

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
(ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIÊNCIA DE ALIMENTOS)

APLICAÇÃO DE β -GLICOSIDASES PRODUZIDAS PELOS MICRORGANISMOS
Aureobasidium pullulans E *Thermoascus aurantiacus* AO PROCESSO FERMENTATIVO
DA AGUARDENTE DE CANA COM FOCO NA PRODUÇÃO DE TERPENOS.

THAISE MARIÁ TOBAL



ARARAQUARA-SP
2011

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
(ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIÊNCIA DE ALIMENTOS)

APLICAÇÃO DE β -GLICOSIDASES PRODUZIDAS PELOS MICRORGANISMOS
Aureobasidium pullulans E *Thermoascus aurantiacus* AO PROCESSO FERMENTATIVO
DA AGUARDENTE DE CANA COM FOCO NA PRODUÇÃO DE TERPENOS.

THAISE MARIÁ TOBAL

Orientador: Prof. Dr. João Bosco Faria

Coorientador: Prof. Dr. Maurício Boscolo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, como requisito para obtenção do título de Doutor, área de concentração Ciências de Alimentos.

ARARAQUARA-SP
2011

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Tobal, Thaise Mariá

T628a

Aplicação de β -Glicosidases produzidas pelos microrganismos *Aureobasidium pullulans* e *Thermoascus aurantiacus* ao processo fermentativo da aguardente de cana com foco na produção de terpenos / Thaise Mariá Tobal. -- Araraquara, 2011. 82 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição.

Orientador: João Bosco Faria
Coorientador: Maurício Boscolo

1. Aguardente de cana. 2. β -Glicosidases. 3. *Thermoascus aurantiacus*. 4. *Aureobasidium pullulans*. 5. Terpenos. I. Faria, João Bosco, orient. II. Boscolo, Maurício, coorient. III. Título.

CAPES: 50700006

THAISE MARIÁ TOBAL

APLICAÇÃO DE β -GLICOSIDASES PRODUZIDAS PELOS MICRORGANISMOS
Aureobasidium pullulans E *Thermoascus aurantiacus* AO PROCESSO FERMENTATIVO
DA AGUARDENTE DE CANA COM FOCO NA PRODUÇÃO DE TERPENOS.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Maurício Boscolo (co-orientador)

Prof. Dr. Douglas Wagner Franco (membro)

Prof. Dr. Roberto da Silva (membro)

Prof. Dr. Fernando Valadares Novaes (membro)

Prof. Dr. Antônio José Goulart (membro)

Araraquara, _____ de _____ de 2011.

DEDICO:

Aos meus pais Joel e Maria Helena
pelo amor, exemplo, incentivo e
dedicação durante toda a minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelos sonhos e por me proporcionar a concretização destes.

Ao Professor Dr. Maurício Boscolo pela preciosa orientação, dedicação e paciência, e por todos os ensinamentos e desafios propostos.

Ao Professor Dr. João Bosco por todo o apoio essencial para que este trabalho fosse realizado.

Aos Professores Dr. Rodrigo Leite e Dr^a. Ana Carolina Silva por toda contribuição, esclarecimento de dúvidas e sugestões durante o trabalho.

Aos Professores Dr. Roberto da Silva, Dr^a. Eleni Gomes, Dr. Douglas Franco, Dr. Daniel Cardoso, Dr^a. Célia Franco e Dr. Paolo Di Mascio pelo precioso auxílio.

Aos meus pais por todo o apoio e incentivo, e por sempre estarem ao meu lado. Mãe... você sempre me ajuda em tudo!

Ao meu noivo Caio pelo companheirismo, paciência e por literalmente ter me ajudado neste trabalho.

Aos meus irmãos Henrique e Guilherme, à minha cunhada Fabíola e minha sobrinha Júlia, pelos momentos felizes que passamos juntos, e porque sei que torcem por mim.

Aos companheiros e técnicos dos laboratórios por onde passei, pelos agradáveis momentos, ajuda e incentivo: Amanda, Felipe, Janaína, Marcos, Tiago, Ticiane e Vitor do Laboratório de Sucroquímica e Química Analítica do IBILCE; Andréia, Carol, Ellen, Fabi, Gisele, Josy, Márcia, Milla, e Thiago do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada do IBILCE; Alana e Raquel do laboratório de Cereais do IBILCE; Alexandre, André, Carlos, Felipe, Silmara e Wendel do Laboratório de Desenvolvimento da Química da Aguardente do IQSC/USP; e Fernanda Prado do Laboratório do Departamento de Bioquímica da USP de São Paulo.

As funcionárias da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Cláudia, Joyce, Laura, Márcia e Sônia, pela atenção e eficiência.

À Capes, pelo suporte financeiro.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores médios da atividade de β -glicosidase (U/mL) do extrato bruto e concentrado do <i>T. aurantiacus</i>	46
Tabela 2: Valores médios da atividade de β -glicosidase (U/mL) do extrato bruto e concentrado do <i>A. pullulans</i>	46
Tabela 3: Teor de glicose e frutose (μ g/mL) do caldo de diferentes variedades de cana.....	48
Tabela 4: Massas das possíveis combinações dos terpenóides estudados com diferentes açúcares formadores de glicosídeos terpênicos.....	49
Tabela 5: Valores médios de terpenos (μ g/L) encontrados nas amostras de caldo de cana de açúcar tratados com extrato bruto de β -glicosidases do <i>T. aurantiacus</i>	52
Tabela 6: Valores médios de terpenos (μ g/L) encontrados nas amostras de caldo de cana de açúcar tratados com extrato bruto de β -glicosidases do <i>A. pullulans</i>	53
Tabela 7: Valores médios de terpenos (μ g/L) encontrados nas diferentes frações da cachaça controle.....	56
Tabela 8: Valores médios de terpenos (μ g/L) encontrados nas diferentes frações da cachaça tratada.....	56
Tabela 9: Concentração de terpenos livres (μ g/L) presentes na cachaça controle e na tratada com extrato bruto de β -glicosidases do <i>T. aruantiacus</i>	57
Tabela 10: Resultado das análises físico-químicas das amostras de cachaça.....	58
Tabela 11: Resultados (em mg/100 mL de álcool anidro) das análises dos teores dos compostos orgânicos nas amostras de cachaça	59
Tabela 12: Parte da tabela para análise do resultado do teste de comparação pareada monocaudal	60
Tabela 13: Valores mínimos e máximos obtidos para as amostras de cachaça no teste de aceitação	61
Tabela 14: Médias de aceitação para cada atributo das duas amostras de cachaça	61
Tabela 15: Dados extraídos da tabela usada para análise dos resultados do teste pareado-preferência	63

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Exemplos de monoterpenos comumente encontrados em bebidas alcoólicas.....19
- Figura 2:** Exemplo de um glicosídeo terpênico (neril- β -D-glicosídeo) e dos produtos de sua hidrólise (glicose e nerol) por ação de uma β -glicosidase21
- Figura 3:** Ação hidrolítica de complexos enzimáticos na produção de terpenos voláteis22
- Figura 4:** Ficha de avaliação utilizada no teste de comparação pareada42
- Figura 5:** Ficha de avaliação utilizada nos testes de aceitação e preferência43
- Figura 6:** Cromatograma do caldo de quatro variedades de cana, obtido na análise de frutose por HPAEC-PAD. 1. RB86-7515; 2. IAC87-3396; 3. RB83-5486; 4. SP79-1011.....47
- Figura 7:** Cromatograma do caldo de quatro variedades de cana, obtido na análise de glicose por HPAEC-PAD. 1. RB86-7515; 2. IAC87-3396; 3. RB83-5486; 4. SP79-1011.....47
- Figura 8:** Espectro de massas do caldo da variedade SP79-1011, utilizando como fonte de ionização ESI+.....50
- Figura 9:** Espectro de massas do caldo da variedade SP79-1011, utilizando como fonte de ionização APCI+.....51
- Figura 10:** Cromatograma da cachaça controle e da cachaça tratada com o extrato enzimático bruto do *T. aurantiacus*, obtido por GC-MS. 1. Linalol; 2. Terpienol; 3. Nerol; 4. Geraniol.....55
- Figura 11:** Distribuição dos provadores (%) segundo escala hedônica estruturada de nove pontos para as duas amostras de cachaça.....62

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. AGUARDENTE DE CANA	15
2.2. TERPENOS	17
2.3. β -GLICOSIDASES	20
2.4. PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)	26
2.5. ANÁLISE SENSORIAL	27
3. OBJETIVOS	30
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 MATERIAL	31
4.2 MÉTODOS	31
4.2.1 Microrganismos, produção da enzima e inóculo	31
4.2.2 Extração da enzima e determinação da atividade de β -glicosidase	32
4.2.3 Concentração do extrato bruto	33
4.2.4 Tratamento enzimático do caldo de cana-de-açúcar	33
4.2.5 Caracterização química do caldo de cana	34
4.2.5.1 Determinação de glicose e frutose.....	34
4.2.5.2 Identificação e quantificação de terpenos livres	35
4.2.5.3 Análise dos glicosídeos terpênicos do caldo de cana	36
4.2.5.3.1. Extração dos glicosídeos terpênicos	36
4.2.5.3.2. Análise dos glicosídeos terpênicos por espectrometria de massas (MS)	37
4.2.6 Fermentação alcoólica e destilação	37
4.2.7 Caracterização cromatográfica dos destilados produzidos	38
4.2.8 Caracterização físico-química das aguardentes de cana	39
4.2.8.1 Determinação do teor alcoólico	39
4.2.8.2 Acidez total	39
4.2.8.3 Determinação de compostos orgânicos	39
4.2.9 Análise sensorial	40
4.2.9.1 Descrição dos critérios para seleção dos indivíduos	40

4.2.9.2	Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa	41
4.2.9.3	Método discriminativo	41
4.2.9.4	Métodos afetivos	42
4.2.9.5	Análise estatística	44
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1.	ATIVIDADE β -GLICOSIDASE	45
5.1.1	Estabilidade do extrato bruto e concentrado	45
5.2	DETERMINAÇÃO DE GLICOSE E FRUTOSE NO CALDO DE CANA	46
5.3	ANÁLISE DOS GLICOSÍDEOS TERPÊNICOS DO CALDO DE CANA POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	48
5.4	APLICAÇÃO DE β -GLICOSIDASES NO CALDO DE CANA	52
5.5	APLICAÇÕES DE β -GLICOSIDASES NA PRODUÇÃO DA CACHAÇA	54
5.5.1	Análise físico-química das cachaças	58
5.6	ANÁLISE SENSORIAL	59
5.6.1	Teste discriminativo	59
5.6.2	Teste de aceitação	60
5.6.3	Teste de preferência	63
6.	CONCLUSÕES	64
	REFERÊNCIAS	66
	ANEXO 1	78
	ANEXO 2	79

Capítulos

Capítulo 1

Aplicação de β -glicosidases produzidas pelos microrganismos *Aureobasidium pullulans* e *Thermoascus aurantiacus* ao processo fermentativo da aguardente de cana com foco na produção de terpenos.

RESUMO

Este estudo teve como objetivo aplicar β -glicosidases produzidas por microrganismos taxonomicamente distantes do gênero *Saccharomyces* na produção de aguardente de cana, visando uma maior liberação de compostos flavorizantes, em especial os monoterpenos para a obtenção de aguardentes com atributo sensorial floral mais intenso. Testes preliminares foram realizados adicionando-se extrato bruto de β -glicosidases do *Aureobasidium pullulans* ER-16 e do *Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756 no caldo de quatro variedades de cana-de-açúcar, com pH 4.5 e diferentes condições de temperatura, agitação e tempo de hidrólise. O complexo enzimático produzido pelo microrganismo *T. aurantiacus* foi adicionado anteriormente à inoculação do caldo de cana com a *Saccharomyces cerevisiae*, e a fermentação padrão com *S. cerevisiae* foi adotada como referência. A determinação dos efeitos das β -glicosidases na desglicosilação de terpenos foi avaliada utilizando um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS), com injeção da fase vapor do mosto e dos produtos de destilação no modo *head-space* com micro extração em fase sólida (HS-SPME), além da aplicação de testes de análise sensorial. Nenhum composto terpênico foi encontrado nos caldos originais, entretanto citronelol, nerol e geraniol foram encontrados nos caldos de cana tratados com β -glicosidases, na faixa de microgramas por litro, exceto para variedade IAC87-3396. Temperatura, tempo de hidrólise e agitação não afetou os valores encontrados, entretanto uma maior eficiência da atividade hidrolítica de β -glicosidases do *T. aurantiacus* foi encontrada. Não foi observada a presença de linalol e nerol na cachaça controle até o limite de detecção de 5 $\mu\text{g/L}$, entretanto a presença de linalol e nerol foi confirmada na cachaça tratada. A concentração de terpienol e geraniol aumentou significativamente na cachaça tratada com β -glicosidases, que apresentou um aroma e sabor floral mais intenso e uma maior aceitação com relação ao aroma, sabor e impressão global, tendo sido preferida.

Palavras-chaves: aguardente de cana, β -glicosidases, *T. aurantiacus*, *A. pullulans*, terpenos.

ABSTRACT

This research aims to apply β -glucosidase produced by microorganisms taxonomically distant from the genus *Saccharomyces* to produce Brazilian sugar cane spirit, seeking a greater release of flavor compounds, especially monoterpenes to brandies with obtaining sensory attribute floral more intense. The enzymatic complex by *Aureobasidium pullulans* ER-16 and *Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756 were added to the juices from four sugar cane varieties, with pH 4.5 and under different conditions of temperature, agitation and hydrolysis time. The enzyme complex produced by microorganism *Thermoascus aurantiacus*, was added before the inoculation of sugarcane juice with *Saccharomyces cerevisiae* and the fermentation pattern of *S. cerevisiae* was used as a reference. The determination of the effects of the addition of β -glucosidases in the deglycosylation of terpenes was evaluated by gas chromatography with mass spectrometry (GC-MS), with injection of the vapor of the distillates in order to head-space micro-phase extraction solid (HS-SPME), and sensory evaluation. No terpenic compounds were found in the original juices, but citronellol, nerol and geraniol were found in the treated sugar cane juices in the range of micrograms per liter, except for variety IAC87-3396. Temperature, hydrolysis time and agitation did not show to be significant parameters in this process, however a greater efficiency of the hydrolytic activity of β -glucosidases from the *T. aurantiacus* was found. Linalol and nerol weren't detected in the control cachaça at LOD of 5 $\mu\text{g/L}$, whereas in the enzymatic treated cachaça, the presence of linalol and nerol was confirmed. The concentrations of terpienol and geraniol were significantly increased in treated sugar cane juice spirit, which received higher scores in the sensory evaluation.

Keywords: Brazilian sugar cane spirit, β -glucosidases, *T. aurantiacus*, *A. pullulans*, terpenes.

1. INTRODUÇÃO

Impulsionados pela necessidade de conquista de novos mercados, produtores de cachaça têm buscado a melhoria da qualidade de seus produtos de forma a atender aos requisitos legais de composição química (BRASIL, 1997) e, principalmente da melhoria da qualidade sensorial da bebida, visto que as exportações ainda não ultrapassam 1% da produção total (PBDAC, 2007). A reduzida procura internacional por cachaça deve-se em parte às questões de marketing e também por suas características sensoriais.

Durante a fermentação alcoólica, além do álcool etílico, são produzidos congêneres secundários, como os aldeídos, metanol, alcoóis superiores, ésteres, lactonas, furanos, pirazinas, ácidos orgânicos, dentre outros que somados representam cerca de 1% da composição dos destilados alcoólicos. Um bom balanço entre os compostos voláteis é essencial para a obtenção de bebidas de alta qualidade sensorial, o que certamente refletirá na sua melhor aceitação e em maior valor agregado ao produto (DATO et al., 2005; NONATO et al., 2001).

A qualidade sensorial das bebidas destiladas em geral é sensivelmente melhorada durante o processo de envelhecimento em tonéis de madeira onde, além de se extrair substratos típicos da madeira empregada, ocorrem também reações de oxidação e de esterificação. A presença de diferentes ésteres na bebida contribui para a composição de um buquê frutado. Outro atributo sensorial muito desejado em vinhos e em destilados é o floral, que é oriundo da presença de compostos terpênicos (LEE, et al., 2000; PINHO et al., 2007).

Glicosídeos terpênicos intactos, assim como outras classes de glicosídeos, são inodoros e pouco contribuem para as propriedades sensoriais dos alimentos e

bebidas e as enzimas capazes de hidrolisá-los são classificadas como glicosidases (FERNÁNDEZ-GONZALÈZ et al., 2003; GUNATA et al., 1990).

Alguns microrganismos taxonomicamente distantes do gênero *Saccharomyces* apresentam-se como boas alternativas como fontes de β -glicosidases exógenas e estáveis em processos fermentativos, contribuindo significativamente para o atributo sensorial floral de vinhos. Deste modo, a presença de espécies não-*Saccharomyces* na fermentação alcoólica leva a um potencial aumento da liberação de agliconas terpênicas.

Não há estudos publicados sobre o uso de β -glicosidases exógenas ao sistema “caldo de cana - *S. cerevisiae*” durante o processo produtivo das diferentes aguardentes de cana, ou seja, cachaça e rum, e em vista da baixa atividade β -glicosidase descrita para a *S. cerevisiae* em condições normais de fermentação alcoólica, este estudo objetivou a utilização de enzimas microbianas no tratamento do caldo de cana antes da inoculação com *S. cerevisiae*, para aumentar o teor de terpenos livres, como uma alternativa para melhoria da qualidade sensorial da cachaça.

Trabalhos anteriores relatam produção de β -glicosidases com características muito interessantes pelos microrganismos *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* (HAYASHI et al., 1999; KALOGERIS et al., 2003; LEITE, 2007; SAHA, et al., 1994). Assim, a exploração desta nova forma de produção de aguardente de cana brasileira, ou simplesmente cachaça, além de inédita, é muito relevante para este setor da economia brasileira.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. AGUARDENTE DE CANA

Aguardente de cana é uma bebida com caracterização de identidade e qualidade específica, obtida pela destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar, com uma concentração alcoólica de 38-54% em volume a 20°C. Enquanto que a cachaça é a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com um teor alcoólico de 38-48% em volume a 20°C (BRASIL, 2005).

A composição química e os requisitos de qualidade para a aguardente de cana e cachaça no Brasil são fixados pela Instrução Normativa nº13, cujos coeficientes de congêneres, ou seja, a somatória dos componentes voláteis “não álcool” não poderá ser inferior a 200 mg/100 mL e não superior a 650 mg/100 mL de álcool anidro, observando os seguintes limites máximos dos componentes: 150 mg/100 mL de álcool anidro para acidez volátil (expressa em ácido acético), 200 mg/100 mL de álcool anidro de ésteres (expresso em acetato de etila), 30 mg/100 mL de álcool anidro de aldeídos totais (expresso em aldeído acético), 5 mg/100 mL de álcool anidro de furfural + hidroximetilfurfural e 360 mg de alcoóis superiores por 100 mL de álcool anidro (expressos pela soma dos alcoóis n-propílico, isobutílico e isoamílico) (BRASIL, 2005).

Além do etanol, água e compostos voláteis “não álcool”, a aguardente de cana contém pequenas quantidades de contaminantes orgânicos, como o metanol, carbamato de etila, álcool séc-butílico, álcool n-butílico e contaminantes

inorgânicos como o cobre, chumbo e arsênio, cujas concentrações máximas são fixadas pela Legislação (MAIA, 1994). A ocorrência de contaminantes orgânicos e inorgânicos na cachaça pode ter sua origem na cana-de-açúcar, utilizada como matéria-prima, ou em alguma das diferentes etapas do processo produtivo.

