

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química**

**Alexandra Füchter**

**ESTUDOS CINÉTICOS RELATIVOS À PRODUÇÃO DE  
ACETATO DE ETILA PELA LEVEDURA  
HANSENULA ANOMALA**

Florianópolis – SC

2001

**Alexandra Füchter**

**ESTUDOS CINÉTICOS RELATIVOS À PRODUÇÃO DE  
ACETATO DE ETILA PELA LEVEDURA  
HANSENULA ANOMALA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow

Co-orientador: Prof. Dr. Agenor Furigo Jr.

Florianópolis - SC

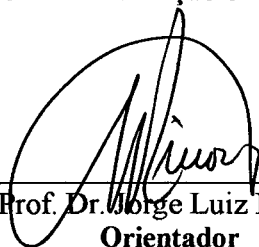
2001

# **Estudos Cinéticos Relativos à Produção de Acetato de Etila por *Hansenula Anomala***

Por

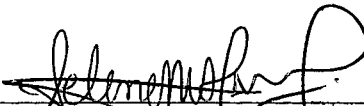
**Alexandra Füchter**

Dissertação julgada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**, área de concentração **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos** e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.



---

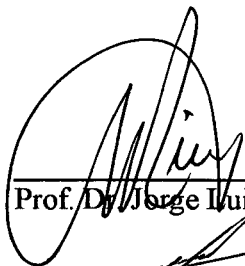
Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow  
Orientador



---

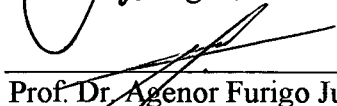
Prof.ª Dr.ª Selene M. A. Guelli Ulson de Souza  
Coordenadora do CPGENQ

**Banca Examinadora:**



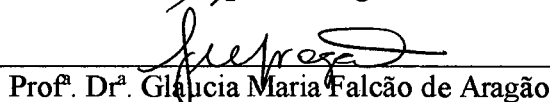
---

Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow



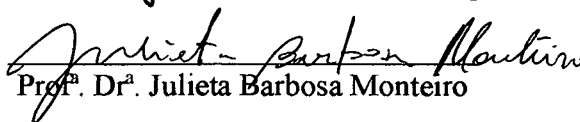
---

Prof. Dr. Agenor Furigo Junior



---

Prof.ª Dr.ª Gláucia Maria Falcão de Aragão



---

Prof.ª Dr.ª Julieta Barbosa Monteiro

**Florianópolis, 28 de Fevereiro de 2001**

*“Tudo o tempo leva,  
a própria vida não dura.  
Com sabedoria  
colhe a alegria de agora  
para a saudade futura.”*

**(Helena Kolody)**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow pela orientação prestada durante a realização deste trabalho e ao Prof. Dr. Agenor Furigo Jr. pela sua atenção e co-orientação.

Aos meus pais, ao meu noivo, Sandro Pezente Fabris e para os meus irmãos por tudo o que representam para mim, dedico mais este momento de minha vida.

Aos colegas de turma e aos amigos do Laboratório de Engenharia Bioquímica, pela amizade e longas horas de convívio, especialmente a Luciana, Darlene e Sílvia pelo auxílio durante a realização desse trabalho.

Aos grandes amigos encontrados nessa fase da vida, especialmente a Mires e a Eloisa que sempre me ajudaram nesse período de permanência em Florianópolis.

Aos colegas do laboratório, Silas, Márcio, Ernandes, Fátima, Luciane, Roberta, Cintia, Denise, Rogério, Leandro, Rafael, Marcos, João e Toni pela agradável convivência e pela ajuda na execução desse trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Engenharia Química e de Engenharia de Alimentos da UFSC, especialmente ao Edivilson pelo apoio e simpatia.

Meus agradecimentos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro através da bolsa de estudos.

E acima de tudo, agradeço a Deus por mais uma etapa vencida.

Meus sinceros agradecimentos, obrigada!

# SUMÁRIO

|   |     |
|---|-----|
| <u>LISTA DE FIGURAS</u> .....   | I   |
| <u>LISTA DE TABELAS</u> .....   | III |
| <u>NOMENCLATURA</u> .....   | IV  |
| <u>RESUMO</u> .....   | V   |
| <u>ABSTRACT</u> .....   | VI  |
| <u>I. INTRODUÇÃO</u> .....  | 1   |
| <u>II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u> .....  | 5   |
| <u>II.1 AROMAS</u> .....  | 5   |
| <u>II.1.1 Terminologia</u> .....  | 5   |
| <u>II.1.2 Classificação dos Aromatizantes</u> .....   | 7   |
| <u>II.1.3 Aspectos regulatórios e condições legais da produção biotecnológica de aromas</u> ..... | 8   |
| <u>II.1.4 Aplicações</u> .....  | 8   |
| <u>II.1.5 Os processos biotecnológicos e a indústria de aromas</u> .....                          | 9   |
| <u>II.1.6 Mercado de aromas</u> .....   | 10  |
| <u>II.1.7 Grupos de Aromas e a Importância dos Ésteres</u> .....                                  | 11  |
| <u>II.2 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE AROMAS</u> .....   | 13  |
| <u>Hansenula anomala</u> .....  | 16  |
| <u>II.3 VIAS METABÓLICAS</u> .....  | 17  |
| <u>II.3.1 Dificuldades apresentadas pelos processos fermentativos</u> .....                       | 20  |
| <u>II.3.2 Processos de recuperação de acetato de etila e etanol</u> .....                         | 21  |

|                |  |    |
|----------------|--|----|
| <u>II.4</u>    | <u>FATORES QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DE ACETATO DE ETILA</u> .....    | 23 |
| <u>II.4.1</u>  | <u>Oxigênio dissolvido</u> .....                                       | 23 |
| <u>II.4.2</u>  | <u>Concentração de Etanol e a conversão em éster</u> .....             | 25 |
| <u>II.4.3</u>  | <u>Fonte de carbono</u> .....  | 25 |
| <u>II.4.4</u>  | <u>Nitrogênio</u> .....  | 26 |
| <u>II.4.5</u>  | <u>Fósforo</u> .....   | 27 |
| <u>II.4.6</u>  | <u>pH</u> .....  | 27 |
| <u>II.4.7</u>  | <u>Temperatura</u> .....   | 28 |
| <u>III.</u>    | <u>MATERIAL E MÉTODOS</u> .....  | 30 |
| <u>III.1</u>   | <u>MICROORGANISMO</u> .....  | 30 |
| <u>III.2</u>   | <u>MEIOS DE CULTURA</u> .....  | 30 |
| <u>III.2.1</u> | <u>Meio de Manutenção</u> .....  | 30 |
| <u>III.2.2</u> | <u>MEIOS DE CULTIVO</u> .....  | 30 |
| <u>III.3</u>   | <u>PREPARO DOS INÓCULOS</u> .....                                      | 31 |
| <u>III.4</u>   | <u>ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO</u> .....                                    | 32 |
| <u>III.5</u>   | <u>CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS</u> .....                                   | 33 |
| <u>III.6</u>   | <u>MÉTODOS ANALÍTICOS</u> .....  | 34 |
| <u>III.6.1</u> | <u>Amostragem em frascos agitados e em reator</u> .....                | 34 |
| <u>III.6.2</u> | <u>Concentração celular</u> .....                                      | 35 |
| <u>III.6.3</u> | <u>Dosagem de glicose</u> .....  | 36 |
| <u>III.6.4</u> | <u>Determinação da concentração de acetato de etila e etanol</u> ..... | 36 |
| <u>III.7</u>   | <u>TRATAMENTO DE DADOS</u> .....                                       | 38 |
| <u>III.7.1</u> | <u>Fatores de conversão</u> .....                                      | 38 |
| <u>III.7.2</u> | <u>Produtividades</u> .....  | 39 |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| III.7.3 | <u>Velocidade específica máxima de crescimento</u> .....  | 39 |
| IV.     | <u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u> .....   | 40 |
| IV.1    | <u>ENSAIOS EM FRASCOS AGITADOS "SHAKER"</u> .....   | 40 |
| IV.1.1  | <u>Concentração inicial de glicose e temperatura</u> .....  | 40 |
| IV.1.2  | <u>Estudo da disponibilidade de oxigênio</u> .....  | 51 |
| IV.1.3  | <u>Influência da suplementação dos compostos <math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math> e uréia no meio fermentativo</u> ..... | 55 |
| IV.2    | <u>ENSAIOS EM FERMENTADOR</u> .....   | 58 |
|         | <u>Influência da aeração</u> .....  | 58 |
| V.      | <u>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</u> .....  | 62 |
| V.1     | <u>CONCLUSÕES</u> .....   | 62 |
| V.2     | <u>PERSPECTIVAS</u> .....   | 64 |
|         | <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u> .....   | 65 |
|         | <u>ANEXOS</u> .....   | 78 |
| ANEXO 1 | .....   | 78 |
| ANEXO 2 | .....   | 79 |
|         | <u>Determinação de glicose pelo método enzimático colorimétrico glicose oxidase.</u> ..                                 | 79 |
| ANEXO 3 | .....   | 81 |
|         | <u>Cromatograma típico das análises de etanol e acetato de etila realizadas por cromatografia em fase gasosa</u> .....  | 81 |
| ANEXO 4 | .....   | 82 |
|         | <u>Curva de calibração de acetato de etila</u> .....  | 82 |
| ANEXO 5 | .....   | 83 |
|         | <u>Curva de calibração de etanol</u> .....  | 83 |



## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <u>FIGURA II 1: Mecanismo proposto para formação de ésteres de acetato sobre a influência da composição em ácidos graxos da membrana celular pela enzima álcool acetiltransferase (Reprodução da' figura de YOSHIOKA &amp; HASHIMOTO, 1983).</u> ..... | 18 |
| <u>FIGURA II 2 Via glicolítica (VOET &amp; VOET, 1990).</u> .....  | 19 |
| <u>FIGURA II 3: Vias metabólicas propostas para a produção de acetil-CoA nas células de levedura (VOET &amp; VOET, 1990).</u> .....  | 20 |
| <u>FIGURA III 1:BIORREATOR</u> .....   | 34 |
| <u>FIGURA IV 1: Cinética de crescimento e produção de acetato de etila e etanol da levedura Hansenula anomala em meio YM com concentração inicial de glicose de 40g.L<sup>-1</sup> à temperatura de 20°C.</u> .....                                    | 41 |
| <u>FIGURA IV 2: Cinética de crescimento e produção de acetato de etila e etanol da levedura Hansenula anomala em meio YM com concentração inicial de glicose de 40g.L<sup>-1</sup> à temperatura de 30°C.</u> .....                                    | 41 |
| <u>FIGURA IV 3: Cinética de crescimento e produção de acetato de etila e etanol da levedura Hansenula anomala em meio YM com concentração inicial de glicose de 75g.L<sup>-1</sup> à temperatura de 20°C.</u> .....                                    | 43 |
| <u>FIGURA IV 4: Cinética de crescimento e produção de acetato de etila e etanol da levedura Hansenula anomala em meio YM com concentração inicial de glicose de 75g.L<sup>-1</sup> à temperatura de 30°C.</u> .....                                    | 44 |
| <u>FIGURA IV 5: Cinética de crescimento e produção de acetato de etila e etanol da levedura Hansenula anomala em meio YM com concentração inicial de glicose de 100g.L<sup>-1</sup> à temperatura de 20°C.</u> .....                                   | 45 |

