

OTIMIZAÇÃO ENZIMÁTICA NA EXTRAÇÃO DE FRAÇÕES AROMÁTICAS DO SUBPRODUTO DO PROCESSAMENTO DE MORANGO

D. T. V. PEREIRA¹, M. A. C. MÁRQUEZ²

¹ Universidade de Lleida (Espanha), Faculdade Superior de Engenharia Agrícola (ETSEA)
Universidade Federal de São João Del-Rei, Departamento de Engenharia de Alimentos

² Universidade de Lleida (Espanha), Departamento de Tecnologia de Alimentos
Empresa Indulleida S.A.

E-mail para contato: debora.tata@hotmail.com

RESUMO – O presente trabalho tem por objetivo através da otimização enzimática da extração de aromas identificar os compostos voláteis chave presentes nos subprodutos do processamento de morango. Foram realizados doze tratamentos enzimáticos nas amostras utilizando três diferentes enzimas pertencentes aos grupos pectinesterase, feruloil esterase e β -glicosidase. Os tratamentos enzimáticos foram realizados em temperatura ambiente e temperatura ótima de cada enzima em tempos de 1 hora e 3 horas. A extração da fração volátil foi realizada de acordo com o método de extração sólido/líquido e a fração volátil extraída se identificou e quantificou segundo tecnologia de uso interno normalizado pela empresa Indulleida S.A utilizando um cromatógrafo de gases acoplado a um espectrofotômetro de massas com ionização para impacto eletrônico (EI) em modo negativo e analisador simples quádruplo. Na identificação dos compostos voláteis não foram identificados compostos chave do morango como ésteres, aldeídos, álcoois, terpenos, furanonas e compostos de enxofre nas amostras, a exceção da gama-decalactona com melhor isolamento quando utilizado a enzima feruloil esterase em temperatura ambiente de 1 hora e gama-undecalactona através da extração com a β -glicosidase em temperatura ótima da enzima e tempo de 1 hora. É necessário estudar a ação das enzimas pertencentes aos grupos das β -glicosidase e feruloil esterase para viabilizar o processo de extração.

1. INTRODUÇÃO

Os morangos são cultivados em quase todos os países do mundo e é uma das frutas mais populares consumidos frescos, conservados ou manufaturados. A qualidade sensorial do morango está baseada principalmente no seu aspecto (tamanho, forma e cor) e no equilíbrio adequado de compostos voláteis e não-voláteis presentes no fruto, destes últimos os carboidratos, aminoácidos e os ácidos orgânicos são considerados como os compostos responsáveis pelo sabor e também são precursores dos compostos que denotam o aroma de morango (Layne e Bassi, 2008). No caso dos carboidratos, diversos compostos como os pertencentes da família das furanonas são originadas a partir da glicose formando parte do aroma do morango. Os aminoácidos são doadores de nitrogênio (N) orgânico para a formação

de diversas moléculas biológicas, como é o caso dos compostos voláteis. A diversidade do tipo de ésteres no perfil aromático dos morangos é devido a composição de aminoácidos e isso explica a diferença acentuada no sabor e aroma entre as variedades (Layne e Bassi, 2008).

Morangos frescos produzem numerosos compostos voláteis, os quais 360 foram isolados (Latrasse, 1991) incluindo os ésteres, aldeídos, cetonas, álcoois, terpenos, furanonas e compostos de enxofre (McFadden *et al.*, 1965).

Os aromas cada vez tem mais importância para a indústria de alimentos. Estes fornecem um particular odor aos alimentos ou bebidas e se utilizam por razões diversas: potenciar ou refinar os aromas já presentes, suprir a perda de aromas devido ao processamento dos alimentos, ou incluso, a criação de um aroma totalmente novo (Layne e Bassi, 2008).

A introdução em cromatografia gasosa em coluna capilar combinado com espectrometria de massa permite a identificação de vários compostos voláteis em um único ensaio de cromatografia de gases.

Na indústria de processamento de frutas, os resíduos sólidos orgânicos podem causar sérios problemas ao aterro por causa da sua biodegradabilidade. Um desafio importante da indústria de processamento de frutas é otimizar a rentabilidade e o aproveitamento dos diferentes subprodutos para obter compostos de valor agregado como por exemplo os aromas.