A produção da cachaça pode ser dividida principalmente nas etapas de obtenção e processamento da cana-de-açúcar, fermentação do mosto e destilação do vinho, além do envelhecimento, que é responsável por melhorias nas características organolépticas da cachaça, tornando seu sabor mais agradável e suave (CARDELLO e FARIA, 1998).

Durante a produção, após a extração do caldo e retirada das impurezas sólidas, geralmente é necessária a diluição deste para ajustar o teor de sólidos solúveis e a capacidade fermentativa da levedura, a fim de evitar futura inibição da levedura pelos altos níveis alcoólicos do final da fermentação. Para favorecer a fermentação alcoólica, deve-se corrigir os valores de pH do caldo para 4,5 pela adição de ácido sulfúrico, assim como acertar a temperatura para 30°C . Depois destes procedimentos, o caldo, então denominado mosto, está pronto para a fermentação (FARIA et al., 1995).

A fermentação alcoólica pela levedura inicia-se assim que o mosto de cana de açúcar é colocado em contato com a levedura. Após ser fermentado, o mosto é então chamado de vinho de cana-de-açúcar e tem uma composição variada de gases, sólidos e substâncias líquidas. O processo de destilação separa os compostos voláteis do vinho, e para obtenção da cachaça deve ser fracionado em três partes distintas: cabeça, primeira fração destilada, que contém a maior parte do metanol, devendo ser separada do produto final; coração: segunda fração, trata-se da aguardente como tal; e cauda: última fração contém compostos

indesejáveis (produtos menos voláteis), devendo ser separada do produto final (FARIA, 2003).

Durante o processo de envelhecimento ocorrem reações entre os componentes do destilado e os componentes extraídos, sendo que a bebida envelhecida apresenta menor teor alcoólico e maior concentração de compostos fenólicos e ésteres, características responsáveis pela melhoria em sua aceitação (MENDES et al., 2002). Porém, como o envelhecimento onera o processo de fabricação da cachaça, existe uma busca de recursos tecnológicos que substituam ou encurtem essa etapa do processo.

A qualidade sensorial da aguardente de cana, como de outras bebidas destiladas, é resultante de uma combinação complexa de substâncias químicas, onde a participação de inúmeros compostos minoritários define peculiaridades específicas entre as bebidas, eficientemente identificadas por testes sensoriais adequados (MAIA, 1994).

Testes de aceitação, efetuados com 13 amostras comerciais de cachaça não-envelhecida, mostraram que a boa aceitação do aroma pode estar relacionada com a presença de lactonas e terpenos. Já a rejeição do sabor deve-se à presença de fenóis, principalmente 4-vinilfenol e 4-vinilguaiacol, conforme correlação entre a aceitação e os resultados de análises químicas (JANZANTTI, 2004).

2.2. TERPENOS

Os terpenos são constituintes secundários de vegetais e são sintetizados

via Acetil CoA tendo unidades isoprênicas como intermediários (MAICAS e MATEO, 2005; MATEO E JIMENEZ, 2000; WITHERS e KEASLING, 2007), e evolutivamente, a presença de terpenos em vegetais é uma forma de proteção contra herbívoros e insetos (DEGENHARDT et al., 2003; GERSHENZON e DUDAREVA, 2007).

Glicosídeos terpênicos intactos, assim como outras classes de glicosídeos, são inodoros e pouco contribuem para as propriedades sensoriais dos alimentos e bebidas e as enzimas capazes de hidrolisá-los são classificadas como glicosidases (FERNÁNDEZ-GONZALÉZ et al., 2003; GUNATA et al., 1990).

Diferenças no perfil de terpenos de vinhos dependem da atividade β -glicosidase, da taxa de bioconversão de terpenos e da porcentagem de terpenos acumulados por diferentes espécies e híbridos de *Saccharomyces*. Leveduras com alta atividade β -glicosidase podem hidrolisar terpenos glicosilados, aumentando o teor de terpenos aromáticos do vinho. Além disso, alguns terpenos podem ser transformados em outros terpenos contribuindo com características aromáticas diferentes, influenciando nas propriedades organolépticas dos vinhos (GAMERO et al., 2011b).

Embora se encontre diferentes compostos terpênicos nos destilados de cana (cachaça e rum), não há estudos sobre glicosídeos terpênicos no caldo de cana, mas apenas estudos sobre glicosídeos cianogênicos (ZOELLNER e GIEBELMANN, 2007); glicosídeos flavonônicos (COLOMBO et al., 2006; DUARTE-ALMEIDA et al., 2007) e glicosídeos fenólicos como siríngicos e guaiaquílicos (TAKARA et al., 2007), que também podem ser hidrolisados pelas β -glicosidases.

A biossíntese dos diferentes glicosídeos terpênicos, flavonônicos,

cianogênicos e fenólicos em vegetais ocorre por ação de enzimas glicosiltransferases, capazes de glicosilar estas classes de compostos químicos (LAIRSON et al., 2008).

Alguns dos monoterpenos voláteis comumente encontrados em vinhos e destilados estão representados na Figura 1.

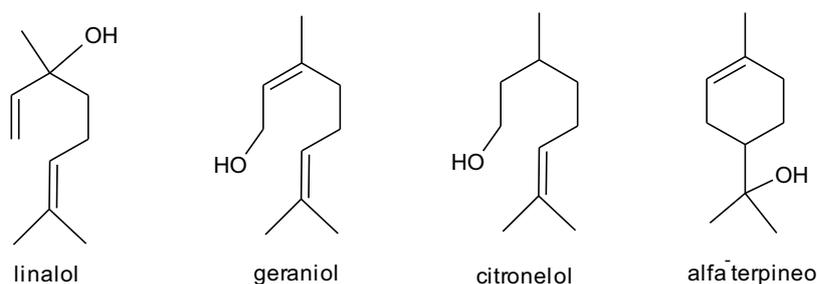


Figura 1. Exemplo de monoterpenos que contribuem para o aroma de bebidas alcoólicas (MAICAS e MATEO, 2005).

Assim como outros vegetais, a cana-de-açúcar também apresenta terpenos livres em sua composição, os quais foram detectados por SPME-GC-MS como α -felandreno, α -terpineol, *p*-cimeno, limoneno, *cis-p*-2-mentenol, *trans-p*-2-mentenol, mentol, isomentol, *p*-1,3,8-mentatrieno, *trans*- β -farneseno, extraídos diretamente do caule da planta (ROCHAT et al., 2000), entretanto em níveis muito baixos. Não foram encontrados estudos sobre possíveis biotransformações destes compostos durante a fermentação alcoólica da aguardente de cana.

A presença de compostos terpênicos na aguardente de cana brasileira já foi relatada por diferentes autores. Janzantti (2004) identificou e quantificou terpenos em 13 cachaças, sendo eles, com as respectivas faixas de concentração em $\mu\text{g/L}$: linalol (< 2,5-47); α -terpineol (< 2,1-8,8); metionol (50-156); β -citronelol (8,6-32); α -ionona (< 0,4-0,5); eugenol (1,7-66); isoeugenol (2,9-12) e farnesol (8,4-313). Já Boscolo et al. (2000) quantificaram geraniol em 25 amostras de

aguardentes; De-Souza et al. (2006) detectaram a presença de eugenol em amostras de cachaça e rum, e Nonato et al. (2001) identificaram os seguintes terpenos: β -farneseno, β -citronelol, nerolidol, α -bisabolol, *cis*-farnesol por SPME-GC-MS.

Da mesma forma que a cachaça, o rum é produzido a partir de cana-de-açúcar e 16 terpenos (mono e sesquiterpenos) foram detectados e os que não foram relatados em cachaça são: α -pineno, mirceno, γ -terpineol, terpinoleno, *p*-cimeneno, mentona, *neo*-mentol, cadaleno, acetato de farnezila e acetato de mentila (PIÑO, 2007).

Outras bebidas destiladas contêm compostos terpênicos em suas composições. Peña-Alvarez et al., (2006) relataram terpenos em tequila e suas propriedades sensoriais, tais como linalol (floral, adocicado), citronelol (adocicado, floral), timol (ardente, picante) e eugenol (picante, cravo). Também foi relatado que o geraniol atribui aroma de característica floral em Whisky (LEE et al., 2000).

2.3. β -GLICOSIDASES

As glicosidases têm aplicabilidade em indústrias de sucos e bebidas, já que participam da desestruturação da matriz da parede celular dos vegetais, facilitando a ruptura da célula vegetal aumentando a extração de compostos flavorizantes (TRAON-MASSON e PELLERIN, 1998), como ilustrado na Figura 2.

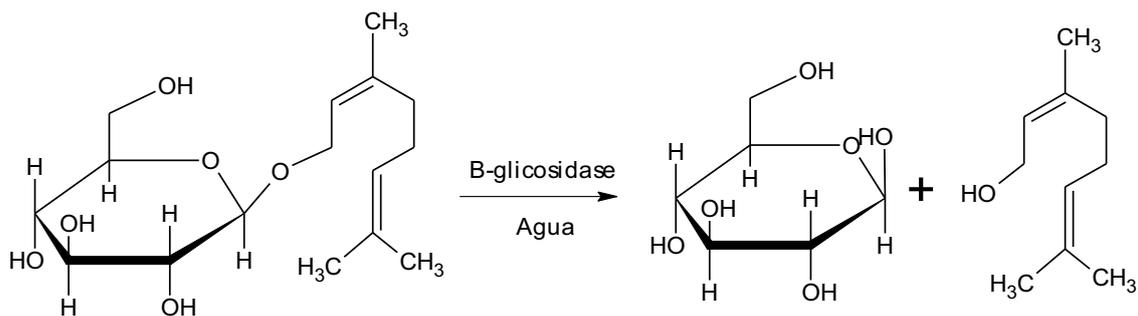


Figura 2. Exemplo de um glicosídeo terpênico (neril-β-D-glicosídeo) e dos produtos de sua hidrólise (glicose e nerol) por ação de uma β-glicosidase (HEMINGWAY et. al., 1999).

Outro exemplo deste tipo de aplicação de enzimas como potenciadoras de aromas em bebidas pode ser encontrado no tratamento do extrato de amarula (*Sclerocarya birrea*) levando a um aumento no teor de monoterpenos livres da ordem de 90% (FUNDIRA et al., 2002), o que contribui significativamente para o aroma da bebida.

A presença de β-glicosidases no processo de vinificação também favorece a liberação de compostos aromatizantes tais como nerol, α-terpineol, geraniol, linalol, citronelol e outros (BHATIA et al., 2002).

As β-glicosidases endógenas da uva não são capazes de atuar durante o processo de vinificação, devido à baixa estabilidade das mesmas (BARBAGALLO et al., 2004). Uma alternativa para o aumento aromático de vinhos está na utilização de enzimas microbianas que atuem nas condições de tal processo. Desta forma, inúmeros trabalhos têm sido realizados no sentido de encontrar enzimas que possam ser utilizadas na viticultura (BARBAGALLO et al., 2004; GUEGUEN et al., 1997; HERNÁNDEZ et al., 2003; SPAGNA et al., 2002).

Os precursores aromáticos não voláteis podem apresentar outros açúcares ligados à molécula de glicose, tais como, ramnose e arabinose, o que dificulta a ação das β-glicosidases isoladamente, necessitando-se assim de complexos

enzimáticos (ARÉVALO-VILLENA et al., 2007). Diferentes trabalhos relatam que há maior eficiência na liberação dos terpenos voláteis por meio da ação sinérgica de hemicelulases como ramnosidas, arabinofuranosidas, apiosidas e β -glicosidas (Figura 3) (BARBAGALLO et al., 2004; BELANCIC et al., 2003; HEMINGWAY et al., 1999).

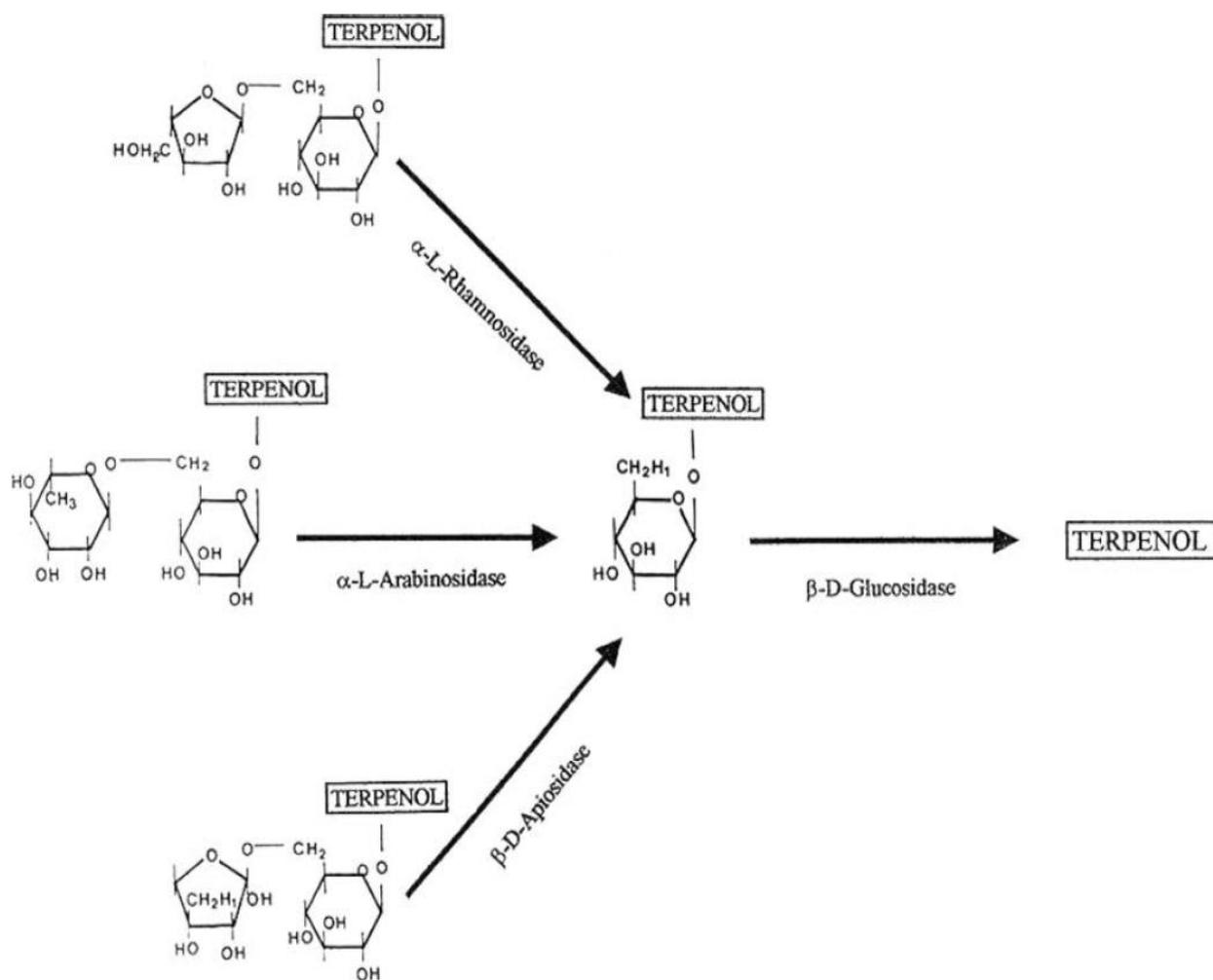


Figura 3. Ação hidrolítica de complexos enzimáticos na produção de terpenos voláteis (MAICAS E MATEO, 2005).

Embora consideradas pouco estáveis, a presença das β -glicosidas endógenas das uvas favorece a liberação de terpenos a partir de seus

precursores glicosídicos no processo de vinificação (BHATIA et al., 2002; GUEGUEN et al., 1997). Assim, o perfil aromático de uma bebida dependerá conjuntamente da variedade de glicosídeos terpênicos constituintes do vegetal bem como das enzimas β -glicosidases presentes durante seu processamento (BARBAGALLO, et al., 2004; MAICAS e MATEO, 2005).

A contribuição da *S. cerevisiae* para o teor de monoterpenos em bebidas alcoólicas é defendida ou contestada por pesquisadores, de acordo com a revisão realizada por Maicas e Mateo (2005). Delcroix et al. (1994) afirmam que esta levedura influencia no teor de terpenos no vinho enquanto que Rosi et al. (1994); Gunata et al. (1986); e Rapp e Mandery (1986) afirmam que a ação β -glicosidase da *S. cerevisiae* é praticamente inexistente durante o processo de vinificação. Hernandez et al. (2003) afirmam que a *S. cerevisiae* apresenta ação β -glicosidase, entretanto em condições inapropriadas ao processo fermentativo, ou seja, em temperaturas entre 40 a 50°C. Mateo e Di Stefano (1997) relatam que algumas cepas de *S. cerevisiae* exibem atividade β -glicosidase baseado na atividade hidrolítica sobre *p*-nitrofenil- β -D-glicosídeo e terpenos glicosídicos de suco de uva.

Algumas cepas de *S. cerevisiae* podem também transformar geraniol e nerol em citronelol (DUGELAY et al., 1992; HERNANDEZ et al., 2003). Outros autores afirmam ainda a ocorrência da conversão de geraniol em acetatos terpênicos (DI STEFANO et al. 1992), e que o teor total de terpenos no processo não é alterado nestas biotransformações (CARRAU et al., 2005).

A biossíntese de monoterpenos pela *S. cerevisiae* na ausência de precursores glicosilados em uva, mas em alta concentração de nitrogênio assimilável, foi demonstrada (CARRAU et al., 2005). Por outro lado também se

sabe que teor elevado de nitrogênio no mosto aumenta a formação de carbamato de etila, composto este de potencial carcinogênico (SCHEHL et al., 2007).

Gil et al. (2005) demonstraram que uma expressão superior da atividade do gene EXG1 pela levedura *S. cerevisiae* geneticamente modificada é suficiente para efetuar um aumento significativo do aroma do vinho, sendo sua alta atividade encontrada em condições normais de vinificação (65% de atividade a 0,5 M de glicose), mantendo sua atividade durante todos os estágios do processo fermentativo.

Gamero et al. (2011a) concluíram que há capacidade diferencial entre espécies de leveduras e híbridos em aumentar os compostos aromáticos do vinho, sugerindo o emprego de diferentes leveduras para produzir vinhos com características aromáticas diferentes, de acordo com as preferências dos consumidores. Com relação ao perfil de terpenos dos vinhos, todas as espécies de leveduras e híbridos testados neste estudo foram capazes de liberar linalol, enquanto que somente *S. bayanus* foi capaz de liberar geraniol. A ausência do geraniol nos vinhos pode ser explicada por sua biotransformação em linalol e α -terpienol devido à ação destas leveduras.

Muitos estudos foram realizados sobre a atividade hidrolítica de leveduras de vinho e também de leveduras não-*Saccharomyces* usadas em vinificação (CHAROENCHAI et al., 1997; FERNÁNDEZ et al., 2000; MENDES-FERREIRA et al., 2001; STRAUSS et al., 2001; ZOECKLEIN et al., 1997). Alguns microrganismos taxonomicamente distantes do gênero *Saccharomyces* apresentam-se como boas alternativas como fontes de β -glicosidases exógenas e estáveis em processos fermentativos, contribuindo significativamente para o atributo sensorial floral de vinhos. Gueguen et al. (1997) utilizaram β -glicosidases

exógenas à uva Muscat para melhorar a qualidade aromática do vinho. Após o tratamento enzimático, resultados das análises por GC-MS indicaram um aumento significativo dos compostos nerol, geraniol, linalol, α -terpineol, 2-feniletanol e álcool benzênico.