- FIGURA IV 6: Cinética de crescimento e produção de acetato de etila e etanol da levedura Hansenula anomala em meio YM com concentração inicial de glicose de 100g.L<sup>-1</sup> à temperatura de 30°C. ....46
- FIGURA IV 7: Influência da temperatura e da concentração inicial de glicose no meio YM sobre a produtividade em acetato de etila para a levedura H. anomala. ....50
- FIGURA IV 8: Cinética de crescimento da levedura Hansenula anomala e produção de acetato de etila e etanol no meio YM com 100g.L<sup>-1</sup> de glicose em erlenmeyer de 300mL, pH 5,5, 150min<sup>-1</sup> e 20°C. ....52
- FIGURA IV 9: Cinética de crescimento da levedura Hansenula anomala e produção de acetato de etila e etanol no meio YM com 100g.L<sup>-1</sup> de glicose em erlenmeyer de 2000mL, pH 5,5, 150min<sup>-1</sup> e 20°C. ....54
- FIGURA IV 10: Cinética de crescimento da levedura Hansenula anomala e produção de metabólitos no meio YM contendo 100g.L<sup>-1</sup> de glicose, 1,0g.L<sup>-1</sup> de uréia, pH 5,5, 150min<sup>-1</sup> e 20°C. ....55
- FIGURA IV 11: Cinética de crescimento da levedura Hansenula anomala e produção de metabólitos no meio YM contendo 100g.L<sup>-1</sup> de glicose e 0,5g.L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 5,5, 150min<sup>-1</sup> e 20°C. ....56
- FIGURA IV 12: Cinética de crescimento da levedura Hansenula anomala e produção de metabólitos no meio YM contendo 100g.L<sup>-1</sup> de glicose, 1,0g.L<sup>-1</sup> de uréia e 0,5g.L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 5,5, 150min<sup>-1</sup> e 20°C. ....57
- FIGURA IV 13: Cinética de crescimento da levedura H. anomala no processo em batelada com aeração de 60mL.min<sup>-1</sup> em meio YM contendo uma concentração inicial de glicose de 100g.L<sup>-1</sup> e pH 5,5. ....59
- FIGURA IV 14: Cinética de crescimento da levedura H. anomala no processo em batelada com aeração de 300mL.min<sup>-1</sup> em meio YM contendo uma concentração inicial de glicose de 100g.L<sup>-1</sup> e pH 5,5. ....59
- FIGURA IV 15: Cinética de crescimento da levedura H. anomala no processo em batelada com aeração de 600mL.min<sup>-1</sup> em meio YM contendo uma concentração inicial de glicose de 100g.L<sup>-1</sup> e pH 5,5. ....60

**LISTA DE TABELAS**

|   |           |
|---|-----------|
| <u>TABELA II 1: Produção de acetato de etila e etanol por seis espécies de levedura (Reprodução de parte dos resultados do artigo de DI STEFANO et al. (1981)).....</u>   | <u>15</u> |
| <u>TABELA II 2: Efeito da temperatura e da concentração de oxigênio dissolvido (Reprodução dos resultados de MARIC et al. (1979)).....</u>  | <u>28</u> |
| <u>TABELA IV 1: Velocidade de crescimento específica na fase exponencial (<math>\mu_{\text{máx}}</math>) e fator de conversão de glicose em células (<math>Y_{X/S}</math>) dos ensaios realizados a 20 e 30°C, e concentrações iniciais de glicose de 40, 75 e 100g.L<sup>-1</sup> com a levedura Hansenula anomala .....</u> | <u>49</u> |

## NOMENCLATURA

|                     |  |
|---------------------|--|
| $\mu_{\text{máx.}}$ | Velocidade específica máxima de crescimento celular ( $\text{h}^{-1}$ )                          |
| $Y_{X/S}$           | Fator de conversão de glicose em células, $\text{g}_X \cdot \text{g}_S^{-1}$                     |
| $Y_{\text{Act}/S}$  | Fator de conversão de glicose em acetato de etila, $\text{g}_{\text{Act}} \cdot \text{g}_S^{-1}$ |
| $Y_{\text{EtOH}/S}$ | Fator de conversão de glicose em etanol, $\text{g}_{\text{EtOH}} \cdot \text{g}_S^{-1}$          |
| $P_{\text{Act}}$    | Produtividade em acetato de etila, $\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$            |
| Act                 | Acetato de etila   |
| EtOH                | Etanol   |
| $\text{min}^{-1}$   | Por minuto   |
| t                   | Tempo  |
| h                   | Horas  |
| YMA                 | Yeast, Malt Extract Agar   |
| YM                  | Yeast, Malt Extract  |
| $P_f$ e $P_0$       | Produto final e inicial  |
| X, $X_0$ e $X_f$    | Células, células iniciais e células finais   |
| nm                  | Nanômetro  |

## RESUMO

O acetato de etila é um composto com bastante aplicabilidade comercial. Nas indústrias de alimentos, fármacos e cosméticos, ele é utilizado especialmente como aroma de frutas. Nos últimos anos, o mercado de aromas tem crescido muito, principalmente com relação aqueles que são obtidos por vias naturais. Essa preferência dos consumidores está relacionada com um estilo de vida mais saudável, porque os aromas sintéticos são rotulados como “prejudiciais a saúde”. Em função dessa tendência, novas pesquisas à procura de aromas de origem biotecnológica têm sido realizadas. Nesse trabalho, estudou-se a cinética de produção de acetato de etila pela levedura *Hansenula anomala* CCT 2648 no meio YM (Yeast Extract Agar), visando seu uso na indústria de alimentos, uma vez que o seu custo é superior aos obtidos sinteticamente. Durante a primeira etapa dos ensaios foram estudadas diferentes concentrações de glicose de 40, 75 e 100g.L<sup>-1</sup> e temperaturas de 20 e 30°C do meio de cultivo em frascos agitados de 1000mL. Observou-se maiores produções do éster acetato de etila (46,5g.L<sup>-1</sup>) para concentrações elevadas de glicose (100g.L<sup>-1</sup>) e principalmente temperaturas baixas do meio de cultivo (20°C). Na segunda etapa dos experimentos, verificou-se a disponibilidade de oxigênio no meio fermentativo em frascos erlenmeyers de 300, 1000 e 2000mL. Observou-se que a ausência, bem como o excesso de oxigênio prejudica a formação do éster. Na seqüência foram analisadas suplementações do meio com nitrogênio e fósforo através da adição de uréia e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> respectivamente. Adições extras destes sais não são necessárias, pois prejudicam a produção de acetato de etila. Por fim, nos ensaios em biorreator foram aplicadas vazões de 60, 300 e 600mL.min<sup>-1</sup> de ar. O fornecimento de oxigênio em baixas vazões favoreceu o metabolismo anaeróbio ou microaerofílico, obtendo-se concentrações altas de etanol, em torno de 63g.L<sup>-1</sup>. Ao fornecer uma maior quantidade de oxigênio, 300 e 600mL.min<sup>-1</sup>, também se obteve produção elevada de etanol (40g.L<sup>-1</sup>), indicando a ocorrência do efeito Crabtree. A aeração desfavoreceu a produção de acetato de etila, obtendo-se baixas concentrações de no máximo 3,3g.L<sup>-1</sup>.

## ABSTRACT

The ethyl acetate is a product highly commercialized. In the food, pharmaceutical and cosmetics industries, the ethyl acetate is mainly applied as fruit flavor. In the past years, the market flavor has been increased significantly. There is a preference for flavor from natural origin, as consumers believe that synthetic flavor is harmful for our health. Based on that, biotechnologic origin has been searched "a lot". In our research, we emphasized the kinetic production of ethyl acetate by *Hansenula anomala* CCT 2648 yeast in the Yeast Extract Agar (YM) media, focusing on its use in the food industry, as its aggregated value is higher than the ones synthetically obtained. During the first essay stage, we studied different glucose concentration (40, 75 and 100g.L<sup>-1</sup>) and culture media temperature (20 and 30°C). From that, we obtained 46,5g.L<sup>-1</sup> of ethyl acetate considering 100g.L<sup>-1</sup> of glucose at 20°C. In order to get high ester concentration, it is necessary high concentration of glucose (100g.L<sup>-1</sup>) and low culture media temperature mainly (20°C). During the second essay stage, we found out that there was oxygen in the fermentative media in erlenmeyer flasks of 300, 1,000 and 2,000mL. We came to a conclusion that either the lack or high oxygen concentration are harmful for the ethyl acetate production. During the third essay stage, we studied the media supplementation with nitrogen and phosphorous by adding urea and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Extra salts application was not necessary as there was enough concentration in the complex media. During the last stage we worked with a fermentor, applying 60, 300 and 600mL.min<sup>-1</sup> of air. The supplying of low origin concentration contributed for the microaerophilic or anaerobic metabolism. From that, we obtained high ethanol concentration (around 63g.L<sup>-1</sup>) by adding oxygen (300 and 600 mL.min<sup>-1</sup>). We also obtained high ethanol production - 40g.L<sup>-1</sup> (Crabtree Effect).

## I. INTRODUÇÃO

O aroma é um dos mais importantes atributos dos alimentos, bebidas, fármacos e cosméticos. Eles são considerados de grande importância porque apresentam a característica de modificar o aspecto e o sabor dos produtos, tornando-os mais atrativos.

Os aromas são substâncias químicas puras ou misturas que impressionam o sentido do olfato e estão presentes naturalmente nos alimentos, podendo ser produzidos pela ação de microrganismos, sinteticamente ou através de reações enzimáticas.

Produtos cárneos ou lácteos apresentam características nutritivas ótimas e são consumidos por suas propriedades organolépticas (aroma, sabor e textura). Por outro lado, existem alguns alimentos que não são tão atrativos ao paladar e por isso, torna-se necessário reforçar ou melhorar seu sabor através da adição de um determinado tipo de aroma. Desta forma, os aromas tornam-se importantes aditivos na indústria de alimentos.

Estes compostos são adicionados em pouca quantidade e não oferecem nenhum caráter nutritivo ao produto, servindo exclusivamente para realçar ou melhorar o sabor dos alimentos (MAYER, 1991 *apud* FABRE, 1996).

Nos últimos anos têm aumentado a produção de aromas por processos biotecnológicos devido à baixa qualidade dos aromas sintéticos, que nem sempre podem ser comparados aos produzidos naturalmente, como também, devido ao aumento na procura por ingredientes alimentares de origem natural. Em adição, a síntese de aromas por via biotecnológica tem crescido em virtude dos avanços científicos na área de processos biológicos, através da utilização de microrganismos ou de suas enzimas, como uma alternativa viável para sínteses químicas combinada aos recentes desenvolvimentos de técnicas analíticas mais precisas e sensíveis.

