters**, v.12, n.12, p. 931-936,1990.
- RAYMOND. Y.; MORIN.A.; CHAMPAGNE,C.P & CORMIER, F. Enhancement of Fruit Aroma Production of *Pseudomonas fragi* Grown on Skim Milk , Whey and whey Permeate Supplemented With C₃ - C₇ Fatty Acids. **Applied Microbiology Biotechnol.**, v.34, p.524-527,1991.

- REDDY, M.C.; BILLS, D.D.; LINDSAY, R.C.; LIBBEY, L.M.; MILLER, A. & MORGAN, M.E. Ester Production by *Pseudomonas fragi*. Identification and Quantification of Some Esters Produced in Milk Cultures. **Journal of Dairy Science**, v.51, n.5, p. 656-659, 1969.
- ROWAN, D.D.; LANE, H. P.; ALLEN, J. M. ;FIELDER & MARTIN, B.H Biosynthesis of 2-Methylbutyl, 2-Methyl-2-butenyl and 2-Methylbutanoate Esters in Red Delicious and Granny Smith Apples Using Deuterium-Labeled Substrates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, n.10, p.3276-3285, 1996.
- SARIASLANI, F.S. & ROSAZZA, J.P.N. Biocatalysis in Natural Products Chemistry. **Enzyme Microbiology and Technology**, v.6, p.242-253, 1984.
- SARRIS, J. & LATRASSE, A. Production of Odoriferous γ Lactones by *Fusarium poae*. **Agricultural Biological Chemistry**, v.49, n.11, p.3227-3230, 1985.
- SCHARPF, Jr. L.G.; SEITZ, E.W.; MORRIS, J.A. & FARBOOD, M.I. Generation of Flavor and Odor Compounds through Fermentation Processes. In : Biogenesis of Aromas (T.H. Parliment and Croteau, eds.) Washington, D.C., ACS Symposium Series. 317, p.323-346, 1986.
- SCHINDLER, J. & SCHMID, R.D. Fragrance or Aroma Chemicals -Microbial Synthesis and Enzymatic Transformation - A Review. **Process Biochemistry**, september/october, p.2-8, 1982.
- SHEAR, C. L. & DODGE, B.O. Life Histories and Heterotaxism of The Red Bread Mold Fungi of The *Monilia sitophila* group. **Journal of Agriculture Research**, v.24, n.11, p. 1019-1042, 1927.
- TAHARA, S.; FUJIWARA, K. & MIZUTANI, J. Neutral Constituents of Volatiles in Cultured Broth of *Sporobolomyces odorus*. **Agricultural Biological Chemistry**, v.37, n.12, p.2855-2861, 1973.
- THOM and RAPER, **Manual of The Aspergilli** , p.39, 1945.
- TYRREL, M. Advances in Natural Flavors and Materials. **Perfumer & Flavorist**, v. 20, p.13-21, 1995.
- TRESSL, R. & ALBRECHT, W. Biogenesis of Aroma Compounds through Acyl Pathways, In : Biogenesis of Aromas. ACS Symposium Series 317, p.114-133, 1986.
- VAN DEN DOOL H. & KRATZ P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal Chromatogr.** , v. 11, p. 463-471, 1963