Villena et al. (2006) concluíram em seu trabalho que algumas leveduras não-*Saccharomyces* do vinho possuem atividade β -glicosidase, e que o extrato purificado de *Debaryomyces pseudopolymorphus* hidrolisa precursores aromáticos em vinho Muscat e requer menor tempo de ação que preparados enzimáticos comerciais. Cordero-Otero et al. (2003) relataram que a co-fermentação de um vinho Chardonnay utilizando *D. pseudopolymorphus* com *S. cerevisiae* VIN13 aumentou a liberação de citrionelol, geraniol e nerol. A utilização de β -glicosidase produzida por *Candida molischiana* 35M5N na produção de vinho e suco de damasco aumentou consideravelmente os teores de diversos terpenos (GUEGUEN et al., 1996).

β -glicosidases de outros microrganismos nem sempre são apropriadas para aplicação em processos de vinificação em geral, pois como as glicosidases de alguns fungos, são inibidas pela glicose mesmo em concentrações de 1-1,5% enquanto glicosidases de bactérias são ativas em temperaturas acima de 50 °C (ARYAN et al., 1987; WOODWARD e WISEMAN, 1982).

Trabalhos anteriores relatam produção de β -glicosidases com características muito interessantes pelos microrganismos *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* (HAYASHI et al., 1999; KALOGERIS et al., 2003; LEITE, 2007; SAHA, et al., 1994).

Um estudo realizado com aplicação dos extratos bruto e purificado de β -glicosidases do *A. pullulans* e *T. aurantiacus* em terpenos glicosídeos extraídos

da uva Isabel, demonstrou maior eficiência hidrolítica do extrato bruto de ambos os microrganismos do que seus extratos purificados (LEITE, 2007). Além disso, o uso do extrato enzimático bruto é mais economicamente viável para aplicação industrial, apresentando um custo de aproximadamente 1% do custo das enzimas puras (LEITE et al., 2008). Entretanto, vários componentes no meio do extrato podem afetar as respectivas atividades ou termoestabilidades.

2.4 PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)

A FES pode ser definida como um processo fermentativo que ocorre na ausência ou próximo à ausência de água livre entre as partículas de um substrato sólido. Esse substrato é utilizado como fonte de carbono e energia, ou ainda, pode servir apenas como suporte inerte, devendo ser enriquecido com outras fontes de carbono e nutrientes. No entanto, o substrato, deve conter umidade suficiente para sustentar o crescimento microbiano, sendo que as moléculas de água estão nas formas adsorvidas ou ligadas com a matriz sólida (PANDEY, 1992).

A inclinação para a produção de enzimas microbianas utilizando a FES está relacionada ao cultivo de fungos filamentosos, pois as condições de crescimento da FES são semelhantes ao habitat dos mesmos, resultando em melhor adaptação às condições do meio e conseqüentemente maior produção de enzimas; a ausência de água livre reduz significativamente os riscos de contaminação por bactérias; os espaços entre as partículas do substrato

permitem uma fácil aeração; os produtos formados estão mais concentrados e geralmente são extraídos com a adição de pequenas quantidades de água, o que possibilita a obtenção de extratos enzimáticos com elevada concentração das enzimas de interesse (MARTINS, 2003).

Os microrganismos *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* são, sobretudo, degradadores de material lignocelulósico, e o farelo de trigo foi empregado como fonte de carbono para crescimento dos mesmos. Poderiam-se empregar outras fontes de carbono como bagaço de cana, sabugo de milho ou casca de arroz, porém maior atividade β -glicosidase foi encontrada para os extratos obtidos com fermentação utilizando farelo de trigo como substrato (LEITE et al., 2008). Durante a fase de crescimento, os fungos e leveduras excretam seus complexos enzimáticos para degradar o substrato. Este complexo enzimático normalmente contém lacases, celulases, hemicelulases, xilanases, β -glicosidases, pectinases e outras classes de enzimas. Após a extração do complexo enzimático do meio fermentativo com água destilada, devem-se separar possíveis impurezas sólidas por centrifugação e as propriedades enzimáticas devem ser avaliadas.

2.5 ANÁLISE SENSORIAL

De nada vale para o consumidor um produto que possua excelentes características físico-químicas e microbiológicas, se a característica sensorial desse produto não preencher as necessidades e os anseios de quem o consumirá. Uma vez que a qualidade de um produto implica, entre outras coisas, a satisfação do consumidor, cabe ao consumidor determinar os parâmetros de

aceitação do produto.

Neste ponto a análise sensorial mostra-se de extrema importância, pois por meio desta as características ou propriedades de interesse relativas à qualidade sensorial do alimento são identificadas e adequadamente estudadas, com base em metodologias sensoriais de coletas de dados e em métodos estatísticos de avaliação e interpretação dos resultados do estudo sensorial desse alimento (MINIM, 2006).

A avaliação sensorial necessita de ferramentas, os métodos usados para análise dos produtos. Através dos métodos discriminativos são avaliadas as diferenças sensoriais entre dois ou mais produtos. Os testes de comparação pareada são provas utilizadas para determinar diferença sensorial entre dois tratamentos ou produtos quanto a um atributo específico. Ao provador são apresentadas duas amostras codificadas, sendo-lhe indicado que são diferentes. É solicitada a identificação da amostra que apresenta determinado atributo com maior intensidade do que a outra.

Para avaliar a aceitação e preferência dos consumidores em relação a um ou mais produtos utilizam-se os métodos afetivos. Os testes afetivos ou de consumidor obtêm diretamente a opinião do consumidor em relação às idéias e características de um dado produto, podendo determinar qual o produto preferido e /ou mais aceito por determinado público-alvo, em função de suas características sensoriais.

O teste de aceitação avalia o quanto um consumidor gosta ou desgosta de um determinado produto; o teste de preferência é usado quando se deseja comparar vários produtos, e embora meçam a preferência dos consumidores, não indicam se eles gostaram ou não dos produtos avaliados, portanto o pesquisador

deve ter conhecimento prévio sobre a avaliação afetiva desses produtos. Para o teste de aceitação existem várias escalas, sendo a escala hedônica uma das mais utilizadas. É uma escala facilmente compreendida pelos consumidores, e existem diferentes tipos como as verbais, as faciais e a não-estruturada (MINIM, 2006).

Os métodos descritivos de análise sensorial de alimentos têm como objetivo principal a descrição mais completa possível dos atributos sensoriais. Métodos descritivos são métodos que descrevem qualitativa e quantitativamente as amostras, tendo como objetivo caracterizar as propriedades sensoriais do produto. A análise descritiva quantitativa é uma técnica desenvolvida para descrever sensorialmente as características de um produto com precisão em termos matemáticos, permitindo medir a intensidade de cada característica sensorial presente no produto. Nesta metodologia utiliza-se um painel treinado para a descrição e quantificação de todos os atributos sensoriais de um produto.

As análises da composição química e sensorial da aguardente de cana constituem-se ferramentas importantes no controle de qualidade da bebida e avaliação das alterações que possam contribuir para a melhoria dos processos envolvidos na sua produção. A identificação dos compostos responsáveis por uma determinada resposta sensorial contribui para que o processo de produção seja modificado a fim de que haja atenuação ou acentuação dessas características, o que pode proporcionar à aguardente de cana o desejado salto de qualidade e o alcance a um lugar junto aos demais destilados no mercado internacional (CARDELLO e FARIA, 2000; CARDOSO et al., 2004).

3. OBJETIVO GERAL

Aplicação de complexos enzimáticos contendo principalmente β -glicosidases produzidas por *Aureobasidium pullulans* e *Thermoascus aurantiacus* ao caldo de cana, para obtenção de melhorias nas propriedades sensoriais com o aumento de agliconas terpênicas na cachaça.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter complexos enzimáticos de β -glicosidases dos microrganismos *Aureobasidium pullulans* e *Thermoascus aurantiacus*, e caracterizar os extratos quanto à atividade β -glicosidase.
- Caracterizar o caldo de cana quanto à presença de glicosídeos terpênicos.
- Identificar e quantificar os compostos terpênicos produzidos pelo tratamento do caldo com complexos enzimáticos ricos de β -glicosidases.
- Analisar a composição físico-química da cachaça obtida com tratamento do caldo por complexos enzimáticos ricos em β -glicosidases.
- Investigar a influencia da adição de enzimas exógenas ao processo fermentativo na qualidade sensorial da cachaça, em termos de aceitação e preferência.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Foi utilizado caldo de quatro variedades de cana-de-açúcar distintas, IAC87-3396, RB83-5486, SP79-1011 e RB86-7515, cedidas pela usina Guariroba, do município de Pontes Gestal - SP. Estas foram coletadas durante a mesma safra, e depois de higienizadas seu caldo foi obtido utilizando-se um moedor de cana elétrico, e as amostras foram armazenadas a -18°C.

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Microrganismos e produção do extrato enzimático

O fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756, isolado de madeira em decomposição de Manaus (AM), Brasil foi mantido em ágar Sabouraud dextrose e a levedura mesofílica *Aureobasidium pullulans* ER-16, isolada de resíduos da indústria de suco de laranja em Catanduva (SP), Brasil, mantida em PDA (potato dextrose ágar-Oxoid) a 4°C.

O *T. aurantiacus* foi cultivado em erlenmeyers de 250 mL contendo 40 mL do meio ágar Sabouraud Dextrose inclinado, mantido por 48 horas a uma temperatura de 50°C. A suspensão do microrganismo foi obtida pela raspagem

suave da superfície do meio de cultura empregando 25 mL de solução nutriente devidamente esterilizada. A inoculação do fungo no substrato se deu pela transferência de 6 mL desta suspensão para os frascos de erlenmeyer contendo farelo de trigo previamente preparado.

O *A. pullulans* foi cultivado em erlenmeyers de 125 mL contendo 20 mL do meio PDA (potato dextrose ágar-oxid) inclinado, mantido por 48 horas a uma temperatura de 28°C. A suspensão do microrganismo foi obtida pela raspagem suave da superfície do meio de cultura empregando 25 mL de solução nutriente devidamente esterilizada. A inoculação do fungo no substrato se deu pela transferência de 10 mL desta suspensão para os frascos de erlenmeyer contendo farelo de trigo previamente preparado.

A produção de enzimas se deu por fermentação em estado sólido (FES) usando como substrato farelo de trigo lavado com água destilada e posteriormente seco em estufa a 50°C por 48 horas. A fermentação ocorreu em frascos de erlenmeyer de 500 mL, contendo 10 g de substratos umedecidos com 10 mL de solução nutriente. A solução nutriente era composta por 0,1% de nitrato de amônia, 0,1% sulfato de amônia e 0,1% sulfato de magnésio hepta-hidratado. O material foi esterilizado a 121°C durante 20 minutos. Após a inoculação do microrganismo, a fermentação ocorreu a uma temperatura de 50°C para o *T. aurantiacus* e para o *A. pullulans* a 28°C.

4.2.2 Extração da enzima e determinação da atividade de β -glicosidase

Os complexos enzimáticos foram extraídos do material fermentado, após 96 horas, pela adição de 100 mL de água destilada e mantidos em agitação por 1

hora. Posteriormente o material foi centrifugado a 10000xg/20 min a 5°C, e o sobrenadante foi utilizado para os ensaios subseqüentes.

A atividade de β -glicosidase dos complexos enzimáticos estudados foi determinada pela quantificação de nitrofenol liberado pela enzima a partir de 4-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (PNPG, Sigma) usado como substrato. Adicionou-se 250 μ L de tampão acetato 0,1M, pH 5,0, e 250 μ l de PNPG 4mM a 50 μ l do filtrado enzimático, reagindo por 10 minutos a uma temperatura de 60°C, e a reação enzimática foi paralisada com 2 mL de carbonato de sódio 2M. O nitrofenol liberado foi quantificado por espectrofotometria em $\lambda=410$ nm, e uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de nitrofenol por minuto de reação.

4.2.3 Concentração do extrato bruto

O extrato bruto foi concentrado com 65% de saturação de etanol (v/v). Sob leve agitação, o etanol (-18°C) foi lentamente adicionado ao extrato bruto, previamente refrigerado a 5°C. A solução foi mantida por 12 horas em banho de gelo e o precipitado foi separado do sobrenadante por centrifugação (10.000 xg/20min). O precipitado foi resuspendido em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,5 e então utilizado para a determinação de atividade de β -glicosidase.

4.2.4 Tratamento enzimático do caldo de cana-de-açúcar.

Uma unidade de β -glicosidase foi adicionada ao caldo de cana de quatro variedades, filtrado e padronizado em 15% de açúcar com água destilada.

Inicialmente, para cada um dos dois microrganismos estudados como produtores de β -glicosidases, o processo hidrolítico, prévio à etapa de fermentação alcoólica, foi realizado para se conhecer a influência de parâmetros como temperatura, tempo de hidrólise e condição de agitação. Para a determinação das condições ótimas de ação hidrolítica, os sistemas foram mantidos em pH 4,5 e em diferentes condições de temperatura (60 e 65°C); tempo de hidrólise (30 e 60 min); sem agitação e com agitação (50 rpm). A resposta esperada foi maior liberação de terpenos voláteis no caldo de cana.

4.2.5 Caracterização química do caldo de cana.

4.2.5.1 Determinação de glicose e frutose.

O teor de glicose e frutose do caldo de cana foi quantificado utilizando-se um Cromatógrafo de Troca Aniônica de Alta eficiência com Detecção Amperométrica Pulsada HPAEC-PAD (ICS 3000, Dionex Corporation, EUA) equipado com amostrador automático AS40.

Várias condições de trabalho foram inicialmente testadas para a escolha da melhor condição, já que não foi encontrado na literatura nenhum trabalho com análise de glicose e frutose no caldo de cana por este método. Foram feitos testes de otimização e com isso encontrada a condição ótima descrita abaixo.

Amostras (20 μ L) foram automaticamente injetadas no sistema HPAEC-PAD constituído por uma coluna de troca aniônica CarboPac PA-1 (4 x 250 mm) em combinação com uma guarda-coluna CarboPac PA-1 (4 x 50 mm). A forma de onda empregada foi a “standard quadruple” com os seguintes potenciais de

pulso e durações: $E_1 = 0,10 \text{ V}$ ($t_1 = 0,40 \text{ s}$); $E_2 = -2,00 \text{ V}$ ($t_2 = 0,02 \text{ s}$); $E_3 = 0,60 \text{ V}$ ($t_3 = 0,01\text{s}$); $E_4 = -0,10 \text{ V}$ ($t_4 = 0,06 \text{ s}$). A fase móvel utilizada para separação foi constituída pelo eluente A (200 mM NaOH) e eluente B (água deionizada) com fluxo de 1 mL/min e temperatura de 35°C. Os eluentes foram preparados com água deionizada ultra pura e degaseificados com nitrogênio. Para análise de glicose as amostras foram eluídas com 1,5% NaOH 200 mM por 25 min; e para frutose as amostras foram eluídas com 5% NaOH 200 mM por 12 min.

4.2.5.2 Identificação e quantificação de terpenos livres

A identificação e quantificação dos terpenos livres das amostras de caldo de cana foram realizadas por HS-SPME-GC/MS utilizando um cromatógrafo gasoso Shimadzu 17-A acoplado a um detector de massas Shimadzu QP-5050A operando no modo “electron impact mode” (70 eV). Previamente à injeção, as amostras foram aquecidas e mantidas a 40°C por 10 min e os compostos aromáticos foram extraídos com uma microfibra de 100 µm de polimetilsiloxano (Supelco) por 10 min a 40°C. A coluna cromatográfica utilizada foi uma Agilent CP-Wax 52 CB (50 m x 0.32 mm) revestida com polietilenoglicol como fase estacionária, e a programação térmica do forno foi: temperatura inicial 70°C por 1 minuto, aumentando 10° C por minuto até 220° C por 9 minutos, sendo que a temperatura do injetor, interface e detector foi 220, 230 e 240, respectivamente. A injeção foi realizada no modo splitless, e o hélio foi utilizado como gás de arraste (1 mL/min). O espectrômetro de massas foi operado nos modos *scan* (40-160 m/z) e *sim* (*single ion monitoring*) focando os íons m/z 69 e 93, os mais abundantes em monoterpenos (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000). Os picos

foram identificados pelo seu tempo de retenção e comparando seus espectros de massas com os dos padrões e os disponíveis na base de dados (NIST), e a quantificação foi realizada baseado nos íons m/z 69 e 93. Padrões analíticos de terpienol, linalol, citronelol, nerol e geraniol foram usados nas análises, e as amostras foram comparadas com dois controles: caldo de cana mais tampão acetato e caldo de cana mais a enzima termicamente desnaturada.

Todas estas análises foram realizadas no Laboratório para o Desenvolvimento da Química da Aguardente, do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo (USP), em colaboração com o Professor Dr. Douglas Wagner Franco.

4.2.5.3. Análise dos glicosídeos terpênicos do caldo de cana

4.2.5.3.1. Extração dos glicosídeos terpênicos

Para análise dos glicosídeos terpênicos do caldo de cana, foi utilizada a metodologia descrita por Mateo e Di Stefano (1997), com algumas modificações. Em um cartucho de extração em fase sólida (SPE) contendo 1 g de octadecil silano C18 (Supelco C-18) previamente ativado com 5 mL de metanol, seguido de 15 mL de água, foi eluído 5 mL de caldo de cana e em seguida 10 mL de água deionizada e 5 mL de diclorometano. Os glicosídeos precursores das agliconas terpênicas foram eluídos com 5 mL de metanol.

4.2.5.3.2. Análise dos glicosídeos terpênicos por espectrometria de massas (MS)

As análises foram realizadas por injeção direta de 5 μ L dos extratos de caldo de cana (diluídos 100 vezes em metanol) em um espectrômetro de massas triplo quadrupolo Quattro II da Micromass, utilizando como fonte de ionização electrospray no modo positivo (ESI+), e ionização a pressão atmosférica modo positivo (APCI+). A fase móvel utilizada foi MeOH:ácido fórmico 0,1% (1:1).

4.2.6 Fermentação alcoólica e destilação

A fermentação alcoólica sem adição de β -glicosidases foi considerada como referência para os estudos e foi realizada em todos os experimentos. O mesmo caldo de cana (RB86-7515) foi empregado para cada série de experimentos para eliminar a influência de variação em sua composição.

O caldo de cana foi diluído com água destilada para o ajuste dos seus teores de sólidos solúveis a 14^oBrix e foi feita a correção do pH para 4,5 utilizando-se ácido sulfúrico. O mosto assim corrigido foi então fermentado pela inoculação do pé-de-cuba, preparado no laboratório com a reativação da cepa de *S. cerevisiae* comercial a 30^oC, apresentando cerca de 10% do volume dos mostos até que os vinhos apresentassem 0^oBrix.

Tanto as amostras em que foi adicionado extrato enzimático de β -glicosidases ao mosto, como as que não receberam a adição de enzimas, foram mantidas à 60 °C por 30 minutos, e antes da inoculação da *S. cerevisiae*, a temperatura do caldo de cana foi ajustada para 30^oC. Não foram empregados

aditivos minerais e antibióticos e o pH inicial da fermentação alcoólica foi igual ao empregado na etapa prévia de hidrólise com β -glicosidases.

O vinho obtido conforme descrito acima, foi então destilado utilizando-se um alambique de cobre com capacidade para destilar 18 L, com aplicação de fogo direto na cucúbita (caldeira).

Para análise cromatográfica foram coletadas separadamente as frações cabeça, coração (coletada em duas partes), e cauda, a fim de se obter um controle da fração em que os terpenos estariam presentes e/ou mais concentrados.