A identificação de compostos responsáveis por determinados aromas, aliada à necessidade de melhorar a qualidade dos produtos alimentícios, tem levado as empresas a investirem na produção industrial de compostos aromatizantes, desde os mais simples até os mais complexos. Os aromas produzidos por microrganismos são reconhecidos por apresentarem características organolépticas mais apreciáveis em relação àqueles obtidos por via sintética (FABRE, 1996).

Poucos produtos aromatizados artificialmente obtiveram aceitação mercadológica. Alguns aromas são formados por uma série de substâncias complexas, em dosagens determinadas e a única maneira de obtê-los é através de suas fontes naturais.

Durante muito tempo as plantas foram a única fonte de compostos aromatizantes, muitas vezes extraídos de óleos essenciais (JANSSENS *et al.*, 1992 e KEMPLER, 1983). Estes compostos são altamente específicos, ou seja, opticamente ativos e freqüentemente estão presentes em pequenas quantidades ou ainda, estão ligados a outras substâncias, acarretando uma redução no suprimento de matéria-prima e gastos com a purificação. Além disso, a extração de aromas de plantas, é dependente de fatores que dificultam o controle do produto, tais como a sazonalidade, a influência do clima, o risco de pragas, além de serem compostos pouco estáveis durante o processamento e o armazenamento. Todos estes fatores influenciam diretamente a variabilidade, a quantidade e a qualidade do produto final (SHINDLER & SHMID, 1982, MORETTO & FETT, 1988, JANSSENS *et al.*, 1992 e KRINGS *et al.*, 1995).

Cerca de 84% dos aromas industrializados hoje em dia são produzidos por síntese química. Entretanto, eles não são considerados substâncias naturais e não têm o mesmo valor econômico que aromas naturais. A estrutura complexa de certos aromas é um grande obstáculo à síntese química e há formação de misturas racêmicas indesejáveis, além da crescente aversão dos consumidores a aditivos químicos (JANSSENS *et al.*, 1992 e WELSH, 1995).

Por outro lado, as vias sintéticas dos microrganismos podem ser manipuladas para produzir certas moléculas que são normalmente limitadas a pequenas quantidades pelos mecanismos regulatórios celulares. O uso de microrganismos consiste numa



alternativa viável à produção de aromas e fragrâncias naturais, pois eles produzem essas substâncias em grandes quantidades e em um curto período de tempo, além de que suas vias metabólicas estão bastante esclarecidas e utilizam matéria-prima de baixo custo e de fácil aquisição (KEMPLER, 1983).

Além disso, os microrganismos também podem ser usados na produção de compostos que não estão disponíveis através de outras fontes biológicas ou químicas. A estereo-especificidade do sistema enzimático microbiano elimina a formação de misturas racêmicas, particularmente nos casos de isômeros ópticos com propriedades sensoriais distintas, podendo se obter aromas com perfis típicos (KEMPLER, 1983, GATFIELD, 1988 e HERRÁIZ, 1990) e aumentar o rendimento, atendendo as características complexas dos aromas que não podem ser criados pela mistura de componentes químicos conhecidos.

Em adição, os compostos produzidos através de processos biossintéticos são considerados naturais, desde que as matérias-primas sejam de origem natural, um fato que vem ganhando muita importância atualmente (KEMPLER, 1983, BERGER *et al.*, 1988; CHRISTEN & LOPEZ-MUNGUÍA, 1994; e WELSH, 1995). Os microrganismos ainda são capazes de transformar compostos químicos utilizando mecanismos de hidroxilação, oxidação, ruptura, rearranjo ou redução, difícil de se obter por reações convencionais (SHINDLER & SCHMID, 1982, KEMPLER, 1983 e CHRISTEN & LOPEZ-MUNGUÍA, 1994).

Muitos processos biotecnológicos capazes de produzir aromas têm sido descritos, entretanto, o número de aplicações industriais é limitado. Uma razão para isso, em muitos casos, é o baixo rendimento. Os aromas freqüentemente estão presentes em pequenas concentrações no meio fermentativo, refletindo em elevados custos no processo de recuperação. Isso é compensado pelo fato que o preço de aromas naturais é 10 a 100 vezes superior que aqueles obtidos sinteticamente. Isso significa que o preço do aroma microbiológico deve estar na faixa entre 200 e 2000 dólares o quilo (JANSSENS *et al.*, 1992).

Portanto, a influência de todos esses fatores tem incentivado à procura de compostos de importância comercial como é o caso do acetato de etila, aplicado na composição do aroma de frutas em indústrias de alimentos e cosmética (KIRK-

OTHMER, 1983). O acetato de etila é também utilizado como solvente na descafeinização de chás e cafés e no aumento da octanagem da gasolina (ARMSTRONG *et al.*, 1984). Entretanto, seu maior emprego está na indústria de medicamentos (McHILL, 1971 e KIRK-OTHMER, 1983). Muitos trabalhos relativos à produção de ésteres por via biotecnológica têm sido descritos por ARMSTRONG *et al.* (1984), PEIXOTO (1996), JANSSENS *et al.* (1992) entre outros, no entanto a produção biotecnológica de acetato de etila, é bastante limitada.

Dentre os microrganismos produtores de aromas, os fungos são os mais estudados (JANSSENS *et al.*, 1992). Muitas leveduras sob condições adversas produzem compostos aromatizantes como *Tyromyces sambuceus*, *Ceratocystis* sp. *Yarrowia lipolytica*, *Kloeckera saturnus*, *Hansenula anomala*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Geotrichum* sp, *Kluyveromyces lactis*, entre outras (YOSHIOKA & HASHIMOTO, 1991; ARMSTRONG *et al.*, 1984).

A levedura *Hansenula anomala* é um microrganismo osmotolerante e apresenta excelente habilidade em produzir acetato de etila a partir de açúcares simples, como a glicose (LANCIOTTI *et al.*, 1998).

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo principal o estudo de alguns parâmetros relacionados à obtenção do acetato de etila de origem microbiológica, através da fermentação em batelada.

Neste contexto, os objetivos específicos foram:

- Estudo da cinética de produção de acetato de etila pela levedura *Hansenula anomala* em diferentes concentrações iniciais de glicose e em diferentes temperaturas;
- Avaliação da influência na suplementação do meio de cultura com fontes extras de fósforo e nitrogênio na produção do acetato de etila;
- Avaliação da aeração durante a fermentação.

## **II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **II.1 AROMAS**

#### **II.1.1 Terminologia**

O sabor do alimento é o resultado de um conjunto de sensações psicofisiológicas de natureza complexa. Ao se colocar em palavras os resultados da avaliação organoléptica de um determinado produto, é natural que ocorram dificuldades e até mesmo algumas dúvidas, por isso, é necessário definir alguns termos empregados.

##### **II.1.1.1 Aromatizantes e Flavorizantes**

OSOL & HOOVER (1975) definem flavorizantes como substâncias químicas ou misturas que são acrescentadas a um alimento ou medicamento, com a intenção de suplementar, modificar seu "flavor" próprio ou para mascarar o original. "Flavor" é caracterizado por uma sensação complexa, na qual integram-se as sensações de odor, gosto, textura, etc.

Segundo KIRK-OTHMER (1983), flavorizantes são substâncias que causam sensação simultânea de sabor e odor em um alimento, ou seja, são descrições que apresentam como sinônimo usual o gosto.

"International Flavors and Fragrances"–IFF, consideram o termo flavorizante como uma ou mais substâncias dotadas de propriedades organolépticas, capazes de

conferir e/ou acentuar o sabor dos alimentos. São considerados como sinônimos os aromas, "flavor" e aromatizantes (ANONYME, 1997).

A Legislação Brasileira por sua vez (Resolução 22/76 da CNNPA do MS 1976) define como: "uma substância ou mistura de substâncias de propriedades odoríferas e/ou sabor dos alimentos, incluem-se nessa definição, as bebidas e excluem-se os produtos que apresentam apenas sabor doce, salgado ou ácido" (SIMÃO, 1985).

#### **II.1.1.2 Aromas químicos**

Aromas químicos são compostos orgânicos voláteis, encontrados em alimentos que fornecem uma característica organoléptica distinta e particular (de frutas, florais, etc). Frequentemente, eles são produzidos via biocatálise, por processos metabólicos secundários e não primários (HAGEDORN & KAPHAMMER, 1994).

#### **II.1.1.3 Aroma alimentar**

Designa-se por aroma alimentar uma preparação concentrada de substâncias aromáticas (odorantes e gustativas), destinada a ser adicionada a gêneros alimentícios para lhes dar ou reforçar o cheiro e/ou o sabor (MOLL & MOLL, 1990 *apud* FABRE, 1996).

#### **II.1.1.4 Aroma natural**

De acordo com o guia do FDA (Food and Drug Administration) dos Estados Unidos, publicado em 1958, os aromas naturais devem ser produzidos a partir de matérias-primas naturais, e que o produto final deve ser idêntico a um composto já existente "in natura". Deste modo, aromas obtidos por biocatalisadores e/ou através da transformação de substâncias naturais podem ser legalmente rotuladas como naturais (HORTON, 1987).

## II.1.2 Classificação dos Aromatizantes

A Organização Internacional da Indústria de Aromas separa em quatro classes as substâncias aromatizantes:

- a primeira é a de produtos naturais obtidos de plantas ou de animais, ou esses produtos processados para o consumo humano.
- A segunda classe, refere-se aos concentrados de aromas naturais ou de substâncias puras obtidas por métodos físicos.
- A terceira, são substâncias aromatizantes “idênticas às naturais”, obtidas por síntese química, ou através de reações químicas desde a matéria-prima.
- E a última, são substâncias aromatizantes artificiais, que são obtidas sinteticamente, as quais não são identificadas como componente natural de um alimento (HEATH & REINECCIUS, 1986; KATZ, 1986 e HERRÁIZ, 1990).

Por outro lado a Legislação Brasileira dividem os compostos aromatizantes de acordo com o critério mais comum em naturais e artificiais:

- Substância aromatizante artificial (substância quimicamente definida, obtida por síntese ou outro processo químico adequado e que ainda não foi encontrada na natureza, adicionada ou não de matéria-prima aromatizante natural (tais como ervas, frutas, especiarias, etc.), produto aromatizante natural (preparação de composição complexa, como infusões, óleo-resinas, extratos vegetais) ou de substância aromatizante idêntica à natural.
- Substância aromatizante “idêntica à natural” – substância quimicamente definida, dotada de propriedades organolépticas, obtidas por síntese ou outro processo químico adequado e que apresenta a estrutura idêntica à substância aromatizante natural como mentol.

### **II.1.3 Aspectos regulatórios e condições legais da produção biotecnológica de aromas**

O “Federal Food, Drug and Cosmetic Act” (novembro de 1966), regulamentado pelo FDA no parágrafo 121.1164, declara que as substâncias aromatizantes sintéticas e adjuvantes podem ser usadas em alimentos quando sujeitas as seguintes condições:

- Usadas em quantidades mínimas requeridas para produzir efeito pretendido e de acordo com todos os princípios da boa prática de manufatura;
- Ingredientes aromatizantes sintéticos constituem-se de uma ou mais formas apropriadas, usados sozinhos ou em combinação, geralmente reconhecidos como seguros e previamente autorizados para uso em alimentos (BERGER, 1995).