- VOGEL,H.J. A Convenient Growth Medium For *Neurospora*. **Microbiol. Gen. Bull.** V.13, p.42, 1956.
- WELSH,F.W. Overview of Bioprocess Flavor and Fragrance Production. In: Bioprocess Production of Flavor, Fragrance and Color Ingredients, edited by Alan Gabelman,1995.
- YAMAUCHI, H.; HASUO, T.; AMACHI, T.; AKITA, O.; HARA,S. & YOSHIZAWA,K. Cell-free Synthesis of Ethyl Hexanoate by Extract from *Neurospora* sp, Containing a Novel Acyl Coenzyme A : Alcohol Acyltransferase. **Agric. Biol. Chem.** v. 53, n.3, p. 821-825, 1989.
- YAMAUCHI, H.; HASUO, T.; AMACHI, T.; AKITA, O.; HARA,S. & YOSHIZAWA,K. Purification and Characterization of Acyl CoA: Alcohol Acyltransferase of *Neurospora* sp . **Agric. Biol. Chem.** v.53,n.6 p.1551-1556, 1989.
- YAMAUCHI, H.; OBATA,T.; AMACHI, T. & HARA,S. Production of Characteristics Odors by *Neurospora* . **Agric. Biol. Chem**, v.55, n.12, p. 3115-3116, 1991.
- YOSHIZAWA,K.; YAMAUCHI, H; HASUO, T.; AKITA, O & HARA,S. Production of a Fruity Odor by *Neurospora* sp. **Agric. Biol. Chem**, v.52, n.8 p.2129-2139, 1988.
- YAMAUCHI, H.; OBATA,T.; AMACHI, T. & HARA,S. Aroma Production by *Neurospora* sp affected by light irradiation. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.60, n.11 p.1902-1904, 1996.

ANEXOS

ANEXO 1 – Ilustração dos cromatogramas de quantificação dos compostos produzidos pelas linhagens de *Neurospora* sp.

Anexo 1.1- Cromatograma de quantificação do composto acetato de etila em meio Corn Steep Liquor com 24 horas de fermentação, a 30°C, produzido pela *Neurospora* sp1

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\NEUROSP\AROMA100.D

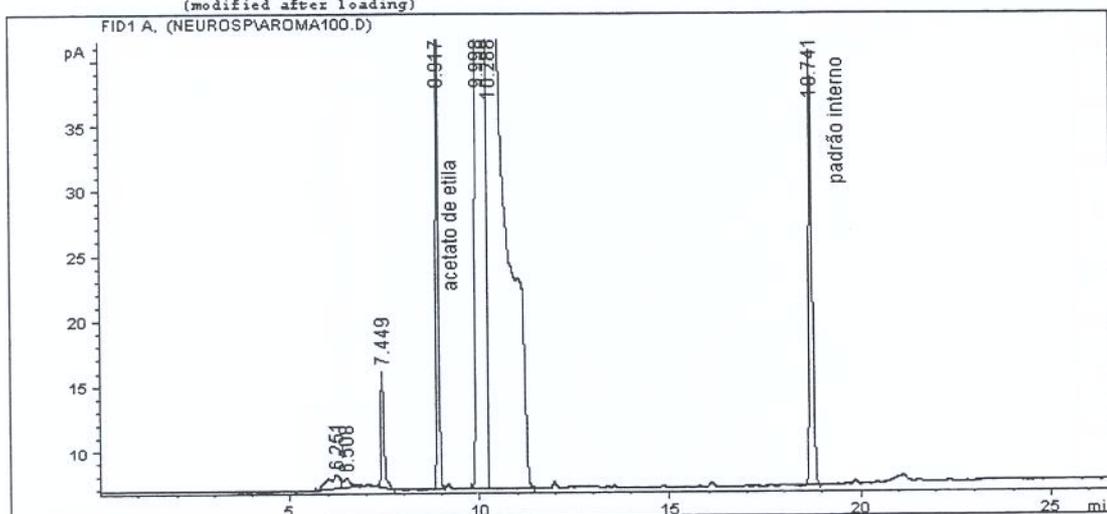
Sample Name: neurosp spl

Meio Cozn Steep Liquor sem glicose 24 horas / 30° C / 2
00rpm (1)

```

=====
Injection Date : 16/09/99 15:39:13
Sample Name    : neurosp spl
Acq. Operator  : bere
Vial           : 1
Inj            : 1
Inj Volume    : Manually

Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\NEUROSP.M
Last changed   : 16/09/1999 13:00:57 by bere
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\NEUROSP.M
Last changed   : 20/06/2000 08:52:24 by Joaquim
                (modified after loading)
    
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
    
```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	6.251	PV	0.3178	25.45087	1.06885	0.71376
2	6.508	VE	0.1782	9.12784	7.18398e-1	0.25599
3	7.449	EP	0.0853	48.68266	8.97960	1.36529
4	8.917	EE	0.0709	161.99243	35.75019	4.54204
5	9.998	EV	0.2032	1338.81555	88.16824	37.54676
6	10.288	VE	0.3564	1772.60608	63.36536	49.71232
7	18.741	EE	0.0984	209.05270	33.69706	5.86283