A pectinesterase pertence ao grupo de enzimas das pectinases e catalisam a desesterificação do grupos metoxilo. A sua ativação ou inativação influi de uma forma decisiva sobre as etapas de elaboração de produtos derivados da fruta (Nagodawithana, 1993). A feruloil esterase ou ácido ferúlico é uma enzima envolvida na hidrólise das partes recalcitrantes da parede celular vegetal (Crepin, 2004). A β – glicosidase são exo-carboidrases que catalisa a hidrólise de ligações β (1-4) com os radicais terminais β -D-glicose. É por isso que devido a sua ação liberam moléculas de β -D-glicose e muitas moléculas aromáticas, tais como compostos da família dos terpenos que estão presentes nas frutas em forma de glucosídeos (agliconas precursoras de aromas e sabores) (Sarry e Güanata, 2004).

A biocatálise enzimática representa uma ferramenta útil no campo da indústria dos aromas uma vez que catalisa um grande número de reações estereo-específicas e de baixa fração molar. Entre as suas vantagens, tais como a compatibilidade ecológica e a possibilidade de operar em processos de múltiplas etapas, superam o uso de catálise química (Taylor, 2010).

Sendo assim, o objetivo trabalho foi identificar através da otimização das enzimas pectinesterase, feruloil esterase e β – glicosidase, os compostos voláteis chave presentes no subproduto derivado do processamento de morango.

2. METODOLOGIA

2.1 Tratamento Enzimático

Foram utilizados subprodutos do processamento de morango de uma indústria de processamento de frutas localizada na cidade de Lleida (Espanha). Para o tratamento enzimático pesou-se 333 g de subproduto de morango correspondente a cada ensaio experimental. No caso dos tratamentos em temperatura ótima da enzima a polpa foi aquecida em banho térmico segundo a faixa de temperatura ótima de cada enzima correspondente ao tratamento enzimático. As amostras e os brancos nos ensaios em temperatura ambiente permaneceram em 20° C.

As enzimas empregadas durante os tratamentos enzimáticos foram uma pectinesterasa pura obtida a partir de *Aspergillus aculeatus*; uma preparação enzimática de feruloil esterasa obtida por *Humicola sp.*; e uma β – glicosidase com atividade celulase e hemicelulase obtida a partir de *Trichoderma longibrachiatum*.

Foram realizados dezesseis ensaios experimentais com três enzimas diferentes em temperatura de 1 hora e 3 horas que podem ser encontrados na Tabela 1. Em cada ensaio, de acordo com a enzima utilizada foram realizadas diluições de 2 mL de pectinesterasa, 2 mL de feruloil esterasa e 4 mL de β – glicosidase em $666 \pm 0,7$ mL em água Milli-Q. Nos ensaios dos brancos não foram adicionados enzimas. Para cada teste experimental colocou-se 333 g de amostra em contato com a enzima diluída em um biorreator de 1 Kg, com uma agitação de $400 \text{ rpm} \pm 10 \text{ rpm}$. Foram retiradas amostras de 150 g do biorreator após 1 hora e 3 horas de reação enzimática. No caso de ensaios experimentais em temperatura ótima de cada enzima, as amostras foram mantidas em temperaturas adequadas em biorreatores com camisa externa, com água aquecida e corrente. Nos ensaios em temperatura ambiente, incluso os brancos as reações enzimáticas ocorreram em 20° C.

A faixa de temperatura ótima segundo os fabricantes das enzimas são: pectinesterasa 35-40°C, feruloil esterasa 40-65°C e β – glicosidase 50-65°C. Para cessar as reações enzimáticas, as amostras extraídas do biorreator ao final de 1 hora e 3 horas foram submetidas em um banho térmico 90°C/10min. Em seguida as amostras foram armazenadas a -21°C antes de iniciar a extração das frações aromáticas.

Tabela 1 – Ensaios experimentais

	Pectinesterasa		Feruloil esterasa		β – glicosidase		Branco	
Temperatura ambiente (20°C)	1 hora	3 horas	1 hora	3 horas	1 hora	3 horas	1 hora	3 horas
Temperatura ótima	1 hora	3 horas	1 hora	3 horas	1 hora	3 horas	1 hora	3 horas