Do ponto de vista da Saúde Pública seria muito mais recomendável que fossem usados em alimentos, os aromatizantes naturais e não os artificiais, que são causadores, de modo geral, de moléstias alérgicas, além de não apresentarem valor nutritivo (SIMÃO, 1985).

### **II.1.4 Aplicações**

Pesquisas recentes indicam que os consumidores estão mais preocupados em consumir produtos frescos e naturais, ou alimentos que apresentam na sua composição ingredientes naturais em substituição aos aditivos químicos. Essa tendência pode ser atribuída a crescente consciência de um estilo de vida saudável através de alimentos com alto valor nutritivo, encorajando desta forma, o desenvolvimento de produtos alimentícios naturais. Para atender a esta crescente demanda do mercado consumidor, os processos biotecnológicos estão sendo usados para produzir diversos aditivos para a indústria de alimentos (HORTON, 1987). Sua aplicação cresce também na área de

medicamentos ingeridos via oral, contribuindo no processo de aceitação e ingestão, ajudando na manutenção e na recuperação da saúde (MORETTO & FETT, 1988).

É importante ressaltar que os aromatizantes têm ganhado mercado em vários produtos, principalmente naqueles que apresentam níveis muito reduzidos de ingredientes agradáveis ao paladar (ANONYME, 1997).

### II.1.5 Os processos biotecnológicos e a indústria de aromas

Os processos biotecnológicos são de grande interesse para a indústria de aromas, pois podem permitir a produção em grande escala de importantes insumos aromatizantes a custos relativamente baixos.

Os aromas biotecnologicamente gerados são denominados naturais, sendo portanto, mais valorizados no mercado que aromas sintéticos, conhecidos como aditivos químicos artificiais, além de outras vantagens relacionadas ao uso de microrganismos em sua produção.

A maioria dos aromas naturais é o resultado da mistura de compostos biologicamente ativos, que geralmente apresentam estruturas complexas com vários grupos funcionais. Normalmente estes compostos são encontrados em baixas concentrações (SARIASLANI & ROSAZZA, 1984), em frutas frescas estão abaixo de 30 ppm (WELSH, 1995 e BOELEN *et al.*, 1995).

Muitos processos microbianos são capazes de produzir aromas interessantes, no entanto, o número de aplicações industriais ainda é muito limitado, devido aos baixos rendimentos (PARLIMENT, 1986, BERGER *et al.*, 1988; HERRÁIZ, 1990; e WELSH, 1995). A maioria dos voláteis são produzidos somente em quantidades "traços", uma vez que as reações necessárias para a sua formação são energeticamente desfavoráveis. Para substratos específicos, a produção é em torno de  $\text{mg.L}^{-1}$ , e em alguns casos, o substrato pode ser completamente convertido a gás carbônico e biomassa, sem nenhum acúmulo do produto (SCHARPF *et al.*, 1986 e WELSH, 1995). Apesar de existirem problemas desfavoráveis a sua produção, um número de processos e produtos comercialmente favoráveis tem surgido, através de pesquisas

envolvidas na produção de moléculas obtidas por métodos enzimáticos e biotecnológicos.

DZIEZAK (1986) cita exemplos de indústrias que utilizam a biotecnologia para produção de bioaromatizantes e as vantagens proporcionadas pelo uso desse método, principalmente em termos econômicos.

### II.1.6 Mercado de aromas

ARMSTRONG (1984) e GILLIES & YAMAZAKI (1989) comentaram que o mercado mundial de aromas está em constante crescimento, com uma forte tendência a compostos "naturais".

De acordo com BERGER (1995), o custo na produção de aromas via biotecnológica ainda não se justifica para alguns álcoois e cetonas que são sintetizados com relativa facilidade a partir de hidrocarbonetos. Entretanto, a experiência mostra que o desenvolvimento tecnológico de alternativas de produção e extração associado a aceitabilidade de produtos naturais certamente tornará o processo biotecnológico mais competitivo.

KRINGS & BERGER (1998) citam que aproximadamente 6400 compostos de aromas naturais e 10000 fragrâncias sintéticas são conhecidas, entretanto, um pouco mais de 100, são legalmente usadas em aromas e fragrâncias, e em torno de apenas 400 aromas sintéticos são manufaturados numa escala maior que uma tonelada por ano.

HORTON (1987) comentou que o mercado de aromatizantes está se preparando para crescer numa taxa anual de aproximadamente 30%. Esse aumento foi justificado pela crescente mudança da população, por uma classe mais idosa. Esse fator está diretamente associado à diminuição da perspicácia no sabor entre pessoas mais velhas, refletindo na necessidade de produtos com aromas mais intensos.

Na revisão sobre produção de aromas por microrganismos, UNGER (1989) *apud* JANSSENS *et al.* (1992) citam que 84% dos aromas são produzidos sinteticamente, entretanto, devido a crescente preferência dos consumidores por produtos de origem natural, o mercado de aromas e fragrâncias vem exigindo estratégias inovadoras para



os aromas químicos. Os autores retratam esse interesse em detrimento da síntese química de aromas, pelo fato dos consumidores suspeitarem que os aromas sintéticos são tóxicos ou prejudiciais à saúde.

GODFREY (1983), CHEETHAM (1991) *apud* CHRISTEN & LÓPEZ-MUNGUÍA (1994) e JANSSENS *et al.* (1992) verificaram que os compostos aromatizantes representam 10-15% do mercado mundial de aditivos alimentares, ou seja, um montante de quase 7 bilhões de dólares por ano.

### II.1.7 Grupos de Aromas e a Importância dos Ésteres

ARMSTRONG & BROWN (1994), MANLEY (1995) e WELSH (1995) citam algumas funções químicas que são responsáveis por aromas característicos: álcoois, ácidos, ésteres, cetonas, lactonas, aldeídos (GATFIELD, 1995) e outras moléculas complexas que resultam do metabolismo secundário de plantas ou que podem ser obtidas de fontes animais. Certos fungos, leveduras e bactérias também possuem potencial para o metabolismo secundário e podem produzir aromas e fragrâncias.

Há muitos compostos de aromas com importância industrial, tais como terpenos, lactonas, pirazinas, ésteres, ácidos, álcoois, etc. Entre os compostos mais importantes na indústria de aromas de alimentos destacam-se os ésteres, que conferem diversos aromas de flores e frutas, além de conferirem também, aroma a alimentos fermentados.

Os ésteres são compostos de aromas muito importantes e são difundidos "in natura" numa grande variedade de gêneros alimentícios. Tipicamente esses compostos são apresentados em concentrações razoavelmente baixas, geralmente entre 1 e 100ppm (JANSSENS *et al.*, 1992). A literatura apresenta-os como produtos biossintéticos de muitos microrganismos (GATFIELD, 1988).

De acordo com ARMSTRONG *et al.* (1984) e ARMSTRONG (1986), os ésteres são produzidos em pequenas quantidades por alguns microrganismos, e poucos são capazes de produzir quantidades significativas deste composto.

## Acetato de Etila

O acetato de etila tem como característica particular e de nosso interesse, seu aroma característico de frutas. É o éster mais comum na composição de vinhos, além de ser um composto orgânico natural presente em muitas frutas, alimentos e bebidas alcoólicas.

Na indústria de alimentos, o acetato de etila é usado como aromatizante e reforçador do "aroma" (KIRK-OTHMER, 1983), entrando também em formulações de cremes, bebidas e sobremesas geladas.

A publicação "Food Chemical News" GUIDE, que trata da regulamentação de aditivos em alimentos nos EUA, cita o uso de acetato de etila como aromatizante de cervejas e solvente na descafeinização do café e chá. Seu maior emprego, entretanto, está na indústria de fármacos (McHILL, 1971 e KIRK-OTHMER, 1983).

Quando o acetato de etila é produzido sinteticamente, ele participa na formulação de laquês e perfumes, manufatura de acetato de Rayon, pólvora sem fumaça, ceras e indústria de filmes fotográficos, é aplicado também como solvente em tintas e vernizes, tintas para impressão, adesivos, thinner e removedores, filmes fotográficos, explosivos e recobrimento de papéis. Este composto é usualmente comercializado em solução a 85%. (McHILL, 1971 e KIRK-OTHMER, 1983).

Conforme ARMSTRONG *et al.* (1984), o acetato de etila também apresenta diferentes aplicações daquelas que citam-no como solvente geral, sendo utilizado como aditivo para aumentar a octanagem na gasolina ou até mesmo, como um solvente químico versátil.

## II.2 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE AROMAS

Desde o advento da cerveja, do vinho, do queijo e demais produtos fermentados, os processos microbiológicos tornaram-se uma fonte integral no desenvolvimento de misturas complexas de aromas alimentares (BERGER & KRINGS, 1998).

Historicamente os microrganismos têm se apresentado como uma fonte

importante no desenvolvimento de aromas dentro de muitos produtos alimentícios. O aroma em alimentos fermentados é o resultado de interações bioquímicas complexas, de reações enzimáticas e não-enzimáticas de açúcares, aminoácidos, lipídios e outros que são direcionados por parâmetros físicos (temperatura, pH e tempo) para o processamento dos alimentos.

O emprego de microrganismos na formação de aromas por fermentação foi previsto por Pasteur em 1876 de acordo com JANSSENS *et al.* (1992), muitos microrganismos são capazes de produzir aromas e a variação da concentração destes compostos é função das linhagens que podem assim, imprimir um caráter particular aos diferentes aromas (FLEET & HEARD, 1993).

Muitas leveduras produzem compostos aromatizantes. Alguns deles foram relatados a partir de cepas de *Kloeckera apiculata*, *Hanseniaspora guillermondii*, *Tyromyces sambuceus*, *Ceratocystis* sp., *Yarrowia lipolytica*, *Kloeckera saturnus*, *Hansenula anomala*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Geotrichum* sp. e *Kluyveromyces lactis*. Estes estudos mostram que a produção de voláteis é dependente da composição do meio e das condições de cultivo (FABRE *et al.*, 1995).

Várias leveduras do gênero *Saccharomyces* (YOSHIOKA & HASHIMOTO, 1981), *Hansenula* (TABACHNIK & JOSLYN, 1953 e DAVIES, *et al.*, 1951) e *Candida utilis* (ARMSTRONG *et al.*, 1984 e ARMSTRONG, 1986) produzem acetato de etila a partir de glicose ou de etanol. *Saccharomyces* sp. produz concentrações muito baixas de acetato de etila (níveis encontrados em bebidas alcoólicas), enquanto *Hansenula anomala* produz quantidades significantes do éster a partir de glicose ou de etanol, somente após um longo período de fermentação em batelada (DAVIES *et al.*, 1951 e ARMSTRONG *et al.*, 1984).

ARMSTRONG *et al.* (1984) estudaram o potencial de *Candida utilis* na recuperação de etanol diluído à acetato de etila através de processos fermentativos em batelada. Durante o desenvolvimento desse trabalho foi investigada a cinética de acúmulo do etanol e do acetato de etila na presença de glicose sob aeração apropriada e suplementação em ferro.