Totals : 3565.72814 231.74769

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Anexo 1.2- Cromatograma de quantificação do composto 1-octen-3-ol em meio Yeast Malt Broth em 48 hs de fermentação, 30°C, produzido pela *Neurospora* sp5

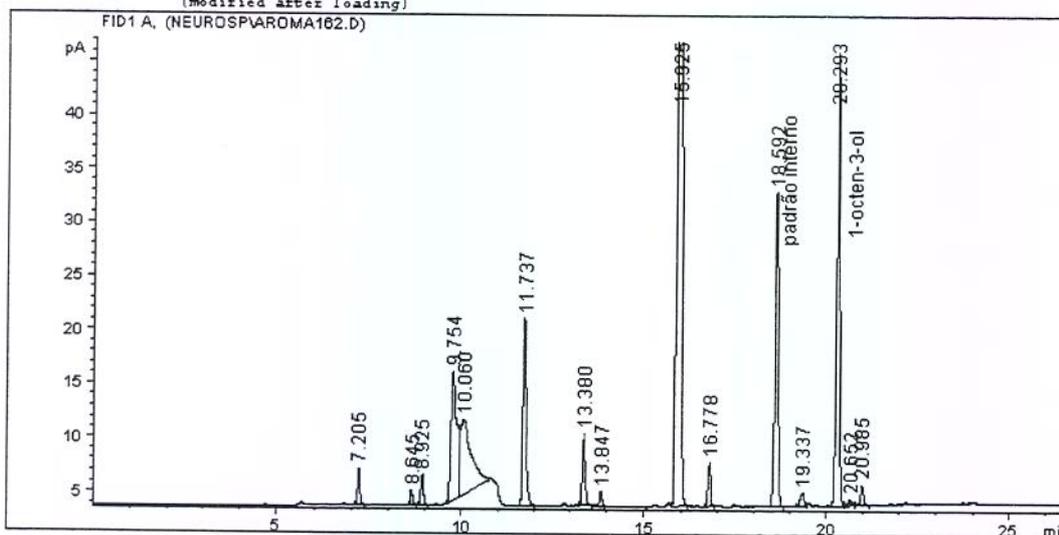
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\NEUROSP\AROMA162.D

Sample Name: neurospora sp 5

Meio Yeast Malt Broth 48hs/30°C/200rpm
Quantidade de amostra : 0,5ml

```

=====
Injection Date : 15/10/99 15:39:42
Sample Name   : neurospora sp 5          Vial : 1
Acq. Operator : Berenice                 Inj  : 1
                                           Inj Volume : Manually
Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\NEUROSP.M
Last changed  : 15/10/1999 14:53:58 by Berenice
               (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\NEUROSP.M
Last changed  : 20/06/2000 08:52:24 by Joaquim
               (modified after loading)
    
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
    
```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	7.205	EE	0.0796	17.53293	3.43098	0.74620
2	8.645	PE	0.0755	6.77615	1.42543	0.28839
3	8.925	EE	0.0828	15.36791	2.85724	0.65406
4	9.754	PV	0.1605	135.67169	11.94384	5.77418
5	10.060	VE	0.2866	147.70184	6.93080	6.28618
6	11.737	EE	0.0925	105.25240	17.40897	4.47953
7	13.380	EE	0.0949	40.32158	6.63231	1.71608
8	13.847	EE	0.0650	5.80594	1.38161	0.24710
9	15.925	VE	0.0935	1294.84692	224.27209	59.36456
10	16.778	EP	0.0851	22.20263	4.10498	0.94494
11	18.592	EE	0.0956	179.29327	29.21048	7.63071
12	19.337	PV	0.1097	8.85427	1.17797	0.37684
13	20.293	EE	0.0949	254.27254	41.84567	10.82182
14	20.652	EV	0.1225	3.82072	4.71447e-1	0.16261
15	20.985	VE	0.0996	11.90812	1.88718	0.50681