As aguardentes produzidas foram mantidas em recipientes protegidos da luz e em ambiente fresco para a realização das análises cromatográficas e sensoriais. Os destilados produzidos foram caracterizados em termos dos monoterpenos voláteis produzidos como geraniol, nerol, linalol e terpienol por GC-MS.

4.2.7 Caracterização cromatográfica dos destilados produzidos.

As análises foram realizadas de acordo com as condições descritas no item 4.2.5.2, exceto que os produtos de destilação foram injetados diretamente com auxílio de uma seringa e a programação térmica do forno iniciou em 50°C por 1 minuto aumentando 10°C por minuto até 220°C por 9 minutos.

Outros parâmetros foram avaliados para se medir o grau de influência dos complexos enzimáticos na fermentação alcoólica como acidez, teor de alcoóis superiores e cetonas, e foram empregados os métodos oficiais de análise (BRASIL, 2005).

4.2.8 Caracterização físico-química das aguardentes de cana

4.2.8.1 Determinação do teor alcoólico

As determinações do teor alcoólico foram realizadas utilizando um alcoômetro de Gay Lussac (escala de 0 a 100° GL), com termômetro aferido a 20°C, de acordo com as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2005). As análises foram realizadas em triplicata.

4.2.8.2 Acidez total

O teor de acidez total foi determinado por titulometria com solução padrão de NaOH 0,1N , sendo expressos em miligramas de ácido acético por 100 mL de álcool anidro (IAL, 2005). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.2.8.3 Ésteres, ácidos carboxílicos e alcoóis superiores

O acetaldeído, os alcoóis *n*-propílico, isoamílicos e metanol, e o acetato de etila foram determinados por cromatografia gasosa utilizando-se um cromatógrafo a gás da Hewlett-Packard 5890-GC equipado com um injetor de entrada split-splitless, um detector de ionização de chamas (DIC) e uma coluna HP-FFAP, sendo todos expressos em miligramas por 100 mL de álcool anidro. Os dados cromatográficos foram coletados no software Chromeleon.

Condições da análise: temperatura do injetor e detector: 250°C; volume

injetado: 1 μ L; split: 1:20; fluxo de gás de arraste: hidrogênio (1 mL/min); programação térmica: 40°C (5 minutos); aumentando 20°C/ minuto até 200°C.

Para as determinações cromatográficas foram preparadas soluções padrão de grau analítico (Merck, Aldrich) contendo os seguintes compostos orgânicos: acetaldeído, acetato de etila, *n*-propanol, álcool isoamílico, e metanol. As soluções foram preparadas em uma mistura etanol-água nas proporções 4:6 v/v, procurando-se reproduzir as condições da matriz analisada. Foram construídas as curvas de calibração (área do analito em função de sua concentração) para os diferentes compostos orgânicos analisados, obtendo-se coeficientes de correlação > 0,99. Cada ponto da curva foi preparado e injetado em triplicata. As amostras também foram injetadas em triplicata, onde se calculou a concentração de cada composto orgânico através da equação da reta de calibração. A identificação desses compostos foi baseada nos tempos de retenção.

4.2.9 Análise sensorial

4.2.9.1 Descrição dos critérios para seleção dos indivíduos

Para a condução dos testes discriminativos e afetivos foram selecionados provadores que fazem parte do grupo da população que consome a cachaça moderadamente. Foram requisitados indivíduos adultos, preferencialmente entre 18 e 40 anos, que em geral gozam de boa saúde, podendo ser de ambos os sexos. Indivíduos menores de 18 anos e indivíduos com intolerância ao etanol, gestantes, lactantes e/ou indivíduos em tratamento com fármacos que tenham interação com o etanol não puderam participar das análises.

Os provadores selecionados assinaram um Termo de Consentimento Livre Esclarecido (Anexo 1), conforme a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, que contém as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Este Termo foi devolvido ao pesquisador responsável, devidamente preenchido e assinado, no momento da análise.

Todas as análises foram realizadas no laboratório de análise sensorial do Departamento de Engenharia de Alimentos da UNESP/IBILCE, em colaboração com a Professora Dr^a Ana Carolina Conti e Silva do IBILCE-UNESP de São José do Rio Preto.

4.2.9.2 Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP, de acordo com a resolução CNS/196/96, através do protocolo de número 0023.0.229.000-10 (Anexo 2).

4.2.9.3 Método discriminativo

A análise discriminativa das amostras de cachaça foi realizada aplicando-se o teste de comparação pareada a vinte provadores representativos do mercado alvo (Figura 4).

Nome: _____	Data: _____
Você está recebendo duas amostras de cachaça. Por favor, prove as amostras da esquerda para a direita e identifique com um círculo a amostra que apresenta aroma e sabor mais intensos.	

Comentários:	

Figura 4. Ficha de avaliação utilizada no teste de comparação pareada.

Os provadores foram familiarizados com uma solução de terpenos em uma concentração igual à encontrada na cachaça tratada, a fim de conhecerem o aroma floral característico destes compostos. Posteriormente receberam duas amostras de cachaça, a controle, que não recebeu adição de β -glicosidases durante seu processamento, e a tratada, a qual se adicionou extrato bruto de β -glicosidases durante sua produção, e foram solicitados a circular o código da amostra que apresentava maior intensidade do atributo avaliado.

4.2.9.4 Métodos afetivos

Uma vez comprovado que as amostras diferem entre si, foi realizado um teste de aceitação e de preferência com trinta provadores.

Na coleta dos dados da análise de aceitação o provador recebeu duas amostras codificadas e foi solicitado a avaliar o quanto ele gosta ou desgosta de cada amostra em relação aos atributos aroma, sabor e impressão global,

utilizando uma ficha com escala hedônica estruturada mista de 9 pontos. Já para análise de preferência utilizou-se um teste de comparação pareada, no qual o provador foi solicitado a indicar a amostra de sua preferência (Figura 5).

Nome: _____	Data: _____
<p>Você está recebendo duas amostras de cachaça. Por favor, prove as amostras da esquerda para a direita e avalie os atributos usando a escala abaixo:</p>	
9. Gostei muitíssimo	
8. Gostei muito	Amostra n° _____
7. Gostei moderadamente	Aroma _____
6. Gostei ligeiramente	Sabor _____
5. Nem gostei e nem desgostei	Impressão Global _____
4. Desgostei ligeiramente	
3. Desgostei moderadamente	
2. Desgostei muito	Amostra n° _____
1. Desgostei muitíssimo	Aroma _____
	Sabor _____
	Impressão Global _____
<p>Marque o n° da amostra que você preferiu: _____</p>	
<p>Comentários:</p> <p>_____</p> <p>_____</p>	

Figura 5. Ficha de avaliação utilizada nos testes de aceitação e preferência.

As amostras (30 mL) foram servidas em cálices tipo tulipa, codificados com algarismos de 3 dígitos ao acaso, e foram avaliadas em cabines individuais, sob luz branca.

4.2.9.5 Análise estatística

Para estabelecer diferenças estatísticas entre os valores dos parâmetros estudados, os dados foram primeiramente submetidos a uma análise de variância simples – ANOVA, teste-t ($p < 0,05$), e outras análises gráficas, utilizando-se o programa Origin 6.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ATIVIDADE β -GLICOSIDASE

O extrato enzimático bruto do *T. aurantiacus* apresentou atividade β -glicosidase de 5,2 U/mL, enquanto o extrato bruto do *A. pullulans* apresentou 1,4 U/mL.

Para os extratos que foram concentrados por precipitação com etanol foram encontradas 24 U/mL e 6,8 U/mL para o extrato do *T. aurantiacus* e do *A. pullulans*, respectivamente, demonstrando um aumento da concentração de mais de 4 vezes de unidades de β -glicosidases.

5.1.1 Estabilidade do extrato bruto e concentrado

O extrato enzimático bruto conservou atividade de β -glicosidase durante 5 meses de estocagem à -18°C , apresentando os mesmos valores que a atividade determinada logo após sua produção. Já para a estocagem realizada nas mesmas condições com o extrato bruto concentrado, não houve diminuição de atividade do extrato do *A. pullulans*, porém ocorreu uma redução de 25 % da atividade de β -glicosidases do extrato do *T. aurantiacus* (Tabela 1 e 2).

Tabela 1. Valores médios da atividade de β -glicosidase (U/mL) do extrato bruto e concentrado do *T. aurantiacus*.

	Atividade Inicial	Atividade após 5 meses
Extrato enzimático bruto	5,2	5,2
Extrato enzimático bruto concentrado	24,0	18,0

Tabela 2. Valores médios da atividade de β -glicosidase (U/mL) do extrato bruto e concentrado do *A. pullulans*.

	Atividade Inicial	Atividade após 5 meses
Extrato enzimático bruto	1,4	1,4
Extrato enzimático bruto concentrado	6,8	6,8

Melhor conservação da atividade de β -glicosidases foi observada para o armazenamento do extrato enzimático do *T. aurantiacus* na forma bruta do que na forma de extrato bruto concentrado.

5.2 DETERMINAÇÃO DE GLICOSE E FRUTOSE NO CALDO DE CANA

β -glicosidases geralmente são inibidas por monossacarídeos. Visando avaliar possíveis interferências na atividade β -glicosidase no caldo de cana utilizado neste trabalho, o teor de glicose e frutose foi determinado por HPAEC-PAD. A média do teor de glicose e frutose encontrada nas diferentes variedades foi de 7,4 e 7,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Figuras 6 e 7).

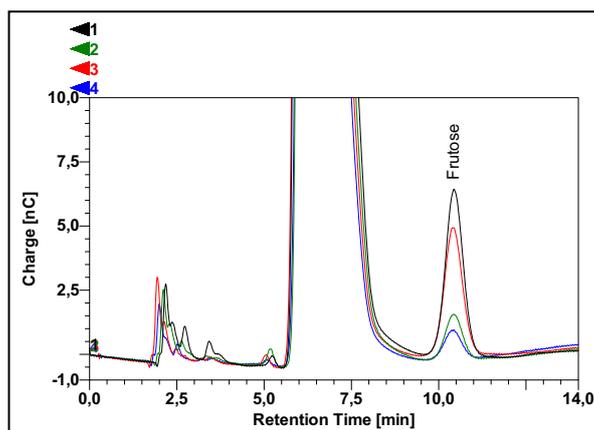


Figura 6. Cromatograma do caldo de quatro variedades de cana, obtido na análise de frutose por HPAEC-PAD. 1. RB86-7515; 2. IAC87-3396; 3. RB83-5486; 4. SP79-1011.

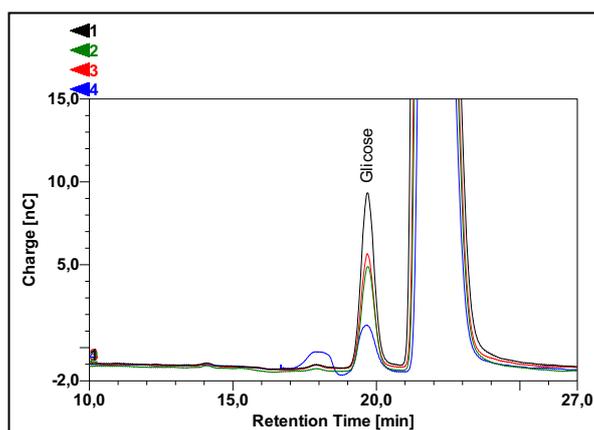


Figura 7. Cromatograma do caldo de quatro variedades de cana, obtido na análise de glicose por HPAEC-PAD. 1. RB86-7515; 2. IAC87-3396; 3. RB83-5486; 4. SP79-1011.

Como pode ser observado na Tabela 3, foi encontrada uma diferença significativa entre o teor de glicose e frutose do caldo das diferentes variedades de cana analisadas, porém o teor destes açúcares foi menor que 50 mg/mL do caldo.

Tabela 3. Teor médio de glicose e frutose do caldo das quatro variedades de cana estudadas.*

Variedade	Glicose ($\mu\text{g/mL}$)	Frutose ($\mu\text{g/mL}$)
IAC87-3396	6,8 \pm 0,0	2,8 \pm 0,0
RB83-5486	7,5 \pm 0,0	10,5 \pm 0,5
SP79-1011	3,7 \pm 0,1	1,7 \pm 0,1
RB86-7515	11,5 \pm 0,0	13,0 \pm 0,2

* Média de duas replicatas, com o respectivo desvio-padrão.

Estes resultados demonstram que os teores destes açúcares encontrados nestas quatro variedades de cana-de-açúcar são menores que 50 mg/mL, o que não interfere significativamente na atividade de enzimas como as β -glicosidases do *T. aurantiacus* e *A. pullulans* (LEITE et al., 2008).

5.3 ANÁLISE DOS GLICOSÍDEOS TERPÊNICOS DO CALDO DE CANA POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A análise dos resultados da espectrometria de massas foi realizada sobre a previsão das relações m/z (M+1, M+2 e M+3) das possíveis combinações das massas dos terpenóides estudados com os diferentes açúcares formadores dos glicosídeos terpênicos, glicose, arabinose, apiose, xilose, rhaminose, rutinose e rafinose, e também com os respectivos adutos de sódio e potássio como mostrado na Tabela 4.

Tabela 4. Massas das possíveis combinações dos terpenóides estudados com diferentes açúcares formadores de glicosídeos terpênicos.

Glicosídeo terpênico	M*	M+1	(M+2)/2	(M+3)/3	M+23**	M+39***
Terpeno A + glicose	316,25	317,25	159,13	106,42	339,25	355,25
Terpeno B + glicose	318,27	319,27	160,14	107,09	341,27	357,27
Terpeno A + glicose + arabinose	448,51	449,51	225,26	150,50	471,51	487,51
Terpeno A + glicose + apiose ou xilose	448,54	449,54	225,27	150,51	471,54	487,54
Terpeno B + glicose + arabinose	450,53	451,53	226,27	151,18	473,53	489,53
Terpeno B + glicose + xilose	450,54	451,54	226,27	151,18	473,54	489,54
Terpeno B + glicose + apiose	450,56	451,56	226,28	151,19	473,56	489,56
Terpeno A + 1 glicose + 1 rhaminose	462,57	463,57	232,29	155,19	485,57	501,57
Terpeno B + 1 glicose + 1 rhaminose	464,59	465,59	233,30	155,86	487,59	503,59
Terpeno A + 2 glicoses	478,57	479,57	240,29	160,52	501,57	517,57
Terpeno B + 2 glicoses	480,59	481,59	241,30	161,20	503,59	519,59
Terpeno A + 1 glicose + 2 arabinoses	580,61	581,61	291,31	194,54	603,61	619,61
Terpeno A + glicose + 2 apioses ou 2 xiloses	580,67	581,67	291,34	194,56	603,67	619,67
Terpeno B+ 1 glicose + 2 arabinoses	582,63	583,63	292,32	195,21	605,63	621,63
Terpeno B + 1 glicose + 2 xiloses	582,67	583,67	292,34	195,22	605,67	621,67
Terpeno B + glicose + 2 apioses	582,69	583,69	292,35	195,23	605,69	621,69
Terpeno A + 1 glicose + 2 rhaminoses	608,73	609,73	305,37	203,91	631,73	647,73
Terpeno A + 2 glicoses + arabinose	610,67	611,67	306,34	204,56	633,67	649,67
Terpeno A + 2 glicoses + apiose ou xilose	610,70	611,70	306,35	204,57	633,70	649,70
Terpeno B + 1 glicose + 2 rhaminoses	610,75	611,75	306,38	204,58	633,75	649,75
Terpeno B + 2 glicoses + arabinose	612,69	613,69	307,35	205,23	635,69	651,69
Terpeno B + 2 glicoses + apiose ou xilose	612,72	613,72	307,36	205,24	635,72	651,72
Terpeno A + 2 glicoses + rhaminose	624,73	625,73	313,37	209,24	647,73	663,73
Terpeno B + 2 glicoses + rhaminose	626,75	627,75	314,38	209,92	649,75	665,75
Terpeno A + 3 glicoses	640,73	641,73	321,37	214,58	663,73	679,73
Terpeno B+ 3 glicoses	642,75	643,75	322,38	215,25	665,75	681,75
Terpeno A + glicose + rutinose	748,41	749,41	375,21	250,47	771,41	787,41
Terpeno B + glicose + rutinose	750,41	751,41	376,21	251,14	773,41	789,41
Terpeno A + glicose + rafinose	802,85	803,85	402,43	268,62	825,85	841,85
Terpeno B + glicose + rafinose	804,87	805,87	403,44	269,29	827,87	843,87
Terpeno A + 2 glicoses + rutinose	910,57	911,57	456,29	304,52	933,57	949,57
Terpeno B + 2 glicoses + rutinose	912,59	913,59	457,30	305,20	935,59	951,59
Terpeno A + 2 glicoses + rafinose	965,01	966,01	483,51	322,67	988,01	1004,01
Terpeno B + 2 glicoses + rafinose	967,03	968,03	484,52	323,34	990,03	1006,03
Terpeno A+ glicose +2 rutinoses	1180,41	1181,41	591,21	394,47	1203,41	1219,41
Terpeno B + glicose + 2 rutinoses	1182,41	1183,41	592,21	395,14	1205,41	1221,41
Terpeno A + glicose + 2 rafinoses	1289,29	1290,29	645,65	430,76	1312,29	1328,29
Terpeno B + glicose + 2 rafinoses	1291,31	1292,31	646,66	431,44	1314,31	1330,31

Terpeno A: terpenos com MM igual a 154,25; Terpeno B: terpenos com MM igual a 156,27.

* Massa do glicosídeo terpênico; ** Aduto de sódio; *** Aduto de potássio.

De acordo com os espectros de massas obtidos dos extratos dos caldos de cana estudados (Figuras 8 e 9), não foram encontrados sinais com intensidades suficientes que pudessem dar subsídios para a confirmação da presença destes glicosídeos terpênicos nas amostras.

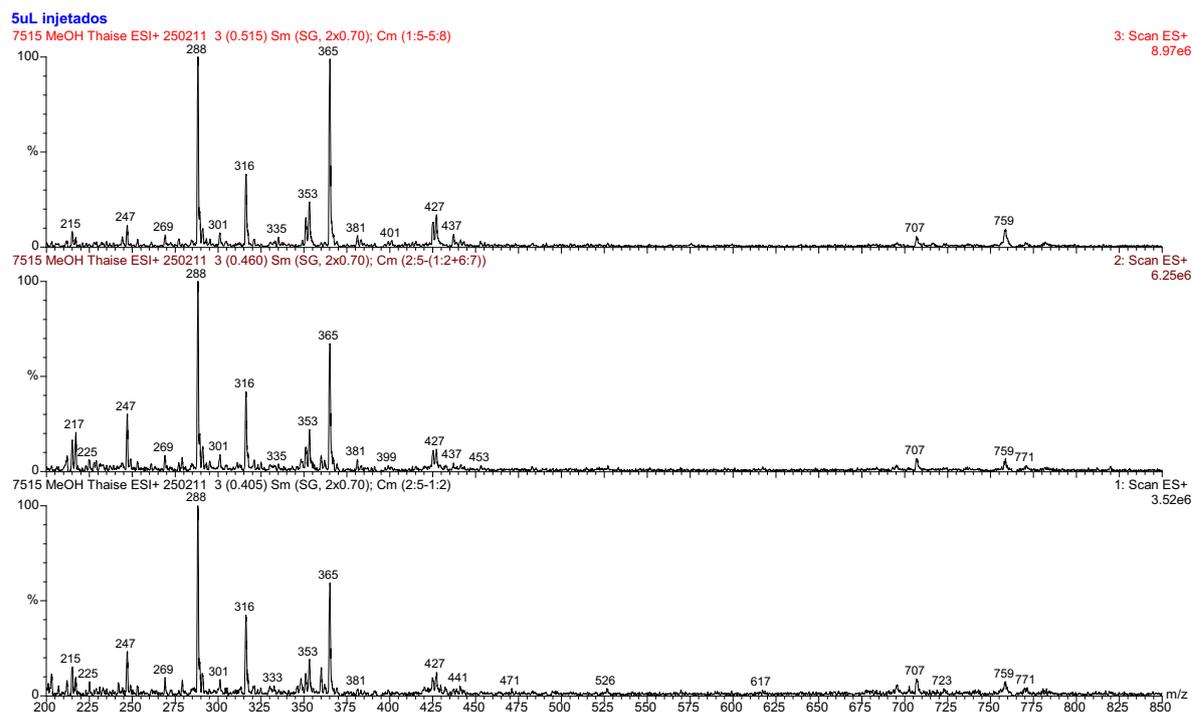


Figura 8. Espectro de massas do caldo da variedade RB86-7515, utilizando como fonte de ionização ESI+.