MARIC *et al.* (1979) verificaram durante seus estudos para produção de cerveja a partir de uma cultura mista de leveduras de *Saccharomyces cerevisiae* e

*Saccharomyces bayanus*, a influência de alguns fatores na produção de determinados ésteres, dentre eles, o acetato de etila que em altas concentrações alterava as características finais no produto. Uma série de experimentos foram realizados com processos em batelada e contínuo, empregando culturas puras e a mistura das duas leveduras.

Nos experimentos em batelada, com cultura pura das duas leveduras foi encontrado uma redução similar em percentual de substrato. No período de 90 horas, *Saccharomyces bayanus* produziu quatro vezes mais acetato de etila ( $40 \text{ mg.L}^{-1}$ ) que *Saccharomyces cerevisiae* em 72 horas de fermentação ( $10 \text{ mg.L}^{-1}$ ). De acordo com os resultados, os autores afirmaram que:

- existe uma relação entre a taxa de crescimento do microrganismo e a síntese de ésteres do ácido acético;
- leveduras que fermentam rápido produzem uma quantidade menor de ésteres.

Com o objetivo de verificar a qualidade do vinho, DI STEFANO *et al.* (1981) analisaram a presença de acetato de etila e compostos voláteis presentes na sua composição. Eles estudaram a produção de ésteres em seis espécies de leveduras tanto em meio sintético ( $200 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose e  $0,4 \text{ g.L}^{-1}$  de nitrato de amônia) quanto em meio natural (mosto do vinho Cortese de Ilánnata 1980, livre de  $\text{SO}_2$ ). Na Tabela II.1, a levedura *Saccharomyces bayanus* destaca-se na produção de acetato de etila em meio natural. Uma característica freqüente apresentada neste estudo é a maior produção de acetato de etila em meio natural, por isso os autores concluíram, que a presença de micronutrientes no meio natural é essencial para obter maiores concentrações do éster.

TABELA II 1: Produção de acetato de etilá e etanol por seis espécies de levedura (Reprodução de parte dos resultados do artigo de DI STEFANO *et al.* (1981)).

| Linagem | Acetato de etilá <sup>1</sup> (mg.L <sup>-1</sup> ) | Acetato de etilá <sup>2</sup> (mg.L <sup>-1</sup> ) | Etanol <sup>1</sup> % (v/v) | Etanol <sup>2</sup> % (v/v) |
|---------|---|---|-----------------------------|-----------------------------|
| S46c    | 19,4  | 36,3  | 10,34                       | 12,41                       |
| S46c    | 14,4  | 36,2  | 10,12                       | 12,76                       |
| S14i    | 9,2   | 25,3  | 3,64                        | 12,31                       |
| S14i    | 32,6  | 26,0  | 10,56                       | 12,33                       |
| S22b    | -   | 73,0  | -                           | 12,14                       |
| S22b    | -   | 50,0  | -                           | 12,76                       |
| S43u    | 9,2   | 17,0  | 9,15                        | 10,45                       |
| S43u    | 7,3   | 13,9  | 9,42                        | 11,23                       |
| S11r    | 6,7   | 16,5  | 4,7                         | 6,57                        |
| S11r    | 6,3   | -   | 4,89                        | -                           |
| Schiz.5 | 7,7   | 10,0  | 5,57                        | 7,57                        |
| Schiz.5 | 6,4   | -   | 5,28                        | -                           |

<sup>1</sup> - Meio Sintético;

<sup>2</sup> - Meio Natural.

S46c - *Saccharomyces cerevisiae*, S22b - *Saccharomyces bayanus*, S43u - *Saccharomyces uvarum*, S14i - *Saccharomyces italicus*, S11r - *Saccharomyces rosei* e Schiz.5 - *Schizosaccharomyces pombe*

### Hansenula anomala

Na literatura existem contradições relacionadas à produção de acetato de etilá pela levedura *Hansenula anomala*.

QURESHI & TAMHANE (1987), PASTORE (1994) e PEIXOTO (1996) mencionam *Hansenula anomala* como uma levedura boa formadora do aroma acetato de etila. No entanto, WIJAVA (1995) com a intenção de encontrar novas fontes de aromas naturais a partir de microrganismos, comenta que essa levedura produz pouco álcool e ésteres, inclusive acetato de etila.

Essa levedura é muito conhecida por suportar elevadas concentrações de glicose no meio de cultivo, osmotolerante, além da sua habilidade de produzir altas concentrações de acetato de etila (LANCIOTTI *et al.*, 1998).

PEIXOTO (1996) e MORITZ *et al.* (2000) observaram durante a formação de acetato de etila e etanol pela levedura *Hansenula anomala*, um perfil cinético de reações consecutivas, cujo substrato é convertido a um produto, acetato de etila, com acúmulo de um intermediário, o etanol.

De acordo com MORITZ (1998), *Hansenula anomala* produz muito mais acetato de etila, 3,6 g.L<sup>-1</sup> que as leveduras apiculadas, *Hanseniaspora guilliermondii*, 1,3 g.L<sup>-1</sup> e *Kloeckera apiculata*, 1,1 g.L<sup>-1</sup>.

QURESHI & TAMHANE (1987) imobilizaram *Hansenula anomala* em gel de alginato de cálcio, visando produzir em reatores de leito fixo, etanol e acetato de etila. Os resultados encontrados apresentaram um valor máximo na produção de acetato de etila de 730mg.L<sup>-1</sup> e uma concentração no momento da produtividade máxima em etanol de 680 mg.L<sup>-1</sup>.

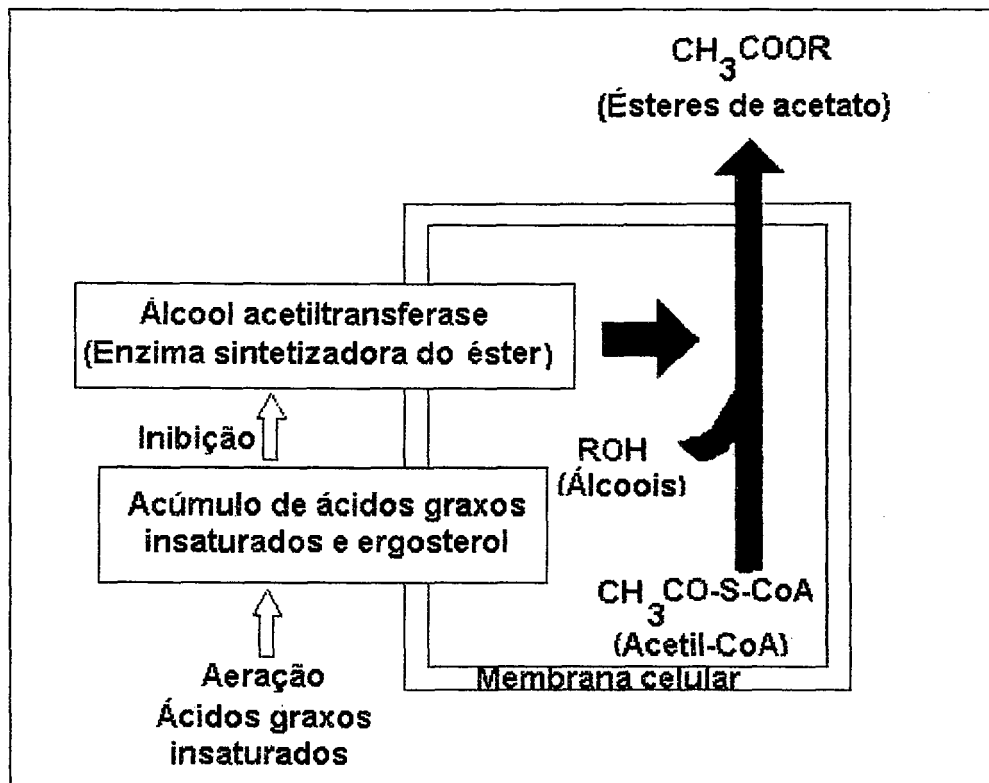
### II.3 VIAS METABÓLICAS

A via metabólica geral da formação de ésteres por leveduras foi elucidada em 1964 por NORDSTRÖM *apud* KILLIAN & OUGH (1979). A biossíntese desta classe de compostos, dá-se pela esterificação enzimática de ácidos carboxílicos com álcoois, através da ação de algumas enzimas como esterases, álcool acetil transferases e acetil-CoA.

NORDSTRÖM (1962 e 1963) *apud* YOSHIOKA & HASHIMOTO (1983) demonstrou que vários fatores influenciam no fornecimento e no consumo de acetil-CoA, afetando na formação de acetato de etila durante a fermentação. O autor propôs que a biossíntese dos ésteres ocorre através da alcoólise de acetil-CoA, fator chave na formação de ésteres de acetato.

Somente em 1983 e 1984, YOSHIOKA & HASHIMOTO exibem seus resultados sobre o isolamento da enzima álcool acetiltransferase. Ela foi isolada na membrana de células de levedura de fabricação da cerveja, possuindo condições ótimas de ação, ou seja, maior atividade a 30°C e pH 7,8. Ela apresenta como característica, menor atividade em álcoois de três átomos de carbono, dentre os que apresentam 1 a 6 átomos, possuem uma atividade ligeiramente maior sobre álcoois de cadeia linear do que em álcoois ramificados de mesmo número de átomos de carbono e é tremendamente inibida por ácidos graxos insaturados, ergosterol e íons de metais pesados. Um mecanismo proposto pelos autores para formação de ésteres é apresentado na Figura II.1.

Mais tarde, KANG *et al.* (1986) isolaram-na na membrana de *Hansenula anomala*, na qual apresentou uma atividade ótima a 30°C e pH 7,0. A exemplo dos resultados obtidos por YOSHIOKA & HASHIMOTO (1983), ela foi tremendamente inibida por íons de metais pesados e ácidos graxos com alto grau de insaturação.



**FIGURA II 1:** Mecanismo proposto para formação de ésteres de acetato sobre a influência da composição em ácidos graxos da membrana celular pela enzima álcool acetiltransferase (Reprodução da Figura de YOSHIOKA & HASHIMOTO, 1983).

A produção de acetil-CoA, passo fundamental para a produção de ésteres de acetato, pode ser compreendida pela análise da via metabólica da glicólise. A glicose utilizada nas fermentações entra na via glicolítica, seguindo-a até a chegada ao piruvato, Figura II.2, componente importante para a produção do acetil-CoA, peça fundamental para a produção do acetato de etila.



