

Aplicação de β -glicosidases produzidas por *Aureobasidium pullulans* e *Thermoascus aurantiacus* na produção de aguardente de cana.

Thaise M. Tobal (PG)¹, Rodrigo S. R. Leite (PQ)², Roberto da Silva (PQ)¹, Eleni Gomes (PQ)¹,

João Bosco Faria (PQ)³, Maurício Boscolo (PQ)^{1*}

¹Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto (IBILCE - UNESP). Departamento de Química e Ciências Ambientais. R. Cristóvão Colombo, 2265. S. J. Rio Preto, SP, CEP 15054-000. boscolo@ibilce.unesp.br. ²Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais. (UFGD, Dourados, MS). ³Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP).

Palavras Chave: Cachaça, Aguardente de cana, Terpenos, Hidrólise enzimática, β -Glicosidases.

Introdução

Durante a fermentação alcoólica da cachaça, além do álcool etílico são produzidos componentes secundários como aldeídos, álcoois, ésteres, furanos, ácidos orgânicos, dentre outros que somados representam menos de 1% da composição da bebida, mas são eles os responsáveis pelas características sensoriais deste produto. Um bom balanço entre os compostos minoritários é essencial para a obtenção de uma bebida de alta qualidade. A presença de mono-terpenos nos destilados contribui para o atributo sensorial floral do aroma, o qual é muito apreciado. Os terpenos são constituintes secundários de vegetais e normalmente são encontrados na forma glicosilada (não volátil). Não há consenso na literatura sobre a capacidade da *S. cerevisiae* de hidrolisar glicosídeos terpênicos durante o processo fermentativo. A desglicosilação dos terpenos pode ser alcançada mais eficientemente mediante o emprego de enzimas β -glicosidases exógenas ao processo fermentativo. Como forma de aumentar o teor de terpenos desglicosilados na cachaça, foi avaliado o uso de extratos enzimáticos brutos no tratamento do caldo de cana. Duas espécies de microorganismos termofílicos não-*Saccharomices* bons produtores de β -glicosidases foram selecionados, sendo eles o fungo termofílico filamentoso *T. aurantiacus* e a levedura *A. pullulans*. Os micro-organismos foram cultivados por fermentação em estado sólido (FES) usando farelo de trigo como fonte de carbono. A extração do complexo enzimático bruto foi realizada por adição de água destilada (8 ml por grama de material fermentado) e centrifugado a 10000g, a 10°C, por 20 min. A atividade β -glicosidase dos complexos enzimáticos estudados foi determinada pela quantificação espectrofotométrica ($\lambda=410\text{nm}$) do nitrofenol liberado pela enzima a partir de 4-nitrofenol- β -D-glicopiranosídeo usado como substrato. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como sendo a liberação de um μmol de 4-nitrofenol/minuto/mL de solução de extrato enzimático. O processo hidrolítico foi executado empregando planejamento fatorial para se conhecer a influência de parâmetros como pH, temperatura,

tempo de hidrólise e condição de agitação, cujos limites estão descritos acima. A matriz de experimentos será da ordem 2^4 , onde a base se refere aos dois limites (superior e inferior) e o expoente é o número de variáveis estudadas. Os complexos enzimáticos foram adicionados ao caldo de quatro tipos de cana, filtrado e padronizado em 15% de açúcar com água destilada. Para a determinação das condições ótimas de ação hidrolítica, os sistemas foram mantidos em agitador orbital climatizado em diferentes condições de pH (3,5 – 5,5); temperatura (30 – 50°C); tempo de hidrólise (1 – 6 h); e agitação (estática e a 50 rpm). Após o fim de cada experimento, os vials foram congelados a -20°C. Também foi variada a atividade β -glicosidase nos tratamentos (1 e 5 unidades). A análise de terpenos livres foi realizada por HS-SPME-GC-MS empregando uma micro-fibra de extração (Supelco Carbowax-DVB). Padrões de terpienol, linalol, citrionelol, nerol e geraniol (todos da Sigma-Aldrich) foram usados na análise cromatográfica.

Resultados e Discussão

A atividade catalítica β -glicosidase sobre os precursores glicosídicos do caldo de cana foi comprovada. Nos controles não se detectou a presença de nenhum dos terpenos alvos até o limite de detecção de 10 $\mu\text{g/L}$, enquanto que nos caldos tratados, pôde-se confirmar a presença de citrionelol, nerol e geraniol, porém abaixo do limite de quantificação de 50 $\mu\text{g/L}$. Terpienol e linalol não foram detectados. Estes resultados evidenciaram que o uso de β -glicosidases exógenas ao processo fermentativo é uma opção para o enriquecimento de terpenos na cachaça. Está-se executando experimentos de produção de aguardente em escala de laboratório usando alambique de cobre com a metodologia proposta para posterior análise sensorial e química dos destilados produzidos.

Agradecimento

Ao Prof. Douglas W. Franco, pelo uso do GC-MS.

MAICAS.; MATEO, Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: a review. Applied Microbiol Biotechnol., v. 67, p. 322-335, 2005.