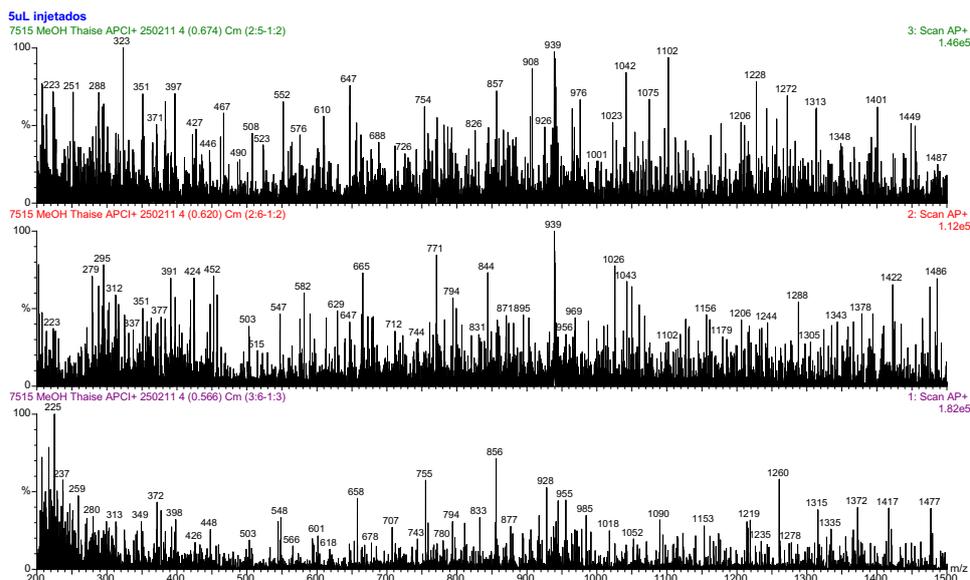


Figura 9. Espectro de massas do caldo da variedade RB86-7515, utilizando como fonte de ionização APCI+.

Esta é uma tarefa desafiadora, pois não há padrões analíticos comercialmente disponíveis destes compostos para a determinação dos limites de detecção (LOD), de quantificação (LOQ), bem como dos fragmentos formados e dos adutos mais abundantes. Acredita-se que seja necessária uma extração mais eficiente destes compostos do caldo de cana para que seja possível a detecção. Não há ainda na literatura trabalhos publicados sobre a identificação e quantificação de glicosídeos terpênicos no caldo de cana.

5.4 APLICAÇÕES DE β -GLICOSIDASES EM CALDO DE CANA

Nos controles não se detectou a presença de nenhum dos terpenos alvos até o limite de detecção de 1 $\mu\text{g/L}$, enquanto que nos caldos tratados, pôde-se confirmar a presença de citronelol, nerol e geraniol abaixo do limite de quantificação de 5 $\mu\text{g/L}$. Terpienol e linalol não foram detectados (Tabela 5 e 6). A ausência destes terpenos livres pode estar associada à ausência dos respectivos precursores glicosídeos no caldo de cana, ou ainda, à baixa especificidade das enzimas para hidrólise de tais compostos. O teor de compostos terpênicos das diferentes variedades de cana foi similar, exceto a variedade em que não foi detectado composto terpênico. Estes resultados podem ser explicados pela influência de diversos fatores na constituição química do caldo, tais como variedade cultivada, características do solo, condições climáticas, grau de amadurecimento e condições de armazenamento.

Tabela 5. Valores médios de terpenos ($\mu\text{g/L}$) encontrados nas amostras de caldo de cana de açúcar tratados com extrato bruto de β -glicosidases do *T. aurantiacus*.

Variedade	Linalol	Terpienol	Citronelol	Nerol	Geraniol
IAC87-3396	-	-	-	-	-
RB83-5486	-	-	105 \pm 73	46 \pm 35	16 \pm 6
SP-79-1011	-	-	151 \pm 93	31 \pm 14	13 \pm 8
RB86-7515	-	-	141 \pm 44	32 \pm 22	16 \pm 3

Tabela 6. Valores médios de terpenos ($\mu\text{g/L}$) encontrados nas amostras de caldo de cana de açúcar tratados com extrato bruto de β -glicosidases do *A. pullulans*.

Variedade	Linalol	Terpienol	Citronelol	Nerol	Geraniol
IAC87-3396	-	-	-	-	-
RB83-5486	-	-	79 \pm 56	17 \pm 2	5 \pm 1
SP-79-1011	-	-	90 \pm 46	9 \pm 2	7 \pm 3
RB86-7515	-	-	91 \pm 28	31 \pm 18	7 \pm 4

Os terpenos, considerados estritamente relacionados com a variedade, são considerados importantes para as características varietais de vinhos (PETKA et al., 2006). Estes compostos podem aparecer na uva tanto na forma livre, que contribuem diretamente para o aroma do vinho, bem como na forma glicosilada, não volátil (GUNATA et al., 1986; WILLIAMS et al., 1995). Existem inúmeros fatores que podem afetar a concentração de compostos aromáticos em uvas e conseqüentemente no vinho, como amadurecimento e variedade da uva, além das condições climáticas e outras condições de cultivo (GARCIA-CARPINTERO et AL., 2011; JACKSON; LOMBARD, 1993).

A temperatura, o tempo de hidrólise e a agitação não alteraram significativamente os valores encontrados nas amostras de caldo. Entretanto os resultados demonstraram maior eficiência da atividade hidrolítica de β -glicosidases do fungo *T. aurantiacus*, característica bastante apreciável, tendo em vista que o rendimento da produção de β -glicosidases é bem maior no extrato deste microrganismo do que no do *A. pullulans* (LEITE et al., 2008).

5.5 APLICAÇÕES DE β -GLICOSIDASES NA PRODUÇÃO DA CACHAÇA

Como foi demonstrada maior eficiência da atividade hidrolítica de β -glicosidases do fungo *T. aurantiacus*, apenas o extrato bruto deste fungo foi utilizado para hidrolisar os glicosídeos terpênicos do caldo de cana (RB86-7515) utilizado na produção da cachaça. As amostras e os controles foram incubados por 30 minutos a 60°C. O controle continha cachaça diluída em tampão sem enzima, e a concentração deste, o pH e a molaridade do tampão foram mantidas idênticas aos da reação.

O extrato enzimático bruto do *T. aurantiacus* apresentou atividade catalítica sobre os precursores aromáticos. As análises por cromatografia gasosa indicaram um significativo aumento na concentração de terpenos livres das amostras de cachaça hidrolisadas com as enzimas (Figura 10). Os terpenos foram identificados pela comparação do tempo de retenção dos respectivos padrões, injetados nas mesmas condições das análises.

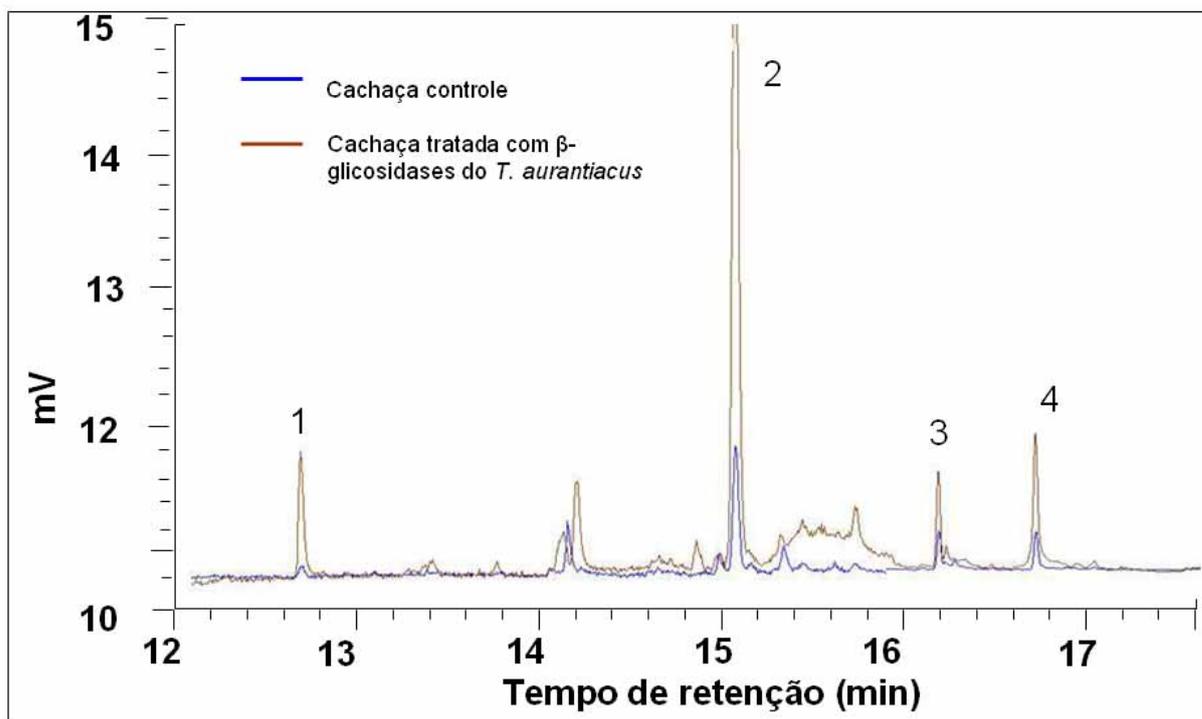


Figura 10. Cromatograma da cachaça controle e da cachaça tratada com o extrato enzimático bruto do *T. aurantiacus*, obtido por GC-MS. 1. Linalol; 2. Terpienol; 3. Nerol; 4. Geraniol.

Para se ter conhecimento da concentração de terpenos nas diferentes frações da cachaça controle e tratada com β -glicosidases, a cabeça, a 1^a. parte do coração, a 2^a. parte do coração e a cauda foram coletadas separadamente e analisadas por GC-MS (Tabela 7 e 8). Pode-se observar que a produção da cachaça concentrou o teor de terpenos encontrado no mosto hidrolisado, uma vez que se efetuou a etapa de destilação do vinho.

Tabela 7. Valores médios de terpenos ($\mu\text{g/L}$) encontrados nas diferentes frações da cachaça controle.

Frações da cachaça	Linalol	Terpineol	Nerol	Geraniol
Cabeça	14 \pm 4	93 \pm 1	-	100 \pm 21
Coração 1 ^a . parte	-	79 \pm 18	-	39 \pm 3
Coração 2 ^a . parte	-	57 \pm 12	-	13 \pm 1
Cauda	-	57 \pm 4	-	-
Total	14	285	-	152

Tabela 8. Valores médios de terpenos ($\mu\text{g/L}$) encontrados nas diferentes frações da cachaça tratada.

Frações da cachaça	Linalol	Terpineol	Nerol	Geraniol
Cabeça	19 \pm 3	88 \pm 14	32 \pm 2	155 \pm 20
Coração 1 ^a . parte	45 \pm 10	178 \pm 18	238 \pm 33	415 \pm 30
Coração 2 ^a . parte	3 \pm 1	70 \pm 5	17 \pm 6	71 \pm 22
Cauda	-	55 \pm 7	1 \pm 0	43 \pm 20
Total	67	391	288	612

Os resultados demonstraram que os terpenos estudados estão em diferentes concentrações nas frações da cachaça, porém que a maior concentração destes compostos está na fração 1^a. parte do coração e em seguida na 2^a. parte do coração.

A eficiência na hidrólise dos terpenos glicosídeos pelo extrato enzimático bruto do *T. aurantiacus* fica bastante evidente quando a concentração dos terpenos voláteis no hidrolisado é expressa em proporção do controle (Tabela 9).

Tabela 9. Concentração de terpenos livres ($\mu\text{g/L}$) presentes na cachaça controle e na tratada com extrato bruto de β -glicosidases do *T. aurantiacus*.

Terpenos	Cachaça controle	Cachaça tratada	Fator de conversão*
Linalol	-	48	48
Terpineol	136	248	2
Nerol	-	255	255
Geraniol	52	486	9

Os resultados correspondem à soma da 1^a. e 2^a. parte do coração. * **Fator de Conversão (FC)**: comparação proporcional entre a quantidade de terpenos voláteis presente na cachaça controle (sem enzima) com a obtida com a hidrólise enzimática (tratada).

Não foi observada a presença de linalol e nerol nos controles até o limite de detecção de $1 \mu\text{g/L}$, entretanto na cachaça tratada com extrato de β -glicosidases a presença de linalol e nerol foi confirmada. Terpineol e geraniol foram detectados em todas as amostras de cachaça, porém teores bem maiores foram encontrados nas amostras de cachaça tratadas com β -glicosidases.

Os resultados obtidos permitem a conclusão de que as β -glicosidases produzidas pelo microrganismo *T. aurantiacus* apresentam potencial para hidrolisar os precursores de aroma da cachaça. Devemos ressaltar que no presente trabalho foram realizadas análises cromatográficas tanto das amostras de caldo hidrolisado como das amostras da cachaça pronta, o que já descarta diversos efeitos inibidores sobre a atividade das enzimas, possibilitando a utilização das mesmas no enriquecimento aromático de cachaças.

5.5.1 Análise físico-química das cachaças

As médias dos resultados obtidos nas análises físico-químicas das amostras de cachaça estão apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10. Resultado das análises físico-químicas das amostras de cachaça.

Análise	Amostras	
	Cachaça controle	Cachaça tratada
Graduação alcoólica (°GL)	45 ± 0	42 ± 0
Acidez Total (mg/100 mL álcool anidro)	13 ± 0	7 ± 0

Os resultados correspondem à média ± desvio padrão de três repetições.

Quanto à acidez total em ácido acético os valores médios dos teores para as amostras controle e tratada foram 13 e 7 mg/100mL álcool anidro, respectivamente, com variação de 6 mg/100 mL álcool anidro. E com relação ao teor alcoólico, as amostras de cachaça apresentaram valores bem próximos, e dentro do teor permitido pela legislação para cachaça.

As médias dos resultados obtidos nas análises dos teores dos componentes químicos das amostras de cachaça estão representadas na Tabela 11.

Tabela 11. Resultados (em mg/100 mL de álcool anidro) das análises dos teores dos compostos orgânicos nas amostras de cachaça.

Composto orgânico	Amostras	
	Cachaça controle	Cachaça tratada
Metanol	< LD	< LD
Álcool-n-propílico	9,2 ± 0,1	9,5 ± 0,2
Álcool isoamílico	61,4 ± 0,8	50,5 ± 3,7
Acetaldeído	5,6 ± 1,7	8,8 ± 0,7
Acetato de etila	1,0 ± 0,0	1,5 ± 0,1

Os resultados correspondem à média ± desvio padrão de três repetições.

LD = Limite de Detecção.

Houve diferença significativa entre o teor de acetaldeído e álcool isoamílico das amostras de cachaça analisadas, porém os valores dos componentes químicos e de qualidade das amostras destas cachaças não ultrapassaram os limites estabelecidos pela legislação.

5.6 ANÁLISE SENSORIAL

5.6.1 Teste discriminativo

Somou-se o número de provadores que acharam a cachaça controle com maior intensidade do atributo especificado (4) e o número de provadores que acharam a cachaça tratada com maior intensidade do atributo avaliado (16). O maior dos números foi selecionado e comparado com a tabela apropriada (Tabela

12). Como era conhecida a priori qual amostra deveria apresentar maior intensidade do atributo avaliado, utilizou-se a tabela do teste pareado monocaudal.

Tabela 12. Parte da tabela para análise do resultado do teste de comparação pareada monocaudal.

n° de respostas	Nível de significância (%)			
	5	3	1	0,1
15	12	12	13	14
...				
20	15	15	16	18

O número de provadores que circularam a amostra escolhida mais frequentemente como a mais intensa (16) foi maior ao número mostrado na tabela apropriada. Portanto, as cachaças testadas diferem entre si ao nível de significância de 1%, e a cachaça tratada apresenta um aroma e sabor floral mais intenso do que a cachaça controle.

5.6.2 Teste de aceitação

Os valores mínimos e máximos atribuídos às amostras de cachaça estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Valores mínimos e máximos obtidos para as amostras de cachaça no teste de aceitação.

Atributos	Valor Mínimo		Valor Máximo	
	Cachaça controle	Cachaça tratada	Cachaça controle	Cachaça tratada
Aroma	4	5	7	9
Sabor	2	2	8	9
Impressão global	4	4	8	9

As amostras de cachaça diferiram entre si ao nível de significância de 5% em todos os atributos analisados, aroma, sabor e impressão global (Tabela 14).

Tabela 14. Médias* de aceitação para cada atributo das duas amostras de cachaça.

Atributos	Cachaça Controle (DP)	Cachaça Tratada (DP)
Aroma	6,0 (1,0) ^a	7,1 (1,0) ^b
Sabor	5,6 (1,5) ^a	6,5 (1,6) ^b
Impressão Global	5,9 (1,3) ^a	6,6 (1,1) ^b

* Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre si significativamente ($p < 0,05$).

A cachaça tratada com β -glicosidases apresentou maior aceitação do que a cachaça controle em todos os atributos avaliados. A Figura 11 mostra a distribuição da aceitação para cada atributo das duas amostras.