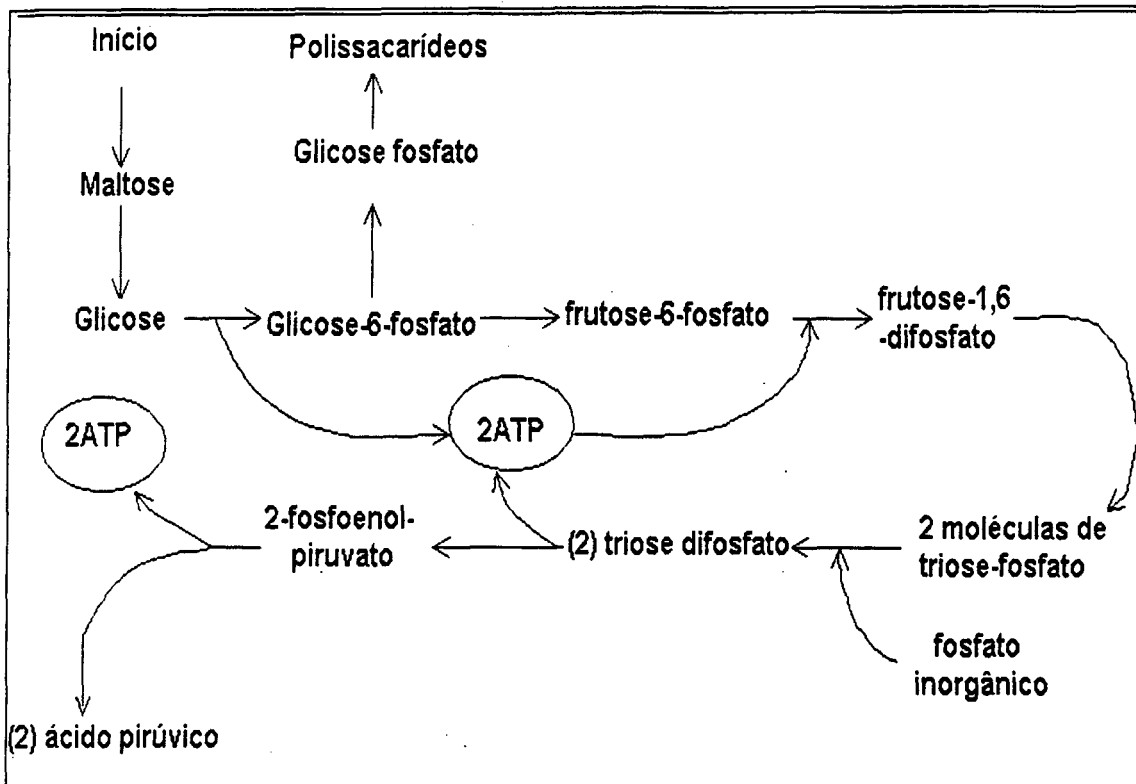


FIGURA II 2: Via glicolítica (VOET & VOET, 1990).

A partir do piruvato encontra-se duas vias para a formação de acetil-CoA: a primeira, em aerobiose, por ação da enzima piruvato descarboxilase e a segunda via, em anaerobiose, onde ele pode se transformar em acetaldeído, pela enzima piruvato descarboxilase, ou ainda, pode-se formar acetato através da enzima aldeído desidrogenase, ou pode também ir a etanol, bastando que a enzima etanol desidrogenase catalise a transformação de acetaldeído em etanol. Este esquema pode ser observado na Figura II.3.

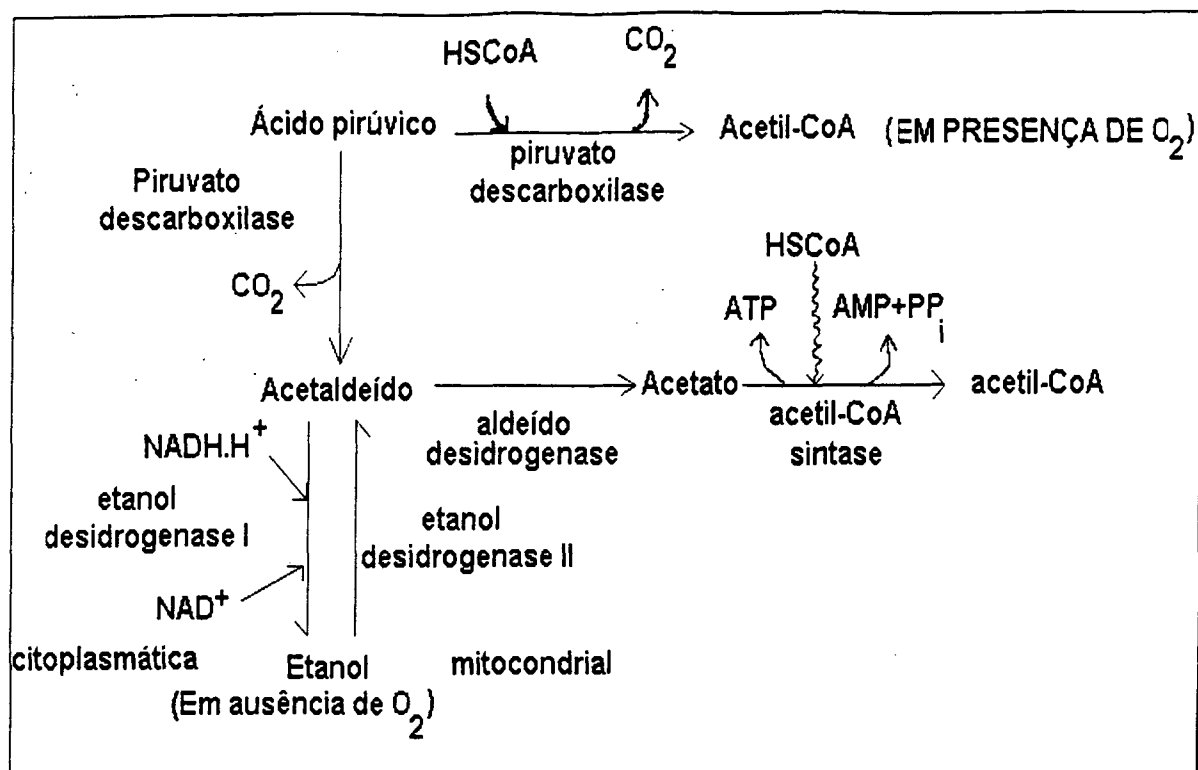


FIGURA II 3: Vias metabólicas propostas para a produção de acetil-CoA nas células de levedura (VOET & VOET, 1990).

Um fator relevante que deve ser observado nesse processo, é a reversibilidade ditada por condições de ativação e inibição das enzimas. Portanto, partindo desta idéia, o etanol surge como fator primordial na síntese de éster, podendo este ser reagente na síntese do acetil-CoA (Figura II.3).

A aeração e a concentração de etanol surgem como peças chave na regulação das enzimas que levam a produção do acetil-CoA e do éster, acetato.

### II.3.1 Dificuldades apresentadas pelos processos fermentativos

A produção de voláteis por fermentação implica numa baixa concentração do produto hidrossolúvel disperso numa grande quantidade de água. Geralmente estes compostos apresentam problemas durante os processos de extração e de recuperação, proporcionando altos custos na sua produção. É interessante relembrar, que tudo isto é compensado pelo alto valor do mercado de aromas naturais, cerca de 10 a 100 vezes maior que aromas sintéticos (HERRÁIZ, 1990 e JANSSENS *et al.*, 1992).

Segundo JANSSENS *et al.* (1988), uma grande desvantagem na produção de ésteres num processo fermentativo são as perdas que ocorrem ao longo de todo o processo fermentativo. Eles enfatizam bastante a importância da otimização do meio de fermentação e do emprego de diferentes técnicas na condução de processos, para maximizar a produção de ésteres e evitar as perdas.

KILLIAN *et al.* (1979), JANSSENS *et al.*, (1979) e SCHARPF *et al.* (1986) explicam que o arraste do acetato de etila durante o processo, influencia significativamente no rendimento do processo.

Outra constante preocupação está na concentração do produto final presente no meio de cultivo, normalmente é necessário mantê-la abaixo de determinados níveis, devido a efeitos toxicológicos ou inibitórios nos microrganismos. Este tipo de problema, é muitas vezes superado pela retirada contínua destes produtos finais do meio de cultura.

Geralmente os aromas produzidos por microrganismos são metabólitos secundários, ou seja, necessitam de longos períodos de fermentação. Esse fator tempo reflete diretamente nos custos, e como consequência, há maiores riscos de contaminação por microrganismos indesejáveis no processo (SCHARPF *et al.*, 1986, ABRAHAM *et al.*, 1993 e JIANG, 1995).

### II.3.2 Processos de recuperação de acetato de etila e etanol

O processo de recuperação de compostos voláteis é um processo complicado, primeiro porque geralmente estão presentes em baixas concentrações e principalmente porque podem ser arrastados, evaporados ou ainda servir de substrato na biossíntese de outros compostos (MORITZ *et al.*, 2000).

Segundo ARMSTRONG *et al.* (1983), alguns processos fermentativos produzem altos níveis de etanol no meio (acima de 6%), e a forma tradicional de recuperá-lo é através da destilação convencional. No entanto, quando os níveis são baixos, os métodos convencionais de recuperação são inadequados, pois consomem muita energia. Portanto, na busca de processos economicamente viáveis, os autores pesquisaram a conversão de níveis de etanol diluído à acetato de etila, através da levedura *Candida utilis* e obtiveram bons resultados no desenvolvimento deste processo. Eles comentam também, que outros processos de recuperação estão sob consideração, incluindo membranas ou técnicas à vácuo, entretanto, determinados problemas técnicos ainda limitam sua utilização. Com relação a recuperação de acetato de etila, esterificações biológicas têm sido sugeridas como um meio de recuperação de ácidos orgânicos derivados da biomassa. Esse método é uma boa alternativa à extração por solvente simples.

Outros estudos como conversões enzimáticas em solventes orgânicos e extração contínua com solventes apolares estão sendo investigados. Sugere-se ainda, métodos para a remoção contínua de produtos finais apolares, através do uso de resinas apolares assim como amberlit, usada para recuperação de terpenos. Outra forma, está na remoção contínua por "gas stripping" ou fermentação à vácuo (JANSSENS *et al.*, 1992).

JANSSENS *et al.* (1992) estudou o comportamento da levedura *Hansenula mrakii* na recuperação de óleo fusel em seus respectivos acetatos. Durante esse

trabalho, os ésteres volatilizados no processo aeróbio foram adsorvidos por carvão ativo, evitando-se perdas.

AKHTA (1985) estudou a produção de compostos representativos do aroma em "bouquet" de vinhos e mostos fermentados. Esse artigo apresenta uma metodologia, empregando freon 11, na extração de ésteres e outros metabólitos de produtos fermentados por quatro espécies de levedura empregadas em fermentações de vinho.

## **II.4 FATORES QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DE ACETATO DE ETILA**

A produção de determinados ésteres durante a fermentação é extremamente afetada por variáveis, tais como composição do meio (fonte de carbono, nitrogênio e outros elementos), pH, tempo de fermentação, temperatura de incubação, agitação e aeração, além da linhagem do microrganismo. Estas variáveis geralmente estão envolvidas no mecanismo fisiológico que influenciam diretamente no tipo e quantidade de produto formado pelos microrganismos (GATFIELD, 1988; JANSSENS *et al.*, 1988; SARIASLANI & ROSAZZA, 1984; SCHARPF *et al.*, 1986 e WELSH, 1995).

### **II.4.1 Oxigênio dissolvido**

A maioria dos processos biotecnológicos ocorre em condições de aerobiose. A demanda de oxigênio em um processo industrial de fermentação é normalmente suprida através da aeração e/ou agitação. Geralmente, a produtividade de muitas fermentações é limitada pela disponibilidade do oxigênio no meio, por isso é importante considerar os fatores que afetam a eficiência na sua transferência, como por exemplo, a temperatura, a aeração, a concentração de sais, entre outros (STANBURY & WHITAKER, 1984).