2.2 Extração Da Fração Aromática

Para a extração da fração aromática utilizou se um método de extração sólido/líquido normalizado pela empresa Indulleida S.A. Foram pesados 100 g em cada amostra, diluídas em 200 mL de água Milli-Q e adicionadas em um funil de decantação. Em seguida, adicionou-se 1 mL de padrão interno 0,01% e agitado. Após, foi adicionado 100 mL de solvente Diclorometano puro (100%) e agitado vigorosamente durante 1 minuto para liberação do gás formado. A fase inferior foi coletada em um frasco de Pyrex e a fase inferior retornou a

incorporar o decantador para novamente ser adicionado 100 mL do solvente de extração Diclorometano puro. Repetiu-se duas vezes mais a incorporação do solvente, agitação e a coleta da fase de interesse. As fases superiores coletadas do frasco de Pyrex foram filtradas utilizando duas colheres de sulfato anidro e adicionadas sobre um funil com papel filtro em outro frasco. A evaporação do solvente de extração da fase filtrada foi realizada em um balão de destilação e introduzido em rotavapor sem vácuo em temperatura de $40 \pm 5^\circ\text{C}$. Após a evaporação do solvente, o balão de destilação foi refrigerado em um banho de glicol durante 5 minutos. Finalmente, a amostra foi coletada e armazenada em um vial de vidro e conservado a -21°C .

2.3 Identificação e Quantificação Dos Compostos Voláteis

A fração volátil extraída foi identificada e quantificada segundo tecnologia de uso interno normalizado pela empresa Indulleida S.A. utilizando um cromatógrafo de gases (Agilent GC6890) acoplado a um espectrofotômetro de massas (Agilent 5890N) com ionização para impacto eletrônico (EI) em modo negativo e analisador de simples quádruplo. A coluna capilar era VF-WAXms com PEG de fase estacionária (30m x 250 μm x 0,25 μm) (Varian CP9205). Hélio foi utilizado como gás portador. A temperatura de injeção era de 1 μL utilizando o modo *splitless* (ratio 1:100). Os compostos voláteis se identificaram por comparação com bases de dados NIS/EPA/NH *Mass Spectral Library*. A quantificação foi determinada de acordo com o método padrão interno (10 ppm de veratrol).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na identificação dos compostos voláteis, gama-decalactona e ácido esteárico estavam presentes em todas as amostras que foram submetidas a ação enzimática de feruloil esterasa, β – glicosidase e pectinesterasa. Outros compostos que foram identificados de forma isolada são: gama-undecalactona, ácido benzoico, ácido láurico e isofitol.

Os compostos chave de aroma de morango encontrados foram as lactonas: gama-decalactona e gama-undecalactona. No tratamento enzimático quando utilizado a enzima feruloil esterasa na temperatura ambiente de 1 hora identificou-se a presença de gama-decalactona conforme mostra a Figura 1 e a enzima β – glicosidase foi a que melhor extraiu o composto gama-undecalactona em temperatura ótima de 1 hora conforme mostra a Figura 2.

Figura 1 – Identificação de gama-decalactona submetidas ao tratamento enzimático com as enzimas pectinesterasa, feruloil esterase e β – glicosidase.

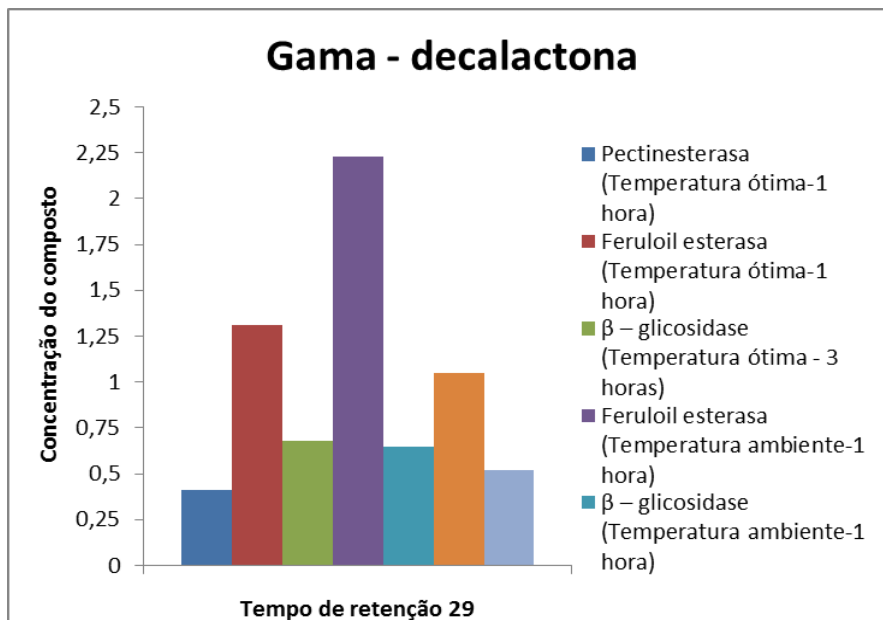
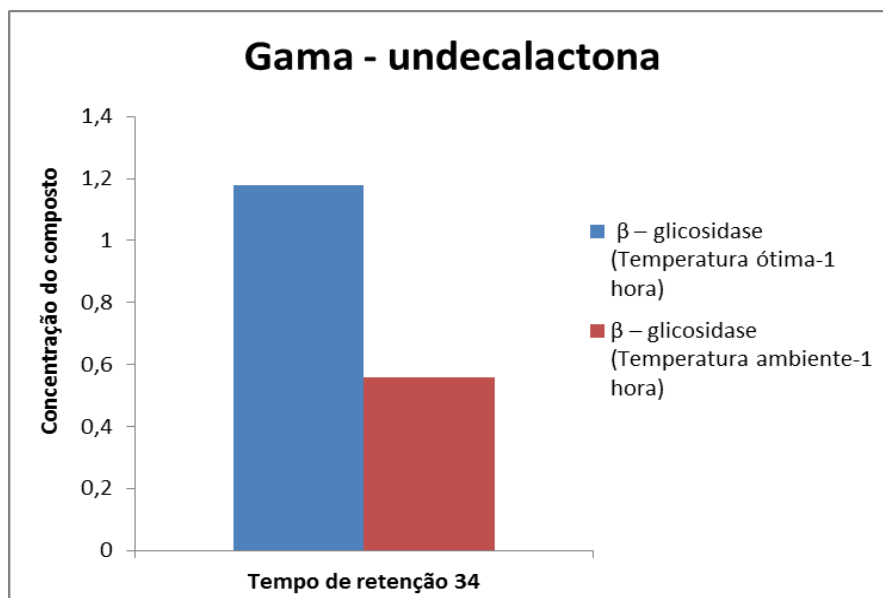