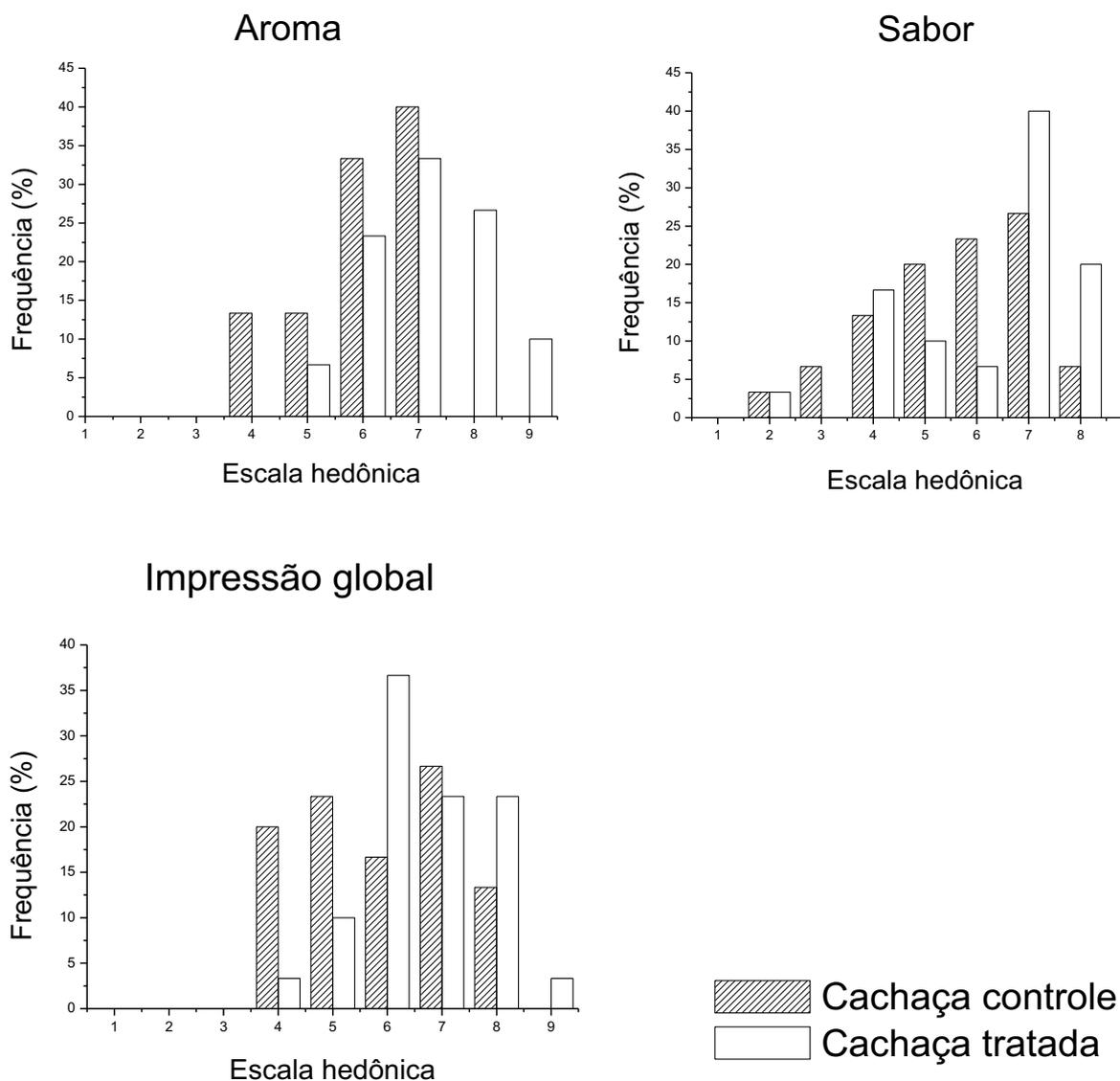


Figura 11. Distribuição dos provadores (%) segundo escala hedônica estruturada de nove pontos para as duas amostras de cachaça.

Observou-se divergência na distribuição das notas para aroma, sabor e impressão global entre as duas amostras. Com relação ao atributo aroma houve nota 8 e 9 apenas para a cachaça tratada e notas abaixo de 4 apenas para a cachaça controle. Maior frequência de notas 7, 8 e 9 para o sabor, e 8 e 9 para a impressão global foi observada para a cachaça tratada. Todas essas diferenças

entre as freqüências das notas foram as responsáveis pelas maiores médias para a cachaça tratada. E de forma geral há uma tendência do aumento da frequência de acordo com o aumento da escala hedônica para a cachaça tratada. Estes resultados corroboram com dados obtidos em testes de aceitação realizados com cachaças comerciais, que demonstraram relação entre boa aceitação do aroma e a presença de alguns terpenos (JANZANTTI, 2004).

5.6.3 Teste de preferência

O número de provadores que circularam o código da cachaça controle como preferida foi oito, enquanto que vinte e dois provadores escolheram a cachaça tratada como preferida. O maior dos números foi selecionado e comparado com a tabela apropriada (Tabela 15).

Tabela 15. Dados extraídos da tabela usada para análise dos resultados do teste pareado-preferência.

n° de respostas	Nível de significância (%)			
	10	5	1	0,1
15	12	12	13	14
...				
30	20	21	23	25

O número de provadores que preferiu a cachaça tratada foi maior que o apresentado na tabela. Sendo assim, a cachaça tratada foi preferida em relação à cachaça controle ao nível de 5% de significância.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos indicam que embora os glicosídeos terpênicos não tenham sido detectados no caldo de cana através da metodologia utilizada, pode-se constatar que o uso de β -glicosidases no processo de produção da cachaça pode aumentar o teor de terpenos livres e conseqüentemente contribuir para o aroma e sabor desta bebida.

O extrato enzimático do *T. aurantiacus* obtido por fermentação do farelo de trigo apresentou maior atividade de β -glicosidases do que o extrato enzimático da *A. pullulans*. Maior estabilidade à estocagem por cinco meses à -18°C da atividade de β -glicosidases foi encontrada para o extrato armazenado na forma bruta do que na forma de extrato concentrado.

A atividade catalítica β -glicosidase sobre os precursores glicosídicos do caldo de cana foi comprovada. Tanto o extrato enzimático bruto da *A. pullulans* e do *T. aurantiacus* hidrolisaram os terpenos glicosídeos presentes no caldo de cana, sendo que o extrato enzimático do *T. aurantiacus* apresentou maior eficiência hidrolítica. Além disso, 30 minutos foram considerados tempo suficiente para atividade hidrolítica de β -glicosidases sobre terpenos glicosídeos do caldo de cana, e a agitação não influenciou no processo da hidrólise.

Diferença no teor de terpenos livres presentes no caldo de distintas variedades de cana-de-açúcar foi encontrada, já que das quatro variedades estudadas três apresentaram teores similares de terpenos livres, porém em uma delas não foi detectado nenhum dos terpenos em estudo. Esses dados demonstram a importância de se estudar os terpenos glicosilados do caldo de

cana, de forma a identificá-los, quantificá-los e caracterizar variedades de cana quanto ao teor destes precursores aromáticos.

O emprego de β -glicosidases produzidas por *T. aurantiacus* no processo de fermentação contribuiu para o aumento do teor de terpenos na cachaça, e, além disso, não afetou os padrões físico-químicos exigidos pela legislação. A cachaça produzida com a utilização do extrato de β -glicosidases apresentou um aroma e sabor floral mais intenso do que o da cachaça produzida sem a adição de β -glicosidases. A aceitação da cachaça tratada foi maior do que o da cachaça controle em todos os atributos avaliados: aroma, sabor e impressão global. Além disso, entre as duas amostras de cachaça analisadas, a tratada com extrato de β -glicosidases foi preferida.

Os resultados obtidos evidenciam que o uso de β -glicosidases exógenas ao processo fermentativo é uma ótima opção para o enriquecimento de terpenos na cachaça, e estimulam a continuidade do trabalho, a fim de identificar os precursores terpênicos e analisar descritivamente a influencia dos terpenos na contribuição sensorial positiva ou negativa, além de realizar um mapeamento das melhores variedades de cana para produção de cachaça em termos de terpenos e estabelecer uma metodologia de produção industrial.

7. REFERÊNCIAS

ARÉVALO-VILLENNA M., UBEDA-IRANZO, J. F.; BRIONES-PERÉZ, A. I. Enhancement of Aroma in White Wines Using a β -glucosidase Preparation From *Debaryomyces pseudopolymorphus* (A-77). **Food Biotechnology**, V.21, p.181–194. 2007.

ARYAN, A. P.; WILSON, B.; STRAUSS, C. R.; WILLIAMS, P. J. The properties of glycosidases of *Vitis Vinifera* and a comparison of their β -glucosidase activity with that of exogenous enzymes. An assessment of possible application in enology. **American Journal Enology and Viticulture**, v. 38, p. 182-188. 1987.

BARBAGALLO, R. N.; SPAGNA, G.; PALMERI, R.; RESTUCCIA, C.; GIUDICI, P. Selection, characterization and comparison of β -glucosidase from mould and yeasts employable for enological applications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 58-66. 2004.

BELANCIC, A.; GUNATA, Z.; VALLIER, M. J.; AGOSIN, E. β -Glucosidase from the grape native yeast *Debaryomyces vanriijiae*: purification, characterization, and its effect on monoterpene content of a Muscat grape juice. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, p. 1453–1459. 2003.

BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V. S. Microbial B-glucosidases: cloning, properties, and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, p. 375-407, 2002.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, portaria 371 de 1997.

BRASIL. Instrução Normativa nº13 de 29 de junho de 2005. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Aguardente de Cana e para Cachaça. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 30 junho de 2005, Seção 1, p. 3.

BOSCOLO, M.; BEZERRA, C.W.B.; CARDOSO, D. R.; LIMA NETO, B. S.; FRANCO, D. W. Identification and dosage by HRGC of minor alcohols and esters in Brazilian sugar-cane spirit. **Journal of the Brazilian Chemistry Society**, v. 11, n. 1, p. 86-90, 2000.

CARDELLO, H. M. A. B.; FARIA J. B. Análise descritiva quantitativa da aguardente de cana durante envelhecimento em tonel de carvalho (*Quercus alba* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 2, p. 169-175, 1998.

CARDELLO, H.M.A.B.; FARIA, J.B. Análise da aceitação de aguardentes de cana por testes afetivos e Mapa de Preferência Interno. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, p. 32-36, 2000.

CARDOSO, D. R.; ANDRADE-SOBRINHO, L. G.; LEITE-NETO, A. F.; RECHE, R. V.; ISIQUE, W. D.; FERREIRA, M. M. C.; LIMA-NETO, B. S.; FRANCO, D. W. Comparison between cachaça and rum using pattern recognition methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3429-3433, 2004.

CARRAU, F. M.; MEDINA, K.; BOIDO, E.; FARINA, L.; GAGGERO, C.; DELLACASSA, E.; VERSINI, G.; HENSCHKE, P. A. De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. **FEMS Microbiology Letters**, v. 243, p. 107-115. 2005.

CHAROENCHAI, C.; FLEET, G. H.; HENSCHKE, P. A.; TODD, B. E. N. Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. **Journal of Grape and Wine Research**, v. 3, p. 2-8. 1997.

COLOMBO, R.; YARIWAKE, J.H.; QUEIROZ, E.F.; NDJOK, K.; HOSTETTMANN, K. On-line identification of further flavone C- and O-glycosides from sugarcane (*Soccharum officinarum* L., Gramineae) by HPLC-UV-MS. **Phytochemical Analysis**. v. 17, p. 337-343, 2006.

CORDERO-OTERO, R. R.; UBEDA-IRANZO, J. F.; BRIONES-PEREZ, A. I.; POTGIETER, N.; ARÉVALO-VILLENA, M.; PRETORIUS, I. S.; VAN RENSBURG, P. Characterisation of α -glucosidase activities in non-*Saccharomyces* wine-related yeasts. **Journal of Food Science**, v. 68, p. 2564-2569, 2003.

DATO, M. C. F.; PIAZAURO J. R., J. M.; MUTTON, M. J. R. Analysis of the secondary compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* and wild yeasts strains during the production of cachaça. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 36, p. 70-74. 2005.

DE-SOUZA, M. D.; VÁSQUEZ, P.; DEL-MASTRO, N. L.; ACREE, T. E.; LAVIN, E. H. Characterization of cachaça and rum aroma. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 54, p. 485-488. 2006.

DEGENHARDT, J.; GERSHENZON, J.; BALDWIN, I. T.; KESSLER, A. Attracting friends to feast on foes: engineering terpene emission to make crop plants more attractive to herbivore enemies. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, p. 169-176. 2003.

DELCROIX, A.; GUNATA, Z.; SAPIS, J. C.; SALMON, J. M.; BAYONOVE, C. Glycosidase activities of three enological yeast strains during wine making. Effect on the terpenol content of Muscat wine. **American Journal Enology and Viticulture**, v. 45, p. 291-296, 1994.

DI STEFANO, R.; MAGIOROTTO, G.; GIANOTTI, S. Transformazioni di nerolo e geraniolo indotte dai lieviti. **Rivista di Viticoltura e di Enologia**, v. 42, p. 43-49. 1992.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; NEGRI, G.; SALATINO, A.; DE CARVALHO, J.E.; LAJOLO, F.M. Antiproliferative and antioxidant activities of a tricin acylated glycoside from sugarcane (*Saccharum officinarum*) juice. **Phytochemistry**. v. 68, p. 1165-1171, 2007.

DUGELAY, I.; GUNATA, Z.; SAPIS, J. C.; BAUMES, R.; BAYONOVE, C. Etude de l'origine du citronellol dans les vins. **Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin**, v. 26, p. 177-184. 1992.

FARIA, J. B.; FRANCO, D. W.; CARDELLO, H. M. A. B.; BÔSCOLO, M.; LIMA NETO, B. S. Avaliação sensorial de aguardente de cana (*Saccharum officinarum* L.) durante o envelhecimento em tonéis de carvalho. **Revista Brasileira de Análise de Alimentos**, v. 1, n. 1, p. 7-16, 1995.

FARIA, J. B., 2003. **Cachaca the Brazilian Sugar Cane Spirit**. In: Fermented Beverage Production, LEA, A. G. H.; PIGGOT, J. R. (Eds.). 2th Edn. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp: 335-360.

FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M.; DI STEFANO, R.; BRIONES, A. Hydrolysis and transformation of terpene glycosides from Muscat must by different yeast species. **Food Microbiology**, v. 20 p. 35-41. 2003.

FERNÁNDEZ, M.; UBEDA, J. F.; BRIONES, A. I. Typing of non- *Saccharomyces* yeasts with enzymatic activities. **International Journal of Food Microbiology**, v. 59, p. 29-36. 2000.

FUNDIRA, M.; BLOM, M.; PRETORIUS, I. S.; VAN RENSBURG, P. Comparison of commercial enzymes for the processing of marula pulp, wine, and spirits. **Journal of Food Science**, v. 67, p. 2346-2351. 2002.

GAMERO, A.; HERNÁNDEZ-ORTE, P.; QUEROL, A.; FERREIRA, V. Effect of aromatic precursor addition to wine fermentations carried out with different *Saccharomyces species* and their hybrids. **International Journal of Food Microbiology**, v. 147, p. 33–44. 2011a.

GAMERO, A.; MANZANARES, P.; QUEROL, A.; BELLOCH, C. Monoterpene alcohols release and bioconversion by *Saccharomyces species* and hybrids. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, p. 92–97. 2011b.

GARCIA-CARPINTERO, E. G.; SANCHEZ-PALOMO, E.; GONZALEZ-VIÑAS, M. A. Aroma characterization of red wines from cv. Bobal grape variety grown in La Mancha region. **Food Research International**, v.44, p. 61–70. 2011.

GERSHENZON, J.; DUDAREVA, N. The function of terpene natural products in the natural world. **Nature Chemical Biology**, v.3, p.408-414, 2007.

GIL, J. V.; MANZANARES, P.; GENOVÉS, S.; VALLÉS, S.; GONZÁLES-CANDELAS, L. Over-production of the major exoglucanase of *Saccharomyces cerevisiae* leads to an increase in the aroma of wine. **International Journal of Food Microbiology**, v. 103, p. 57-68, 2005.

GUEGUEN, Y.; CHEMARDIN, P.; JANBON, G.; ARNAUD, A.; GALZY, P. A Very Efficient β -Glucosidase Catalyst for the Hydrolysis of Flavor Precursors of Wines and Fruit Juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 2336-2340. 1996.

GUEGUEN, Y.; CHEMARDIN, P.; PIEN, S.; ARNAUD, A.; GALZY, P. Enhancement of aromatic quality of Muscat wine by the use of immobilized β -glucosidase. **Journal of Biotechnology**, v. 55, p. 151-156, 1997.

GUNATA, Y. Z.; BAYONOVE, C. L.; BAUMES, R. L.; CORDONNIER, R. E. Stability of free and bound fractions of some aroma components of grapes cv. Muscat during the wine processing. Preliminary results. **American Journal Enology and Viticulture**, v. 37, p. 112-114. 1986.

GUNATA, Z.; DUGELAY, I.; SAPIS, J. C.; BAUMES, R.; BAYONOVE, C. Action dès glycosidases exogènes au cours de la vinification: Liberation de l'arôme à partir dès précurseurs glycosidiques. **Journal International des Sciences de la**

Vigne et du Vin, v. 24, p. 133-144, 1990.

HAYASHI, S.; SAKO, S.; YOKOI, H.; TAKASAKI, Y.; IMADA, K. Purification and characterization of the intracellular β -glucosidase from *Aureobasidium* sp ATCC 20524. **Journal of Industrial Microbiology e Biotechnology**, v. 22, p. 160-163, 1999.

HEMINGWAY K.M.; ALSTON, M.J.; CHAPPELL, C.G.; TAYLOR, A.J. Carbohydrate-flavour conjugates in wine. **Carbohydrate Polymers**, v. 38, p. 283–286, 1999.

HERNANDÉZ, L. F.; ESPINOSA, J. C.; FERNANDEZ, M.; BRIONES, A. β -Glucosidase activity in a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 80, p. 171-176. 2003.

IAL – Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análises de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2005. 1018p.

JACKSON, D. I.; LOMBARD, P. B. Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality: A review. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 44, p. 409–430. 1993.

JANZANTTI, N. S. Compostos Voláteis e Qualidade de Sabor da Cachaça. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas, São Paulo, 2004.

KALOGERIS, E.; CHRISKOPOULOS, P.; KATAPODES, P.; ALEXIOU, A.; VLACHOU, S.; KEKOS, D.; MADRIS, B. J. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural wastes. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1099-1104. 2003.

LAIRSON, L. L.; HENRISSAT, B.; DAVIES, G. J.; WITHERS, S. G.

Glycosyltransferases: Structures, Functions, and Mechanisms. **Annual Review of Biochemistry**, v. 77: p.521-555. 2008.

LEE, K. Y. M.; PATERSON, A.; PIGGOTT, J. R.; RICHARDSON, G. D. Perception of whisky flavour reference compounds by Scottish distillers. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 106, p. 203-208. 2000.

LEITE, R. S. R. Purificação, caracterização físico-química e termodinâmica de β -glicosidases produzidas pelos microrganismos *aureobasidium pullulans* e *thermoascus aurantiacus*: aplicação em isoflavonas e terpenos glicosilados. **Tese de doutorado**. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 2007.

LEITE, R. S. R.; BOCCHINI, D. A.; MARTINS, E. S.; SILVA, D.; GOMES, E.; SILVA, R. Production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes from *Aereobasidium pullulans* on solid state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137, p. 281-288, 2008.

MAIA A. B. Componentes secundários da aguardente. **STAB**, Piracicaba, v. 12, n. 6, p. 29-34, 1994.

MAICAS, S.; MATEO, J. J. Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: a review. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 67, p. 322-335, 2005.

MARTINS, E. Produção de enzimas pectinolíticas pelo fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* através de fermentação em estado sólido utilizando resíduos agro-industriais 2003. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.

MATEO, J. J.; DI STEFANO, R. Description of the β -glucosidase activity of wine yeasts. **Food Microbiology**, v. 14, p. 583-591. 1997.

MATEO, J. J.; JIMÉNEZ, M. Monoterpenes in grape juice and wines. **Journal of Chromatography A**, v. 881, p. 557-567, 2000.

MENDES, L. M.; MORI, F. A.; TRUGILHO, P. F. Potencial da madeira de agregar valor à cachaça de alambique. **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, v. 23, n. 217, p. 52-58, 2002.

MENDES-FERREIRA, M. A.; CLÍMACO, M. C.; FAIA, A. M. The role of non-*Saccharomyces* species in releasing glycosidic bound fraction of grape aroma components – a preliminary study. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 67-71. 2001.

MINIM, V. P. R. **Análise sensorial: estudos com consumidores**. Viçosa, Ed. da UFV. 2006. p. 225.