Totals : 2249.62891 364.98099

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Anexo 1.3- Cromatograma de quantificação do composto hexanoato de etila em meio Vogel sacarose com 48 horas de fermentação ,a 30°C produzido pela *Neurospora* sp 5

Data File C:\NPCHEM\1\DATA\NEUROSP\AROMA168.D

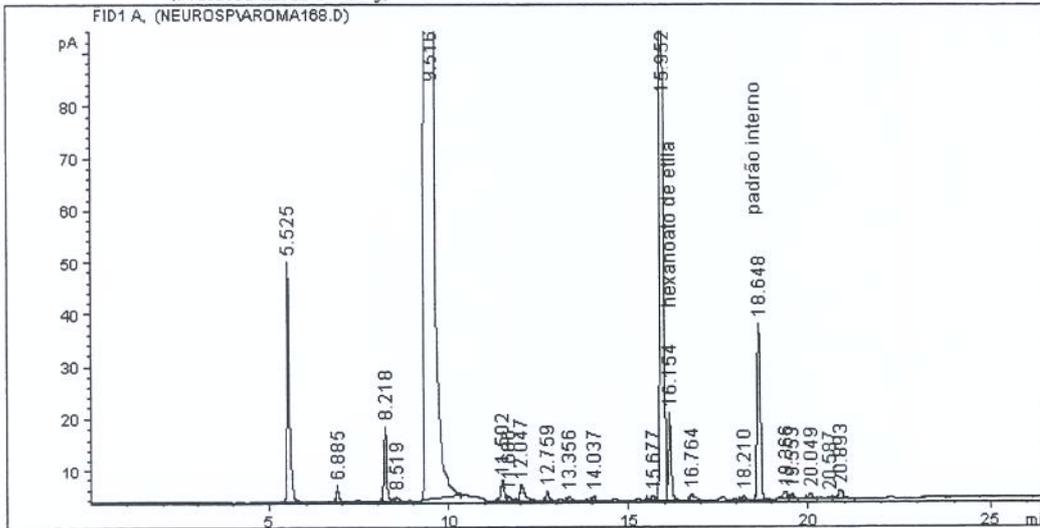
Sample Name: Neurospora sp5

Meio Vogel sacarose 30°C/200rpm/48hs
Quantidade de amostra : 0,5 ml

```

=====
Injection Date : 19/10/99 15:07:28
Sample Name    : Neurospora sp5          Uial : 1
Acq. Operator  : Berenice                Inj  : 1
                                           Inj Volume : Manually

Acq. Method    : C:\NPCHEM\1\METHODS\NEUROSP.M
Last changed   : 19/10/1999 14:28:37 by Berenice
                (modified after loading)
Analysis Method: C:\NPCHEM\1\METHODS\NEUROSP.M
Last changed   : 20/06/2000 08:52:24 by Joaquim
                (modified after loading)
    
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
    
```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	5.525	EE	0.0825	248.96921	46.44222	1.66517
2	6.885	PE	0.0771	14.76121	3.01788	0.09873
3	8.218	EE	0.0867	82.10326	14.79602	0.54914
4	8.519	EE	0.1072	6.48007	8.87558e-1	0.04334
5	9.516	PE	0.1494	1.29434e4	1355.73669	86.56895
6	11.502	EV	0.0984	25.82674	4.05113	0.17274
7	11.686	UP	0.1090	6.24209	8.77554e-1	0.04175
8	12.047	EE	0.1415	28.18489	3.05993	0.18851
9	12.759	PE	0.0772	8.34643	1.70228	0.05382
10	13.356	PE	0.1047	5.96465	8.83669e-1	0.03989
11	14.037	EE	0.0702	4.35903	9.73810e-1	0.02915
12	15.677	EV	0.1074	6.64882	9.30336e-1	0.04447
13	15.952	VU	0.0933	1204.54297	202.63723	8.05631
14	16.154	VE	0.0864	94.68056	17.15545	0.63325
15	16.764	EP	0.1091	9.01987	1.20854	0.06033
16	18.210	EP	0.0939	4.89151	8.16947e-1	0.03272
17	18.648	EE	0.0977	208.99734	34.01970	1.39783
18	19.366	EV	0.1204	11.03273	1.45595	0.07379
19	19.553	VP	0.0948	6.00127	1.01815	0.04014
20	20.049	EP	0.1105	8.78301	1.18502	0.05876
21	20.587	VU	0.1463	4.51961	4.17402e-1	0.03023
22	20.893	VE	0.1483	17.79081	1.78494	0.11899