Figura 2 – Identificação de gama-undecalactona em amostras submetidas ao tratamento enzimático utilizando a enzima β – glicosidase.



O ácido benzóico em outros estudos foi atribuído à liberação de terpenóides da união com aglicona precursoras de aromas pelo tratamento com enzimas pectinolíticas e glucosidases que modificam sua composição polissacarídica. A presença de ácidos carboxílicos, aldeídos, álcoois e ácidos como ácido láurico, denota que a amostra se encontra degradada e oxidada. Nas amostras dos brancos não foram encontrados compostos voláteis.

4. CONCLUSÃO

Ésteres, aldeídos, álcoois, terpenos e compostos de enxofre característicos do aroma de morango não foram identificados nas amostras submetidas aos tratamentos enzimáticos, com exceção da gama-decalactona com melhor isolamento quando utilizada a enzima feruloil esterasa em temperatura ambiente de 1 hora e gama-undecalactona através da enzima β -glicosidase em temperatura ótima de 1 hora.

Há um conhecimento limitado dos mecanismos de controle da síntese de substâncias voláteis do aroma de morango. Uma melhor compreensão destes mecanismos poderia proporcionar a capacidade de manipular a fruta de morango para otimizar seu sabor no momento do consumo. Entender as propriedades das enzimas que participam na produção de voláteis do aroma pode favorecer manipulações genéticas e ambientais para melhorar o sabor de morango. É necessário estudar a ação das enzimas pertencentes aos grupos das β -glicosidase e feruloil esterasa para viabilizar o processo de extração de aromas nos subprodutos de morango.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer a empresa Indulleida S.A. por seu apoio e suporte no desenvolvimento do trabalho.

6. REFERÊNCIAS

- Crepin, V.; Faulds, C; Connerton, I. *Functional classification of the microbial feruloyl esterases*. App. Microb. Biotechnol. 2004, 63, 647-652.
- Latrasse, A. 1991. Fruits III, p. 329–387. In: H. Maarse (ed.). *Volatile compounds in foods and beverages*. Marcel-Dekker, New York. 1991.
- Layne, D., Bassi, D. *The Peach: botany, production and uses*. CABI, Wallingford, 2008.
- McFadden, W.H., R. Teranishi, J. Corse, D.R. Black, and T.R. Mon. 1965. Volatiles from strawberries. II. J. Chromatog. 18:10–19.1965.
- Nagodawithana, T. *Enzymes in food processing*. Academic Press, San Diego, 1993.
- Sanchez, J.; Güanata, Z. *Plant and microbial glycoside hydrolases*. Food Chem. 2004, 87, 509-521.
- Taylor, A. *Food Flavour Technology*. Blackwell, Ames, 2010. 2010.
- Ulrich, Detlef.; Edelgar Hoberg.; Rapp, Adolf.; Kecke, Steffen. *Analysis of strawberry flavour*. Revista Springer – Verlag, (1997) 205 : 218 – 223.1997.