Alguns autores citam que a concentração de oxigênio dissolvido no meio é peça chave na produção de ésteres. O acúmulo do éster acetato de etila é confirmado por DAVIES *et al.* (1951), TABACHNICK & JOSLYN (1953) e NORDSTRÖM (1964) *apud* ARMSTRONG *et al.* (1984).

PEIXOTO (1996) analisando o comportamento da levedura *Hansenula anomala* frente a processos aeróbios e anaeróbios, concluiu que não ocorre formação de acetato de etila, etanol e células em condições de anaerobiose, confirmando que o oxigênio é um fator relevante na produção do éster.

Na conversão de etanol à acetato de etila pela levedura *Candida utilis*, ARMSTRONG *et al.* (1984) demonstraram que a aeração teve um efeito significativo. No emprego de uma aeração baixa, o acúmulo do éster foi mínimo, pouco etanol foi utilizado nesse processo de conversão. Com o aumento da aeração, o acúmulo do éster e o consumo do etanol foram mais rápidos. Entretanto, quando se utilizou um nível muito alto de aeração, o rendimento em éster decresceu.

ELLIS (1991), GEBICKI & GEBICKI (1993) e SULIVAN *et al.* (1991) explicam que níveis altos de oxigênio dissolvidos no meio devem inibir o crescimento celular pela geração de espécies reativas, assim como radicais livres e peróxidos que poderiam criar a condição de stress oxidativo. Na célula, esses agentes são responsáveis pela inibição da síntese de DNA (BALIN *et al.*, 1979) e conseqüentemente, pelas mudanças no metabolismo celular.

O consumo de oxigênio pela célula pode ser diminuído na presença de determinadas concentrações de glicose, podendo causar um efeito Crabtree (CRABTREE, 1929 e FRAME & HU, 1985), fenômeno largamente observado, quando há disponibilidade de glicose no meio fermentativo, causando uma redução na velocidade de consumo do oxigênio. Isso indica que a concentração de glicose determina o perfil do metabolismo energético da célula.

O efeito Crabtree, ainda é definido como a ocorrência da fermentação alcoólica sob condições inteiramente oxidativas. Nos estudos com *S. cerevisiae*, esse efeito foi

explicado em termos de repressão do consumo de açúcar por enzimas respiratórias e mais recentemente, como uma saturação da capacidade respiratória (SONNLEITNER & KÄPPELI, 1986, BARFORD, 1981 e RIEGER, KÄPPELI & FIECHTER, 1983).

LEYVA *et al.* (1999) avaliaram a relevância do efeito do oxigênio (efeito Pasteur) e a concentração de açúcar (efeito Crabtree) na extensão e regulação da produção fermentativa de CO<sub>2</sub> na levedura *Zygosaccharomyces bailli*. Foi observado nos cultivos em batelada, que o catabolismo de glicose foi afetado pela concentração de oxigênio. A diminuição no consumo de oxigênio refletiu diretamente no aumento da concentração de etanol no meio. Esse comportamento foi explicado pelo efeito Crabtree e pela maior capacidade das células transportarem frutose e não glicose.

#### II.4.2 Concentração de Etanol e a conversão em éster

De acordo com NORDSTRÖM (1964) *apud* KILLIAN & OUGH (1979), a síntese de ésteres depende da concentração de álcoois e ácidos fracos no meio. É muito importante conhecer a influência da concentração de etanol no meio fermentativo. As células produzem etanol e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) como um método de desintoxicação de NADH, permitindo portanto, criar ATP (adenosina trifosfato) sem oxigênio (LEYVA *et al.*, 1999).

Geralmente é encontrado que a toxicidade aparente de etanol em *Saccharomyces cerevisiae* é maior quando o etanol é produzido durante a fermentação alcoólica do que quando ele é adicionado ao meio fermentativo (NAGODAWITHANA & STEINKRAUS, 1976 *apud* PAMPULHA & LOUREIRO, 1989).

ARMSTRONG *et al.* (1984) demonstraram ao utilizar uma concentração alcoólica acima de 10g.L<sup>-1</sup>, uma inibição na taxa de conversão de etanol à acetato de etila pela levedura *Candida utilis*, ao passo que em concentrações inferiores de etanol, a taxa de conversão é proporcional a formação de acetato de etila.

### II.4.3 Fonte de carbono

O produto principal de um processo fermentativo é geralmente determinado pela escolha da fonte de carbono, especialmente se for derivado da dissimilação direta dele. A velocidade na qual a fonte de carbono é reconhecida influencia na formação de biomassa ou na produção de metabólitos primários ou secundários. O alto crescimento celular é decorrente da presença de açúcares rapidamente metabolizáveis no meio (STANBURY & WHITAKER, 1984).

YOSHIOKA & HASHIMOTO (1983) comentaram sobre a influência dos carboidratos na formação de ésteres do aroma da cerveja através da levedura *Saccharomyces uvarum*. Eles mostraram que os resultados obtidos através do estudo sobre o efeito de diferentes substratos (frutose, glicose, sacarose e maltose) e a aeração sobre a produção de ésteres de acetato influenciaram na composição da membrana celular (em relação a formação de seus ácidos graxos saturados e insaturados). Os resultados demonstraram que a levedura produziu mais acetato de etila, através do consumo de glicose do que os outros açúcares, com uma atividade enzimática maior ao comparar com outros carboidratos em meio sintético.

PEIXOTO (1996) estudando a produção de acetato de etila, obteve concentrações de  $10,1\text{g.L}^{-1}$  com *Hansenula anomala*, empregando  $100\text{g.L}^{-1}$  de sacarose. Essa produção foi simplesmente 13,8 vezes maior que  $0,73\text{g.L}^{-1}$ , encontrada por QURESHI & TAMHANE (1987). Os experimentos apresentaram fatores de conversão de substrato em etanol, substrato em acetato de etila e substrato em células de 0,174; 0,094 e  $0,034\text{g.g}^{-1}$  respectivamente. Ainda durante os ensaios, através da adição de  $12\text{g.L}^{-1}$  de etanol no meio fermentativo, *Hansenula anomala* passou a produzir  $12,1\text{g.L}^{-1}$  após 48 horas de fermentação.



#### II.4.4 Nitrogênio

Segundo WALKER (1999), as células de leveduras apresentam cerca de 10% do seu peso seco em nitrogênio e de acordo com YOSHIOKA & HASHIMOTO (1983), uma deficiência de compostos nitrogenados influencia diretamente na inibição da atividade enzimática de álcool acetiltransferase pelo aumento do acúmulo de ácidos graxos insaturados, afetando diretamente na formação de ésteres de acetato.

Ainda conforme os autores, uma redução no nível de álcoois de cadeia longa produzidos durante o processo seria uma causa adicional para um decréscimo na formação de ésteres, devido a deficiência em maltose ou nitrogênio. Isso deve ocorrer, porque os álcoois de cadeia longa produzidos durante a fermentação são importantes como substratos dos ésteres de acetato correspondentes. A enzima álcool acetiltransferase é inibida quando há diminuição da formação de ésteres pelo acúmulo de ácidos graxos insaturados na membrana celular.

#### II.4.5 Fósforo

WALKER (1999) explica que os níveis de fosfato citosólico são muito baixos em células de levedura, em torno de 0,2% do seu peso seco. No entanto, esses níveis flutuam dependendo do modo de catabolismo do açúcar adotado pela levedura.

De acordo com COGAN (1995), a adição de fósforo no meio fermentativo com *Lactococcus* pode aumentar a produção de ésteres quando baixas concentrações de glicose estão presentes no meio. Este trabalho foi um estudo realizado sobre a via metabólica da produção de ésteres pelas bactérias lácticas da indústria alimentícia.

## II.4.6 pH

De acordo com CIMPRICH *et al.* (1995) *apud* WALKER (1999), a produção de etanol parece ser especialmente sensível a alterações do pH do meio.

TABACKNICK & JOSLYN (1953) *apud* ARMSTRONG *et al.* (1984) demonstraram que o efeito do pH é um ponto crítico na produção de acetato de etila por *Hansenula anomala*. NORDSTRÖM (1964) *apud* ARMSTRONG *et al.* (1984) aponta o pH ótimo em torno de 2,4 e 3,0. Eles comentam que valores superiores hidrolizariam os ésteres formados pela enzima esterase.

ARMSTRONG *et al.* (1984) estudaram o efeito de pHs iniciais 2,5; 4,5 e 7,0 na produção de acetato de etila a partir de etanol com a levedura *Candida utilis*. De acordo com os resultados obtidos, o dobro de acetato foi produzido a pH 7,0 (aproximadamente 1,5 e 2,9g.L<sup>-1</sup>) quando comparado com 2,5. Ensaios posteriores foram realizados com ajustes entre 5,0 e 7,5. Conversão e rendimentos eficientes foram obtidos quando o pH foi mantido entre 5,0 e 7,0.

Segundo WIJAYA (1995), nos estudos relacionados ao crescimento da levedura *Hansenula anomala* no meio com água de coco como substrato, o pH do substrato afeta a produção de alguns ésteres como o acetato de etila.

MORITZ *et al.* (2000), em seus estudos realizados com *Hansenula anomala* em frascos agitados, trabalhou com concentrações iniciais de glicose de 15 e 20g.L<sup>-1</sup>, para estudar o efeito do pH (3,0; 4,5 e 5,5) no crescimento da levedura no meio YM. Os resultados obtidos demonstraram que o pH inicial mais adequado para o crescimento celular, nas duas concentrações de glicose foi de 5,5.

### II.4.7 Temperatura

A natureza dos ésteres formados durante a fermentação é dependente da temperatura do meio de fermentação.

Durante uma fermentação contínua, MARIC *et al* (1979) empregando culturas mistas, alterando a temperatura e a concentração de oxigênio dissolvido no meio, encontraram os valores da Tabela II.2.

**TABELA II 2:** Efeito da temperatura e da concentração de oxigênio dissolvido (Reprodução dos resultados de MARIC *et al.* (1979).

| D<br>(h <sup>-1</sup> ) | Temperatura<br>(°C) | Oxigênio <sup>1</sup><br>(mg.L <sup>-1</sup> ) | Célula Total<br>(g.L <sup>-1</sup> ) | Razão <sup>2</sup> | Acetato de Etila<br>(mg.L <sup>-1</sup> ) |
|-------------------------|---------------------|--|--------------------------------------|--------------------|---|
| 0,030                   | 20                  | 2,0  | 7,0                                  | 60/40              | 110                                       |
| 0,030                   | 20                  | 6,0  | 9,0                                  | 60/40              | 60  |
| 0,015                   | 15                  | 6,0  | 8,2                                  | 60/40              | 160                                       |

<sup>1</sup>Oxigênio dissolvido;

<sup>2</sup>Razão entre as espécies *Saccharomyces bayanus* e *Saccharomyces cerevisiae*

Analisando os resultados, os autores concluíram que a medida que eleva-se a concentração do nutriente limitante (oxigênio dissolvido no meio de fermentação), há um aumento da taxa de crescimento da levedura e uma diminuição da concentração de acetato de etila. Entretanto, ao diminuir a temperatura do meio de cultivo, provocou-se um aumento na concentração de oxigênio dissolvido no meio, mas não a redução da formação do éster, embora os autores tenham trabalhado com taxas de diluições diferentes, fator este que pode influenciar na análise dos resultados.