Anexo1.4 – Cromatograma de quantificação do composto butirato de etila produzido por *Neurospora* sp1 em meio Frutose/Extrato de levedura, em 96 horas de fermentação/30°C

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\NEUROSP\AROMA215.D

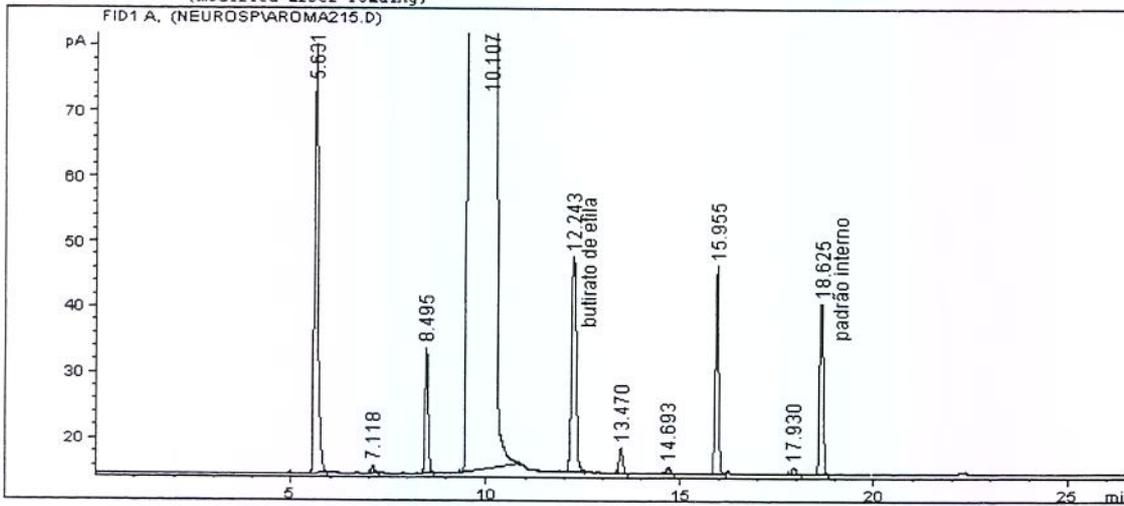
Sample Name: Neurospora sp1

Meio Frutose/Extrato de Levedura 96hs/30°C/200rpm
Quantidade de amostra - 0,5ml

```

=====
Injection Date : 04/11/99 15:13:21
Sample Name    : Neurospora sp1          Vial : 1
Acq. Operator  : Berenice                Inj  : 1
                                           Inj Volume : Manually

Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\NEUROSP.M
Last changed   : 04/11/1999 14:03:10 by Berenice
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\NEUROSP.M
Last changed   : 20/06/2000 08:52:24 by Joaquim
                (modified after loading)
    
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
    
```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	5.631	BE	0.0906	397.11285	65.59592	0.41183
2	7.118	PE	0.0827	5.54399	1.04751	0.00575
3	8.495	EP	0.0835	102.99637	18.92071	0.10681
4	10.107	PE	0.3078	9.52713e4	4030.04639	98.80162
5	12.243	BE	0.1223	258.00656	32.60653	0.26757
6	13.470	BE	0.0938	23.29315	3.89144	0.02416
7	14.693	PP	0.0955	6.66623	1.11903	0.00691
8	15.955	BE	0.0978	195.42766	31.74381	0.20267
9	17.930	BE	0.1090	7.76112	1.11730	0.00805
10	18.625	BE	0.0975	158.75220	25.91556	0.16463