NONATO, E. A.; CARAZZA, F.; SILVA, F. C.; CARVALHO, C. R.; CARDEAL, Z. L. A headspace solid-phase microextraction method for the determination of some secondary compounds of Brazilian Sugar Cane Spirits by gas chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 3533-3539, 2001.

PANDEY, A. Recent process-developments in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v.27, p.109-117, 1992.

PEÑA-ALVARÉZ, A.; CAPELLA, S.; JUÁREZ, R.; LABASTIDA, C. Determination of terpenes in tequila by solid phase microextraction-gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1134, p. 291-297. 2006.

PETKA, J.; FERREIRA, V.; GONZALEZ-VIÑAS, M. A.; CACHO, J. Sensory and chemical characterization of the aroma of a white wine made with Devin grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 909–915. 2006.

PINHO P. G., FALQUE, E.; CASTRO, M.; SILVA, H.; MACHADO, B.; FERREIRA, A. C. S. Further insights into the floral character of Touriga Nacional wines. **Journal of Food Science**, v. 72, p. 396-401. 2007.

PIÑO, A. J. Characterization of rum using solid-phase microextraction with gas chromatography–mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 104, p. 421-428. 2007.

Programa Brasileiro de Desenvolvimento da Aguardente de Cana - PBDAC, disponível em [http. www.pbdac.com.br](http://www.pbdac.com.br) Acesso em 18 dez. 2007.

RAPP, A.; MANDERY, H. Wine aroma. **Experientia**, v. 42, p. 873-884. 1986.

ROCHAT,D.; MEILLOUR, P. N.; ESTEBAN-DURAN, J. R.; MALOSSE, C.; PERTHUIS, B.; MORIN, J. P.; DESCOINS, C. Identification of pheromone synergists in American Palm Weevil, *Rhynchophorus palmarum*, and attraction of related *Dynamis borassi*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, p. 155-187. 2000.

ROSI, I.; VINELLA, M.; DOMIZIO, P. Characterization of β -glucosidase activity in yeasts of oenological origin. **Journal of Applied Microbiology**, v. 77, p. 519-527. 1994.

SAHA, B. C.; FREER, S. N.; BOTHAST, R. J. Production, purification and properties of thermostable β -glucosidase from a color variant strain of *Aureobasidium pullulans*. **Applied and Environmental Microbiology Oct.**, v. 60, p. 3774-3780. 1994.

SCHEHL, B.; SENN, T.; LACHENMEIER, D.W.; RODICIO, R.; HEINISCH, J. J. Contribution of the fermenting yeast strain to ethyl carbamate generation in stone fruit spirits. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, p. 843-850. 2007.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro,Ed LTC. 2000. p. 460.

SPAGNA,G.; BARBAGALLO, R. N.; GRECO, E.; MANENTI, I.; PIFFERI, P. G. A mixture of purified glycosidases from *Aspergillus niger* for oenological application immobilised by inclusion in chitosan gels. **Enzyme and Microbial Technology**, v.

30, p. 80-89. 2002.

STRAUSS, M. L. A.; JOLLY, N. P.; LAMBRECHTS, M. G., VAN RENSBURG, P. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-Saccharomyces wine yeasts. **Journal Applied Microbiology**, v. 91, p. 182-190. 2001.

TAKARA, K.; OTSUKA, K.; WADA, K.; IWASAKI, H.; YAMASHITA, M. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity and tyrosinase inhibitory effects of constituents of sugarcane molasses. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. v. 71, p.183-191. 2007.

TRAON-MASSON, M. P.; PELLERIN, P. Purification and characterization of two β -D-glucosidases an *Aspergillus niger* enzyme preparation: affinity and specificity toward glucosylated compounds characteristic of the processing of fruits. **Enzyme Microbial Technology**, v. 22, p. 374-382, 1998.

VILLENA, M. A.; IRANZO, J. U.; PÉREZ, A. B. Relationship between *Debaryomyces pseudopolymorphus* enzymatic extracts and release of terpenes in wine. **Biotechnology Progress**, v. 22, p. 375-381, 2006.

WILLIAMS, P. J.; CYNKAR, W.; FRANCIS, I. L.; GRAY, J. D.; HAND, P. G.; COOMBE, B. G. Quantification of glycosides in grapes, juices, and wines through a determination of glycosyl glucose. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 121-128. 1995.

WITHERS S. T.; KEASLING J. D. Biosynthesis and engineering of isoprenoid small molecules. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, p. 980-990. 2007.

WOODWARD, J.; WISEMAN, A. Fungal and other β -glucosidases-their properties and applications. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 4, p. 73-79, 1982.

ZOECKLEIN, B.W.; MARCY, J. E.; WILLIAMS, J. M.; JASINSKI, Y. Effect of native yeasts and selected strains of *Saccharomyces cerevisiae* in glycosyl glucose, potential volatile terpenes, and selected aglycones of White Riesling (*Vitis vinifera* L.) wines. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 10, p. 55-65. 1997.

ZOELLNER, H.; GIEBELMANN, R. Cyanogenic glycosides in food - Cultural historical remarks. **Deutsche Lebensmittel-Rundschau**, v.103, p.71-77, 2007.

ANEXO

ANEXO 1



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE

(Conselho Nacional de Saúde, Resolução 196/96)

Você está sendo convidado a participar como voluntário do projeto de pesquisa "Aplicação de β -glicosidases na produção de aguardente de cana" sob responsabilidade da pesquisadora Thaise Mariá Tobal. O estudo será realizado através de análises sensoriais de cachaça para estudo do perfil sensorial e de aceitação. A pesquisa oferecerá risco mínimo à saúde, pois os produtos a serem experimentados, que são de consumo comum, serão fabricados sob rígidos controles de higiene. Você poderá consultar o pesquisador responsável em qualquer época, pessoalmente ou pelo telefone da instituição, para esclarecimento de qualquer dúvida. Você está livre para, a qualquer momento, deixar de participar da pesquisa. Todas as informações por você fornecidas e os resultados obtidos serão mantidos em sigilo, e estes últimos só serão utilizados para divulgação em reuniões e revistas científicas. Você será informado de todos os resultados obtidos, independentemente do fato destes poderem mudar seu consentimento em participar da pesquisa. Você não terá quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. No caso de eventual problema de saúde (efeito adverso) decorrente de sua participação nos testes sensoriais, você será encaminhado à Seção Técnica de Saúde (UNAMOS), situado à Rua Cristóvão Colombo, 2265 – Jardim Nazareth – São José do Rio Preto/SP – Telefones (17) 3221.2415 – 3221.2416 – 3221.2485. Este estudo é importante porque seus resultados fornecerão informações sobre as características sensoriais de cachaças tratadas, com a perspectiva de melhorar sua qualidade sensorial. Diante das explicações, se você concorda em participar deste projeto, por favor, assin e forneça os dados solicitados.

Nome: _____ R.G. _____
Endereço: _____ Fone: _____
Email: _____ Idade: _____
_____ de _____ de 2010

Usuário ou responsável legal

Pesquisador responsável

OBS.: Termo apresenta duas vias, uma destinada ao usuário ou seu representante e a outra ao pesquisador.

Nome: Thaise Mariá Tobal	Cargo/Função: Doutorando
Instituição: Departamento Alimentos e Nutrição/FCF/UNESP	
Endereço: Rodovia Araraquara – Jaú, Km - Araraquara/SP. (17) 91411508 - thaisetobal@yahoo.com.br	
Projeto submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do IBILCE/UNESP	
São José do Rio Preto – fone 17-3221.2456	

ANEXO 2



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto



PARECER CONSUBSTANCIADO

PROJETO DE PESQUISA

IDENTIFICAÇÃO

Nome do pesquisador: Thaise Mariá Tobal
Departamento: Alimentos e Nutrição
Instituição: FCF/UNESP
Projeto: "Aplicação de β -glicosidases na produção de aguardente de cana"
Protocolo: 0023.0.229.000-10 de 25/08/2010

PARECER nº 082/10

O presente trata de atendimento referente ao parecer nº 071/10, do projeto de pesquisa intitulado "Aplicação de β -glicosidases na produção de aguardente de cana". Impulsionados pela necessidade de conquista de novos mercados, produtores de cachaça têm buscado a melhoria da qualidade de seus produtos de forma a atender aos requisitos legais de composição química e, principalmente, das propriedades sensoriais da bebida, visto que as exportações ainda não ultrapassam a 1% da produção total. A reduzida procura internacional por cachaça deve-se em parte às questões de marketing e as suas características sensoriais. A classe dos terpenos é responsável pelo atributo sensorial floral dos vinhos e destilados em geral, e normalmente os compostos terpênicos estão presentes nos vegetais em duas formas: livres e glicosilados. Os glicosídeos terpênicos podem ser hidrolisados por β -glicosidases endógenas ou exógenas ao sistema em estudo. O objetivo é estudar a aplicação de β -glicosidases produzidas por microorganismos não-*Saccharomyces* na produção de aguardente de cana, visando uma maior liberação de compostos flavorizantes, em especial os monoterpenos para a obtenção de aguardentes com atributo sensorial floral mais intenso. Para a avaliação sensorial da cachaça produzida, inicialmente participarão um grupo de 160 indivíduos, constituído por alunos de graduação e pós-graduação, professores e funcionários do IBILCE/UNESP, que através de um questionário responderão questões sobre faixa etária, sexo, frequência de consumo de cachaça em geral. A partir das respostas dos dados, no mínimo 50 provadores serão selecionados para participar da pesquisa, considerando-se o interesse e a disponibilidade de cada um. A presente proposta de pesquisa tem como objetivo geral investigar o emprego de complexos enzimáticos contendo principalmente β -glicosidases produzidas por microorganismos não-*Saccharomyces* termofílicos e mesofílicos para obtenção de melhorias nas propriedades sensoriais com o aumento de terpenóides livres na cachaça, e a avaliação sensorial será feita por no mínimo 50 juízes selecionados de um grupo de 160 pessoas. A metodologia no contexto da química, microorganismos, produção enzimática, atividade enzimática, tratamento enzimático do caldo da cana-de-açúcar, caracterização química do caldo da cana, fermentação alcoólica, destilação e caracterização cromatográfica das aguardentes de cana são adequados aos objetivos propostos. A análise sensorial envolvendo a descrição dos propósitos e critérios de seleção dos indivíduos, testes afetivos de preferência e de aceitabilidade, análise descritiva quantitativa, descrição das amostras de aguardente, análise estatística dos dados e apresentação de resultados são adequados. As cachaças formuladas podem apresentar algum tipo de risco para indivíduos com problemas específicos e, para proteção de qualquer risco eventual relacionado a ingestão de ingredientes que por alguma deficiência metabólica o indivíduo esteja proibido de consumir, está ilustrado no TCLE o alerta para indivíduos com intolerância ao etanol. Para a condução dos testes efetivos de preferência ou aceitabilidade serão selecionados o provadores que fazem parte do grupo da



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto



população que consome a cachaça moderadamente. Serão requisitados indivíduos adultos, preferencialmente entre 18 e 40 anos, que em geral gozam de boa saúde, podendo ser de ambos os sexos e, neste contexto a casuística é adequada. São apresentadas todas as declarações exigidas pela Resolução CNS 196/96 para cumprimento e formalização do projeto. Há comprovação de experiência em pesquisa relacionada com a temática do projeto por parte do pesquisador e do orientador, que são corroboradas pelos respectivos curriculum vitae. Frente a solicitação deste CEP no parecer anterior a pesquisadora apresentou novo formulário do TCLE, onde consta que a pesquisa não oferecerá risco, foi alterado para "A pesquisa oferecerá risco mínimo à sua saúde, ...". E também alterou no TCLE incluindo seu telefone ou e-mail de contato.

Em função do exposto, este CEP considera:

Aprovado;

Com pendência. Máximo de 60 (sessenta) dias para atendimento;

Retirado;

Não Aprovado;

Aprovado, encaminhamento para apreciação da CONEP

São José do Rio Preto, 04 de outubro de 2010.

Prof. Dra. Claudia Regina Bohini Domingos
Coordenadora Eventual do CEP

ARTIGO ORIGINAL

TÍTULO: Hydrolysis of terpenyl glucosides in sugar cane juice by exogenous fungal β -glucosidases.

AUTORES:

Thaise M. Tobal^a; Rodrigo S.R. Leite^b; Roberto da Silva^c; Eleni Gomes^c;
João B. Faria^a; Maurício Boscolo^{c*}.

^a *Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP. Rodovia Araraquara-Jaú, km 1, 14801-902 – Araraquara-SP, Brazil. E-mail: Tobal, Thaise; thaisetobal@yahoo.com.br; Faria, João; fariajb@fctar.unesp.br*

^b *Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Faculdade de Ciências Biológicas. Rodovia Dourados - Itahum, km 12 Campus II, 79804-970 - Dourados, MS – Brazil. E-mail: Leite, Rodrigo; simoesbio@yahoo.com.br*

^c *Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (IBILCE-UNESP). Av. Cristovão Colombo, 2265, Nazareth, 15054-000 - São José do Rio Preto, SP, Brazil. E-mail: da Silva, Roberto; dasilva@ibilce.unesp.br; Gomes, Eleni; eleni@ibilce.unesp.br; Boscolo, Maurício; boscolo@ibilce.unesp.br*

Dr. Maurício Boscolo (corresponding author)

E-mail address: boscolo@ibilce.unesp.br

Phone: +55-17-32212477; Fax: +55-17-32212356

Este artigo é parte da tese de doutorado: APLICAÇÃO DE β -GLUCOSIDASES PRODUZIDAS PELOS MICRORGANISMOS *Aureobasidium pullulans* E *Thermoascus aurantiacus* AO PROCESSO FERMENTATIVO DA AGUARDENTE DE CANA COM FOCO NA PRODUÇÃO DE TERPENOS.

Local: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP - Araraquara/SP.

Ano da apresentação: 2011

* enviado para a Revista European Food Research

Abstract

Glycosylated terpenes found in vegetable matrices are odorless and have no significant contribution to sensory properties of foods and beverages, but deglycosylated monoterpenes present in distilled beverages contribute to the floral sensory attribute. Deglycosylated terpenes can be obtained by the action of hydrolytic enzymes, such as β -glucosidases. Sugar cane is the raw material of many spirits produced in Latin America (e.g. Brazilian cachaça, Caribbean rum etc.) and in order to develop deglycosylated terpenes content in sugar cane juice, two species of microorganisms producers of β -glucosidases were selected (*Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756 and *Aureobasidium pullulans* ER-16). The enzymatic complexes were added to the juices from four sugar cane varieties (IAC87-3396, RB83-5486, SP79-1011 and RB86-7515). These samples were kept in pH 4.5 and under different conditions of temperature, agitation and hydrolysis time. The quantification of the deglycosylated monoterpenes was performed by headspace solid-phase micro-extraction in a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer (HS-SPME-GC/MS). No terpenic compounds were found in the original juices, but citronellol, nerol and geraniol were found in the treated sugar cane juices in the range of micrograms per liter, except for variety IAC87-3396. Results have shown that the use of exogenous β -glucosidases in the production process of sugar cane spirits can be applied to improve aroma.

Keywords: *Enzymatic hydrolysis; β -glucosidase; Thermoascus aurantiacus; Aureobasidium pullulans; Brazilian sugar cane spirit; terpenes.*

1 Introduction

During the alcoholic fermentation of sugar cane spirits like Brazilian cachaça and rum, secondary components such as aldehydes, higher alcohols, esters, furans, organic acids among others are produced besides ethanol, and are responsible for their sensory characteristics. Volatile terpenic compounds are also present in alcoholic beverages in sub mg/L level and contribute to the floral sensory attribute (Lee, Paterson, Piggott, & Richardson, 2000; Pinho, Falque, Castro, Silva, Machado, & Ferreira, 2007).

Terpenes are secondary constituents of plants and are usually found in glucosylated forms (Maicas, & Mateo, 2005; Mateo, & Jiménez, 2000; Withers, & Keasling, 2007) as shown in Fig. 1, which are odorless and have no contribution to the sensory properties of foods and beverages (Fernández-González, Di Stefano, & Briones, 2003; Gunata, Dugelay, Sapis, Baumes, & Bayonove, 1990). Deglucosylated terpenes or terpenic aglycones can be obtained by the action of hydrolytic enzymes such as β -glucosidases (Fig. 2).

Insert here Fig. 1

Insert here Fig. 2

According to the review published by Maicas and Mateo (2005), there are divergences about the contribution of *S. cerevisiae* to developing terpenic compounds in alcoholic beverages. Delcroix et al. (1994) have observed that *S. cerevisiae* contribute to the terpenes in wines, but on the other hand Rosi et al. (1994), Gunata et al. (1986), and Rapp and Mandery (1986) have no observed any contribution.

Monoterpenes biosynthesis by *S. cerevisiae* even in the absence of glucosides monoterpenic compounds but in high concentrations of assimilable nitrogen was demonstrate by Carrau et al. (2005). Studies about the hydrolytic capacity of non-*Saccharomyces* yeasts to develop aromas in wine have been

done (Charoenchai, Fleet, Henschke, & Todd., 1997; Fernández-González et al., 2003; Mendes-Ferreira, Climaco, & Mendes-Faia, 2001; Strauss, Jolly, Lambrechts, & Van-Rensburg, 2001; Zoecklein, Marcy, Williams, & Jasinski, 1997).

Chaves-Lopes et al. (2009) have studied volatile compounds in wines fermented by the *S. cerevisiae* strains from Colombian Champús, a low alcoholic content beverage, and the results suggest that this microorganism can be an important source for new tropical yeast, having potential winemaking applications, and producing a wide range of aroma compounds. Differences observed in geraniol concentration of this beverage might be related to different glucosidase activity, as well as to the different consumption of free geraniol by yeasts.

Some microorganisms taxonomically distant from the genus *Saccharomyces* are presented as good sources of β -glucosidases and stable under fermentation processes conditions, contributing significantly to the floral sensory attribute of wines. Gueguen et al. (1997) has applied exogenous β -glucosidases to Muscat grape to improve the aromatic quality of wine, and the results from GC-MS analysis indicated a significant increase of the compounds nerol, geraniol, linalool, α -terpineol, 2-phenyl ethanol and benzene. Thus, the presence of some non-*Saccharomyces* in alcoholic fermentation can lead to an increase in the release of terpenic aglycones during fermentation.

Often terpenic aglycones are associated to different disaccharides, so the use of enzymatic complexes also containing hemicellulases such as rhamnosidase, arabinofuranosidase and apiosidase, become necessary (Günata, Blondeel, Vallier, Lepoutre, Sapis, & Watanabe, 1998).

Although monoterpenes have been found in sugar cane spirits, such as cachaça and rum (Boscolo, Bezerra, Cardoso, Lima-Neto, & Franco, 2000; Nonato, Carazza, Silva, Carvalho, & Cardeal, 2001; Pino, 2007; Souza, Vasquez, Mastro, Acree, & Lavin, 2006) no studies about terpenic glucosides in sugar cane juice have been published, only studies on flavonones glycosides (Colombo, Yariwake, Queiroz, Ndjok, & Hostettmann, 2006; Duarte-Almeida, Negri, Salatino, De Carvalho, & Lajolo, 2007) and phenolic glycosides (Takara, Otsuka, Wada, Iwasaki, & Yamashita, 2007).

The purpose of this work was to evaluate the use of crude β -glucosidases enzymes from *Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756 and *Aureobasidium pullulans* ER-16 to develop monoterpenes in sugar cane juice in order to improve the floral sensory attributes in sugar cane spirits.

2 Material and Methods

2.1 Chemicals

Pure monoterpenes standards and *p*-Nitrophenyl- β -D-glucoside (PNPG), were purchased from Sigma-Aldrich (Germany). All other chemicals were of reagent grade.