Totals : 9.64269e4 4212.01421

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Anexo1.5- Cromatograma de quantificação do composto álcool isoamílico em meio Frutose/Extrato de levedura em 48 horas de fermentação/30°C por Neurospora sp5

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\NEUROSP\AROMA231.D

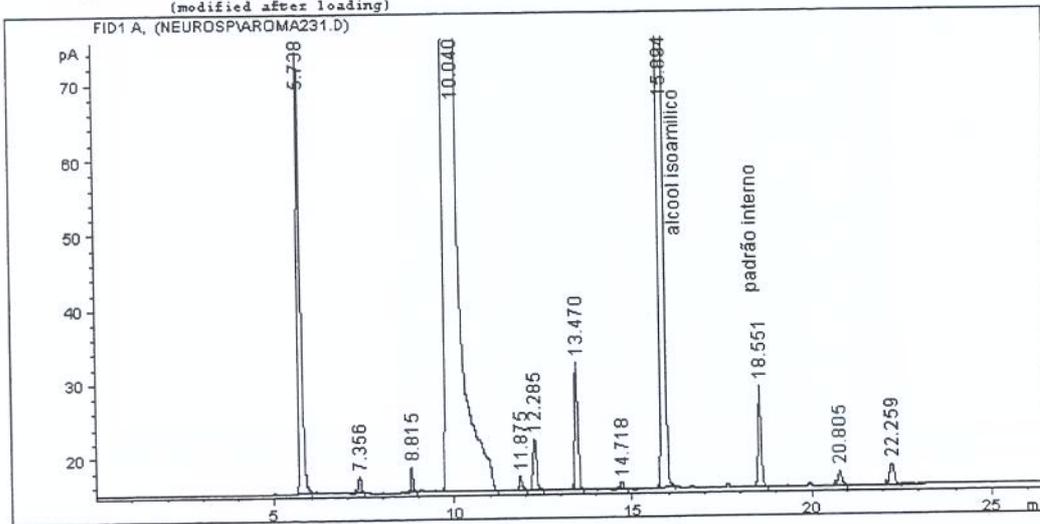
Sample Name: Neurospora sp5

Meio Frutose/Extrato de levedura
48hs/30C/200rpm

```

=====
Injection Date : 26/11/99 10:38:04          Vial : 1
Sample Name    : Neurospora sp5             Inj  : 1
Acq. Operator  : Berenice                   Inj Volume : Manually

Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\NEUROSP.M
Last changed   : 26/11/1999 10:18:37 by Berenice
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\NEUROSP.M
Last changed   : 20/06/2000 08:52:24 by Joaquim
                (modified after loading)
    
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
    
```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	5.738	EE	0.0807	318.12204	59.20877	1.26330
2	7.356	EP	0.0790	11.52117	2.27956	0.04575
3	8.815	EE	0.0722	16.26728	3.50284	0.06460
4	10.040	EE	0.1784	2.22512e4	1902.88721	88.36214
5	11.875	EP	0.0850	11.66265	2.09252	0.04621
6	12.285	EE	0.1032	47.17628	7.13136	0.18734
7	13.470	EE	0.0908	99.60845	17.40486	0.39556
8	14.718	EE	0.0969	6.45606	1.03355	0.02564
9	15.894	PE	0.0939	2295.34302	383.28271	9.11507
10	18.551	EE	0.0945	83.94763	13.90134	0.33237
11	20.805	EP	0.1208	15.93977	2.09417	0.06230
12	22.259	EP	0.1254	24.58255	2.88631	0.09762

Totals : 2.51818e4 2397.70521

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Anexo1.6- Cromatograma de quantificação dos compostos produzidos por Neurospora sp1 em meio Frutose/Extrato de Levedura com 48 horas de fermentação a 30°C

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\NEUROSP\AROMA213.D

Sample Name: Neurospora sp1

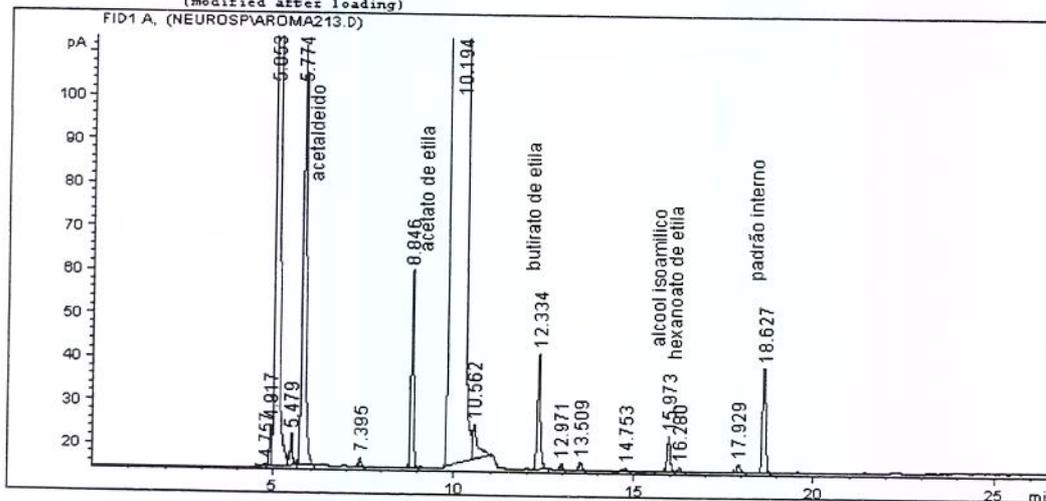
Meio Frutose/Extrato de Levedura 48hs/30°C/200xpm
Quantidade de amostra - 0,5ml

```

=====
Injection Date : 04/11/99 11:59:28
Sample Name : Neurospora sp1
Acq. Operator : Berenice
Vial : 1
Inj : 1
Inj Volume : Manually

Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\NEUROSP.M
Last changed : 04/11/1999 11:35:10 by Berenice
(modified after loading)

Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\NEUROSP.M
Last changed : 20/06/2000 08:52:24 by Joaquim
(modified after loading)
    
```



Area Percent Report

```

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
    
```

Signal 1: FID1 A.

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	4.757	PV	0.0971	4.11426	5.91954e-1	0.00800
2	4.917	VV	0.0504	32.12001	9.74719	0.06242
3	5.053	VV	0.0598	4554.36523	1213.89819	8.85135
4	5.479	VV	0.0741	36.57325	7.34995	0.07108
5	5.774	VB	0.0915	589.93219	96.28004	1.14652
6	7.395	EP	0.0819	10.72090	2.09055	0.02086
7	8.846	EP	0.0753	215.00314	45.35450	0.41786
8	10.194	PV	0.2211	4.55227e4	2931.84424	88.47270
9	10.562	VB	0.1353	78.49756	7.94086	0.15256
10	12.334	EB	0.1003	173.21793	26.47967	0.33665
11	12.971	PP	0.0666	5.84478	1.40224	0.01136
12	13.509	EP	0.0882	10.52366	1.85423	0.02045
13	14.753	PV	0.1002	5.21325	8.13558e-1	0.01033
14	15.973	EB	0.0967	52.14059	8.37277	0.10133
15	16.280	EP	0.0814	5.50221	1.08141	0.01069
16	17.929	EB	0.1070	11.91254	1.75926	0.02315
17	18.627	EB	0.0953	145.45912	23.80231	0.28270

Totals : 5.14529e4 4380.66294

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

ANEXO 2 – Equipamentos utilizados para extração, identificação e quantificação dos compostos voláteis



Anexo 3 - Fotografia das linhagens de *Neurospora* sp selecionadas para o estudo (meio Sabouraud)