2.2 Microorganisms strains

Two species of microorganism producers of β -glucosidases were selected: the thermophilic fungus *T. aurantiacus* CBMAI-756 was isolated from rotting wood from Manaus, Amazonas State, Brazil and stock culture was preserved in Sabouraud dextrose agar (Oxoid) at 4 °C. The yeast *A. pullulans* ER-16 was isolated from orange skin industrial residues from Catanduva, São Paulo State, Brazil and stock culture was preserved in potato dextrose agar (Oxoid) at 4 °C.

2.3 Conditions for crude β -glucosidase production

The fungus *T. aurantiacus* was cultivated in 125 mL erlenmeyer flasks containing 20 mL of Sabouraud dextrose agar slope (Oxoid) for 48 h at a temperature of 50 °C. The yeast *A. pullulans* was cultivated in 125 mL erlenmeyer flasks containing 20 mL of potato dextrose agar slope (Oxoid) for 48 h at a temperature of 28 °C. Microorganism suspension was obtained by softly scraping the culture medium surface using 25 mL of mineral solution [0.1% (NH₄)₂SO₄, 0.1% MgSO₄·7H₂O, and 0.1% NH₄NO₃, w/v]. The respective culture medium solutions and materials were sterilized at 120 °C/30 min. The microorganisms inoculation in the substrates were carried out by transferring 5

mL of the suspension into erlenmeyer flasks containing the previously prepared medium.

The microorganisms were cultivated for 96 h in wheat bran, and appraised for β -glucosidase production. The substrate was previously washed with distilled water and dried at 50 °C for 48 h. Solid-state cultivation (SSC) was carried out in 500 mL erlenmeyer flasks containing 15 g of substrate mixed with a mineral solution to obtain an initial humidity content of 60 and 75% for the *T. aurantiacus* and for the *A. pullulans*, respectively. *T. aurantiacus* was cultivated at temperature of 50 °C, while the *A. pullulans* was at 28 °C.

For enzymes extraction, 100 mL of distilled water were added to each flask kept in a rotational shaker at 80 rpm for 1 h at room temperature. The crude extracts of solid cultivation were centrifuged (10,000 g/20 min), and then the supernatants were precipitate with ethanol 65% (v/v) at -18°C for 12 h, centrifuged (10,000 g/20 min) and then resuspended in sodium acetate (50 mM, pH 4.5).

2.4 Quantitative assay

β -glucosidase was assayed using 50 μ L of appropriately diluted culture filtrate, 250 μ L of sodium acetate buffer (100mM, pH 5.0), and 250 μ L of PNPG (4 mM). After incubation at 60°C for 10 min, the reaction was interrupted by adding 2 mL of sodium carbonate (2 M), and the absorbance measured at 410 nm. One unit of β -glycosidase corresponds to the amount of enzyme that releases 1.0 μ M nitrophenol per minute in the reaction mixture.

2.5 Determination of glucose and fructose in sugar cane juice with high-pH anion exchange chromatograph

Glucose and fructose were determined in sugar cane juice using by a high-pH anion exchange chromatograph system (Dionex ICS-3000) with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD), and with an auto sampler Dionex AS40. The ionic chromatographic column employed was CarboPac PA-1 (4x250 mm) coupled to a guard column CarboPac PA-1 (4x50 mm). Waveform used was standard quadrupole [$E_1= 0.10$ V ($t_1= 0.40$ s); $E_2= -2.00$ V ($t_2= 0.02$ s); $E_3= 0.60$

V ($t_3 = 0.01$ s); $E_4 = -0.10$ V ($t_4 = 0.06$ s)]. Eluent A (200mM NaOH) and eluent B (deionized water) at 1mL/min and temperature of 35 °C. Elution program for glucose determination: 1.5% eluent A for 25 min, and for fructose determination: 5% eluent A for 12 min.

2.6 Hydrolysis of terpenes glucosides by *T. aurantiacus* and *A. pullulans* β -glucosidase

The enzymatic complexes were added to the juices of four sugar cane juice varieties (IAC87-3396, SP-79-1011, RB86-7515 and RB83-5486), previously filtered and standardized to 15% of sugar with distilled water. To determine the optimal conditions of hydrolytic action, the systems were kept in pH 4.5; in both temperatures of 60 and 65 °C; hydrolysis time of 30 and 60 minutes static and 50 rpm shaker. One unit of β -glucosidase per mL was employed in all treatments, and after the end of each experiment, the vials were frozen at -20 °C.

2.7 Quantification of released terpenes by HS-SPME-GC/MS

Released volatile terpenes were determined by HS-SPME-GC/MS using a Shimadzu 17-A gas chromatograph, coupled with a Shimadzu QP-5050A mass selective detector operating in electron impact mode (70 eV). Prior to injection, the samples were stirred under heating (40 °C) for 10 min and the aroma compounds were extracted from the headspace with a 100 μ m polydimethylsiloxane (PDMS) micro fiber (purchased from Supelco) for 10 min at 40 °C.

The chromatographic column employed was an Agilent CP-Wax 52 CB (50 m x 0.32 mm) coated with polyethyleneglycol as stationary phase. Injector, interface, and ion source temperatures were 220, 230, and 240 °C, respectively. Mass range in scan mode was 40-160 m/z, and in single ion monitoring mode was 69 and 93m/z. Injection was performed in splitless mode, and helium (1 mL/min) was used as carrier gas. The temperature program was as follows: initial temperature 70 °C held for 1 min; ramped 10 °C/min to 220 °C (held for 9 min). Peaks were identified by retention time and by comparing their mass

fragmentation with those of pure standards, those available in mass spectra databases (NIST) and quantified in the single ion monitoring mode based on ions m/z 93 and 69.

Five standard terpenes were used in the analytical curves (R^2 value >0.99): linalool, α -terpineol, citronellol nerol, and geraniol, and the concentrations were expressed in $\mu\text{g/L}$.

3 Results and Discussion

3.1 β -glucosidase production

Crude extracts obtained by this methodology have shown β -glucosidase activity of 5.2 U/mL (*T. aurantiascus*) and 1.4 U/mL (*A. pullulans*), and in the concentrated extracts it were found β -glucosidase activities of 24 U/mL and 6.8 U/mL, respectively.

3.2 Glucose and fructose content in sugar cane juice

Generally, β -glucosidases are inhibited by monosaccharides. Aiming to evaluate possible interferences on β -glucosidase activity in the sugar cane juices used in this study, the contents of glucose and fructose were determined by HPAEC-PAD. The average values for glucose and fructose found were 7.4 and 7.0 $\mu\text{g/mL}$, respectively (Table 1). According to Leite at al. (2008), β -glucosidases of these same microorganisms are inhibited at levels near 50 mg/mL.

Insert here Table 1

3.3 Effect of the hydrolytic treatment of the sugar cane juice on the volatile terpenes

As can be seen on the Table 2, the experiments with exogenous β -glucosidases which were provided by thermophilic microorganisms (*T. aurantiacus* and *A. pullulans*), on sugar cane juice aiming to release volatile monoterpenes from their respective odorless glucosylated compounds by hydrolytic enzyme action did not suffer influence at the studied temperature range (60 and 65 °C), which in accordance to Leite et al. (2008), is close to the optimum temperature for the β -glucosidase activity of the enzymes of both microorganisms. Hydrolysis time and agitation did not show to be significant parameter in this process.

Insert here Table 2

However, significant differences were found in relation to the hydrolytic activity of β -glucosidases from the *T. aurantiacus* and *A. pullulans*. Results have shown a greater efficiency of the hydrolytic activity of β -glucosidases from the *T. aurantiacus*, a quite attractive characteristic, given that the yield of β -glucosidases is much higher in the extract of *T. aurantiacus* than in the *A. pullulans* (Leite, Alves-Prado, Cabral, Pagnocca, Gomes, & Da-Silva, 2008).

As expected, volatile monoterpenes content in the enzymatic treated sugar cane juices was higher than in untreated sugar cane juice. No target terpenes was detected in the controls nor in the non-treated sugar cane juices at LOD level of 1 $\mu\text{g/L}$, whereas in the enzymatic treated sugar cane juice, the presence of citronellol, nerol and geraniol was confirmed, but below the quantification limit of 5 $\mu\text{g/L}$. Terpienol and linalool were not detected in any of the samples which can be due to the absence of their respective glycosides precursors in the sugar cane juice, or even the poor specificity of enzymes for hydrolysis of such compounds.

The terpenes content from different varieties of sugar cane were similar, except for IAC87-3396 where none of the studied monoterpenes were detected. These results can be explained by the presence of the glycosides precursors in sugar cane juice, as a function of the variety, soil characteristics, climate conditions, degree of maturity and storage conditions. The terpene content is an intrinsic characteristic of each variety and different concentrations of volatile

compounds can vary among different grape varieties (Arévalo-Villena, Ubeda-Iranzo, & Briones-Peréz, 2007; Bayonove, Gunata, Sapis, Baumes, Dugelay, & Grassin, 1993; Garcia-Carpintero, Sánchez-Palomo, & González-Viñas, 2011).

4 Conclusions

The hydrolysis of the glucosidic terpenes by β -glucosidases from *T. aurantiacus* and *A. pullulans* was studied by gas chromatography and its ability to efficiently release free terpenols has been demonstrated. The concentrations of geraniol, citronellol and nerol were significantly increased in treated sugar cane juice. These results suggest the potential application of exogenous β -glucosidases in the fermentation process as an aroma-enhancing enzyme in Brazilian sugar cane spirit.

References

- Arévalo-Villena, M., Ubeda-Iranzo, J. F., & Briones-Peréz, A. I. (2007). Enhancement of Aroma in White Wines Using a β -glucosidase Preparation From *Debaryomyces pseudopolymorphus* (A-77). *Food Biotechnology*, 21, 181–194.
- Bayonove, C., Gunata, Y., Sapis, J. C., Baumes, R. L., Dugelay, I., & Grassin, C. (1993). L'aumento degli aromi nel vino mediante l'uso degli enzimi, *Vignevini*, 9, 33-36.
- Boscolo, M., Bezerra, C. W. B., Cardoso, D. R., Lima-Neto, B. S., & Franco, D. W. (2000). Identification and Dosage by HRGC of Minor Alcohols and Esters in Brazilian Sugar-Cane Spirit. *Journal of the Brazilian Chemistry Society*, 11, 86-90.
- Carrau, F. M., Medina, K., Boido, E., Farina, L., Gaggero, C., Dellacassa, E., Versini, G., & Henschke, P. A. (2005). De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, 243, 107-115.
- Charoenchai, C., Fleet, G. H., Henschke, P. A., & Todd, B. (1997). Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 3, 2-8.
- Chaves-López, C., Serio, A., Osorio-Cadavid, E., Paparella, A., & Suzzi, G. (2009). Volatile compounds produced in wine by Colombian wild *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Annals of Microbiology*, 59, 733-740.
- Colombo, R., Yariwake, J. H., Queiroz, E. F., Ndjok, K., & Hostettmann, K. (2006). On-line identification of further flavone C- and O-glycosides from sugarcane (*Soccharum officinarum* L., Gramineae) by HPLC-UV-MS. *Phytochemical Analysis*, 17, 337-343.

Delcroix, A., Gunata, Z., Sapis, J. C., Salmon, J. M., & Bayonove, C. (1994). Glycosidase activities of three enological yeast strains during wine making: effect on the terpenol content of Muscat wine. *American Journal Enology and Viticulture*, 45, 291-296.

Duarte-Almeida, J. M., Negri, G., Salatino, A., De Carvalho, J. E., & Lajolo, F. M. (2007). Antiproliferative and antioxidant activities of a tricin acylated glycoside from sugarcane (*Saccharum officinarum*) juice. *Phytochemistry*, 68, 1165-1171.

Fernández-González, M., Di Stefano, R., & Briones, A. (2003). Hydrolysis and transformation of terpene glycosides from Muscat must by different yeast species. *Food Microbiology*, 20, 35-41.

García-Carpintero, E. G., Sanchez-Palomo, E., & González-Viñas, M. A. (2011). Aroma characterization of red wines from cv. Bobal grape variety grown in La Mancha region. *Food Research International*, 44, 61–70.

Gueguen, Y., Chemardin, P., Pien, S., Arnaud, A., & Galzy, P. (1997). Enhancement of aromatic quality of Muscat wine by the use of immobilized β -glucosidase. *Journal of Biotechnology*, 55, 151-156.

Gunata, Y. Z., Bayonove, C. L., Baumes, R. L., & Cordonnier, R. E. (1986). Stability of free and bound fractions of some aroma components of grapes cv. Muscat during the wine processing. Preliminary results. *American Journal Enology and Viticulture*, 37, 112-114.

Gunata, Z., Dugelay, I., Sapis, J. C., Baumes, R., & Bayonove, C. (1990). Action des glycosidases exogènes au cours de la vinification: Libération de l'arôme à partir des précurseurs glycosidiques. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 24, 133-144.

Günata, Z., Blondeel, C., Vallier, M. J., Lepoutre, J. P., Sapis, J. C., & Watanabe, N. (1998). An Endoglycosidase from Grape Berry Skin of Cv. M. Alexandria Hydrolyzing Potentially Aromatic Disaccharide Glycosides. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46, 2748-2753.

Lee, K. Y. M., Paterson, A., Piggott, J. R., & Richardson, G. D. (2000). Perception of whisky flavour reference compounds by Scottish distillers. *Journal of the Institute of Brewing*, 106, 203-208.

Leite, R. S. R., Alves-Prado, H. F., Cabral, H., Pagnocca, F. C., Gomes, E., & Da-Silva, R. (2008). Production and characteristics comparison of crude β -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. *Enzyme Microbiology and Technology*, 43, 391-395.

Maicas, S., & Mateo, J. J. (2005). Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: a review. *Applied Microbiology Biotechnology*, 67, 322-335.

Mateo, J. J., & Jiménez, M. (2000). Monoterpenes in grape juice and wines. *Journal of Chromatography A*, 881, 557-567.

Mendes-Ferreira, A., Climaco, M. C., & Mendes-Faia, A. (2001). The role of non-*Saccharomyces* species in releasing glycosidic bound fraction of grape aroma components - a preliminary study. *Journal Applied Microbiology*, 91, 67-71.

Nonato, E. A., Carazza, F., Silva, F. C., Carvalho, C. R., & Cardeal, Z. L. (2001). A headspace solid-phase microextraction method for the determination of some secondary compounds of Brazilian Sugar Cane Spirits by gas chromatography. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 3533-3539.

Pinho, P. G., Falque, E., Castro, M., Silva, H., Machado, B., & Ferreira, A. C. S. (2007). Further insights into the floral character of Touriga Nacional wines. *Journal of Food Science*, 72, 396-401.

- Pino, A. J. (2007). Characterization of rum using solid-phase microextraction with gas chromatography–mass spectrometry. *Food Chemistry*, 104, 421-428.
- Rapp, A., & Mandery, H. (1986). Wine aroma. *Experientia*, 42, 873-884.
- Rosi, I., Vinella, M., & Domizio, P. (1994). Characterization of β -glucosidase activity in yeasts of oenological origin. *Journal of Applied Microbiology*, 77, 519-527.
- Souza, M. D. C. A., Vasquez, P., Mastro, N. L., Acree, T. E., & Lavin, E. H. (2006). Characterization of Cachaca and Rum Aroma. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54, 485-488.
- Strauss, M. L. A., Jolly, N. P., Lambrechts, M. G., & Van-Rensburg, P. (2001). Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-Saccharomyces wine yeasts. *Journal Applied Microbiology*, 91, 182-190.
- Takara, K., Otsuka, K., Wada, K., Iwasaki, H., & Yamashita, M. (2007). 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity and tyrosinase inhibitory effects of constituents of sugarcane molasses. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 71, 183-191.
- Withers, S. T., & Keasling, J. D. (2007). Biosynthesis and engineering of isoprenoid small molecules. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73, 980-990.
- Zoecklein, B. W., Marcy, J. E., Williams, J. M., & Jasinski, Y. (1997). Effect of native yeasts and selected strains of *Saccharomyces cerevisiae* in glycosyl glucose, potential volatile terpenes, and selected aglycones of White Riesling (*Vitis vinifera* L.) wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 10, 55-65.

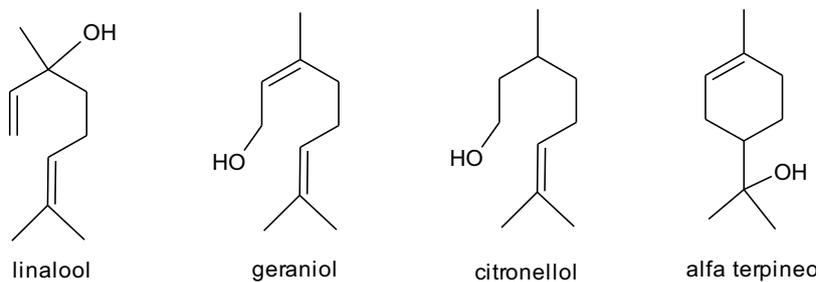


Fig. 1. Examples of monoterpenes commonly found in alcoholic beverages.

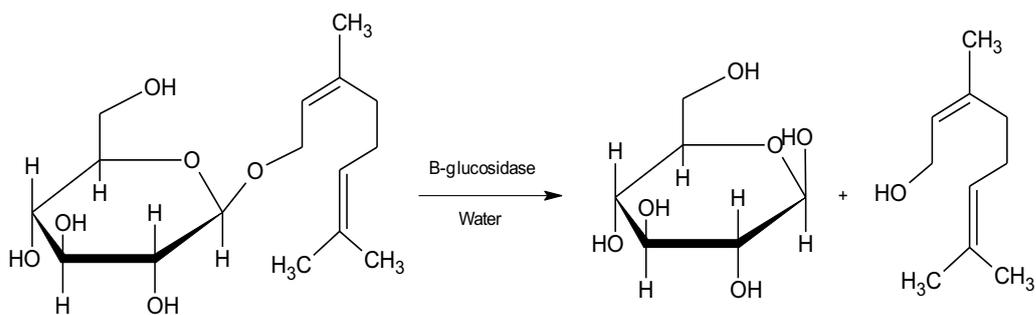


Fig. 2. Example of a terpenic glucoside (neryl- β -D-glucoside) and products of its hydrolysis by action of a β -glucosidase (glucose and nerol).

Table 1. Glucose and fructose content in the different varieties sugar cane juices ($\mu\text{g/mL}$).

Variety	Glucose	Fructose
IAC87-3396	6.8 ± 0.0	2.8 ± 0.0
RB83-5486	7.5 ± 0.0	10.5 ± 0.5
SP79-1011	3.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1
RB86-7515	11.5 ± 0.0	13.0 ± 0.2

Table 2. Mean values of terpenes ($\mu\text{g/L}$) found in the headspace fraction of treated sugar cane juice by β -glucosidases from the *T. aurantiacus* and *A. pullulans*.

	Variety	Linalool	Terpeniol	Citronellol	Nerol	Geraniol
<i>T. aurantiacus</i>	IAC87-3396	-	-	-	-	-
	RB83-5486	-	-	105 ± 73	46 ± 35	16 ± 6
	SP-79-1011	-	-	151 ± 93	31 ± 14	13 ± 8
	RB86-7515	-	-	141 ± 44	32 ± 22	16 ± 3
<i>A. pullulans</i>	Variety					
	IAC87-3396	-	-	-	-	-
	RB83-5486	-	-	79 ± 56	17 ± 2	5 ± 1
	SP-79-1011	-	-	90 ± 46	9 ± 2	7 ± 3
	RB86-7515	-	-	91 ± 28	31 ± 18	7 ± 4