### III. MATERIAL E MÉTODOS

#### III.1 MICRORGANISMO

*Hansenula anomala* CCT 2648 (DSM 70255) também conhecida como *Pichia anomala* foi a levedura utilizada em todos os ensaios fermentativos. Esta cepa foi obtida da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello” e foi conservada em meio YMA (Yeast, Malt, Extract Agar) a 4°C. Os repiques para a manutenção da cepa eram realizados a cada dois meses.

#### III.2 MEIOS DE CULTURA

##### III.2.1 Meio de Manutenção

O meio para a manutenção da cultura de células de *Hansenula anomala* (YMA) tem a seguinte composição:

|                                   |                        |
|-----------------------------------|------------------------|
| Extrato de levedura (YE) BIOBRÁS: | 3,0 g.L <sup>-1</sup>  |
| Extrato de malte (YM) BIOBRÁS:    | 3,0 g.L <sup>-1</sup>  |
| Peptona bacteriológica DIFCO:     | 5,0 g.L <sup>-1</sup>  |
| D-Glicose anidra SINTHY:          | 10,0g.L <sup>-1</sup>  |
| Ágar DIFCO:                       | 20,0 g.L <sup>-1</sup> |

### III.4.5 Meios de Cultivo

Os meios de cultivo (YM–Yeast, Malt Extract) foram os mesmos, tanto para o inóculo quanto para o meio de fermentação. A composição do meio encontra-se descrita logo abaixo.

Alguns ensaios realizados nesse trabalho foram destinados para o estudo de diferentes concentrações de glicose no meio fermentativo. Potanto, os meios de cultivo diferenciavam-se somente quanto a concentração de glicose disponível ao microrganismo.

|                                   |                                      |
|-----------------------------------|--------------------------------------|
| Extrato de levedura (YE) BIOBRÁS: | 3,0 g.L <sup>-1</sup>                |
| Extrato de malte (YM) BIOBRÁS:    | 3,0 g.L <sup>-1</sup>                |
| Peptona bacteriológica DIFCO:     | 5,0 g.L <sup>-1</sup>                |
| D-Glicose anidra SINTHY:          | 40,0; 75,0 e 100,0 g.L <sup>-1</sup> |

O pH dos meios de cultivo e de manutenção foram corrigidos a 5,5 com adição de ácido cítrico 2,0% e depois esterilizados a uma temperatura de 121°C num período de 15 minutos. O valor do pH foi definido a partir dos resultados obtidos por MORITZ (1998).

### III.3 PREPARO DOS INÓCULOS

Todos os frascos erlenmeyer e tubos de ensaio contendo meios de manutenção ou de cultivo eram fechados com tampões de algodão, protegidos com papel alumínio e esterilizados.

Após o processo de esterilização, os tubos de ensaio contendo aproximadamente 5mL do meio de manutenção foram inclinados num ângulo de aproximadamente 30°, até seu resfriamento.

Posteriormente a levedura *Hansenula anomala* era repicada e incubada estaticamente durante 48 horas numa estufa de cultura (ORION-502), a uma temperatura de 30°C. Após este período de crescimento, a levedura era mantida no refrigerador durante dois meses a 4°C (cultura estoque). A partir desta cultura, os meios de cultivo eram inoculados com três alçadas e submetidos a uma frequência de agitação de 150min<sup>-1</sup> (frascos agitados ETICA). O tempo de cultivo dependia da concentração de glicose e da temperatura empregada em cada experimento. As temperaturas estudadas foram de 20 e 30°C. Iniciava-se a fermentação quando o meio apresentava uma concentração de inóculo de aproximadamente 5g.L<sup>-1</sup>, momento que a levedura encontrava-se na fase exponencial de crescimento. Esse processo era necessário para adaptação da levedura às variáveis concentração de glicose e temperatura no meio de cultivo. A determinação da concentração celular foi realizada pelo método descrito no Ítem III.6.2.

Para iniciar os ensaios de fermentação foi adicionada uma fração de 10% de inóculo no meio de cultura dos frascos agitados ou reator. Este valor foi escolhido para que não alterasse significativamente a concentração dos nutrientes do meio fermentativo.

#### **III.4 ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO**

Os ensaios fermentativos foram realizados em frascos agitados e em biorreator.

Em frascos agitados foram feitos ensaios referentes ao estudo da influência da temperatura e da concentração inicial de glicose no meio YM na produção dos metabólitos acetato de etila e etanol, bem como experimentos para observar a influência de nitrogênio e fósforo na produção destes metabólitos através da adição de uréia e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Outros ensaios foram feitos para avaliar a influência da disponibilidade

de oxigênio (erlenmeyer de 300, 1000 e 2000mL) no crescimento celular e na produção do éster e do álcool. Todos os experimentos foram realizados em duplicata com exceção do teste para avaliar a disponibilidade de oxigênio no frasco erlenmeyer de 2000mL.

Nos testes em reator foram aplicadas diferentes vazões de ar para estudar a aeração na produção de acetato de etila e etanol.

### **III.5 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS**

Nos ensaios em frascos agitados foram utilizados erlenmeyers de volumes de 300, 1000 e 2000mL, os quais continham 125, 400 e 600mL respectivamente de meio YM. Frascos de 1000mL foram utilizados para os estudos de glicose, temperatura e adição de sais, enquanto nos frascos de 300, 1000 e 2000mL, estudou-se a disponibilidade de oxigênio no meio de cultivo. Em todos os experimentos, a frequência de agitação era mantida a  $150 \text{ min}^{-1}$ , sendo que as temperaturas foram ajustadas a 20 ou  $30^{\circ}\text{C}$ , de acordo com o ensaio.

O biorreator (Figura III.1) utilizado para a avaliação da aeração no meio de fermentação, é um dispositivo de volume total de 6,0 L e volume útil de 4,0 L. Este equipamento foi montado no próprio laboratório, com agitação magnética externa (VELP SCIENTIFICA, Are 2) e controle de temperatura através da circulação de líquido refrigerante (solução de água e álcool) proveniente de um banho termostatizado (MICROQUÍMICA – Florianópolis – SC).

As amostras (aproximadamente 5mL) eram coletadas numa periodicidade de três horas com o auxílio de uma bomba a vácuo (Dia Pump, modelo C – FANEM LTDA). Antes de coletá-las para análises afins, retirava-se uma alíquota que permanecia na mangueira e descartava-se. Análises posteriores eram realizadas: de pH através de um medidor de pH (DIGIMED, DMPH-2), de biomassa, glicose e de acetato de etila e etanol, que serão descritas posteriormente.

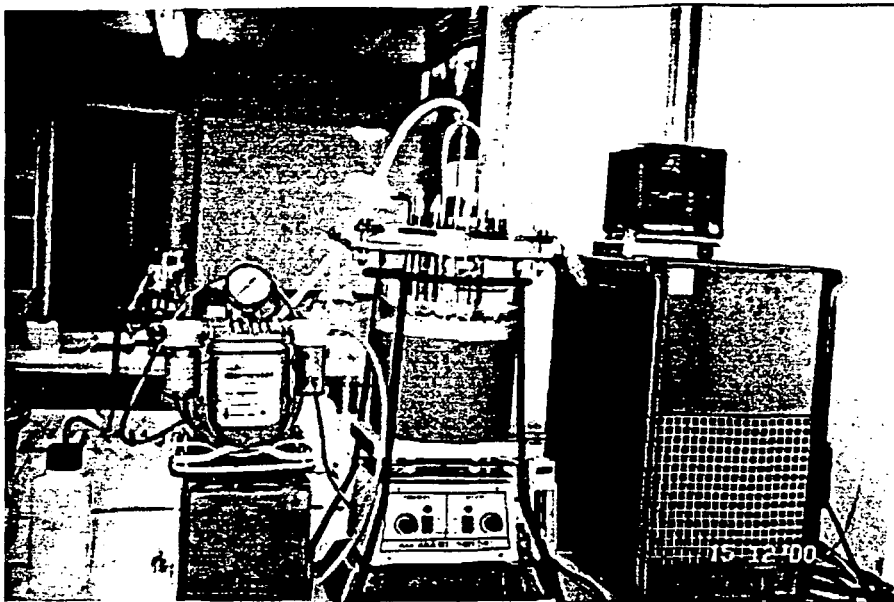


FIGURA III 1: Biorreator, montado pelo próprio laboratório.

### III.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

#### III.6.1 Amostragem em frascos agitados e em reator

Durante os ensaios de fermentação, amostras eram coletadas periodicamente a fim de avaliar a cinética de crescimento da levedura, do consumo de glicose e a produção dos metabólitos etanol e acetato de etila.

Nos experimentos em frascos agitados, as amostras eram retiradas com auxílio de pipetas estéreis. No reator, uma bomba a vácuo foi utilizada, o ponto de amostragem, localizava-se próximo à parte central do reator.

Durante os ensaios em frascos agitados ou em reator, a coleta de amostras era planejada para que o volume total de amostras coletadas não ultrapassasse 10% do volume total do meio.

Após cada coleta, as amostras eram convenientemente preparadas (isto é, de acordo com a concentração celular presente naquele momento do processo no meio



fermentativo) e diluídas para a medida da absorbância de suspensões celulares. Em alguns ensaios, também foram efetuadas medidas de pH. O volume remanescente (não diluído) era centrifugado (centrífuga modelo SIGMA 5K12, B. BRAUN BIOTECH) a  $15000\text{min}^{-1}$  ( $12879\times g$ ) por 10 minutos, sendo que o sobrenadante era separado e congelado em tubos de ensaio para análises posteriores de glicose, acetato de etila e etanol.

No final do processo, também eram retiradas amostras para medida da concentração celular, via absorbância de suspensões celulares e via peso de matéria seca, método descrito abaixo.

### III.6.2 Concentração celular

A concentração celular nos ensaios de fermentação era determinada de duas formas: indiretamente pela medida da absorbância de suspensões celulares e diretamente por peso de matéria seca (gravimetria).

A determinação gravimétrica da concentração celular, expressa em massa de matéria seca por unidade de volume (uma das formas de se caracterizar crescimento), foi utilizada para traçar curvas de calibração.

As medidas de absorbância foram realizadas num comprimento de onda de 550 nm, no espectrofotômetro (modelo E225-D, CELM) e convertidas em concentração celular, massa de matéria seca por unidade de volume, através da curva de calibração.

Procedimentos para a construção da curva padrão:

- Foram coletadas duas alíquotas homogêneas (duplicatas) de 25mL do meio de cultivo de *Hansenula anomala* no final do processo fermentativo e filtradas em membrana Millipore,  $0,8\mu\text{m}$ , previamente seca em estufa a  $105^\circ\text{C}$  durante 24 horas até peso constante. O procedimento de secagem da amostra (membrana mais células) segue as mesmas condições de operação da secagem da membrana;

- A diferença dos pesos entre a membrana e a amostra, fornece a massa celular (gramas). Esse valor dividido pelo volume de meio filtrado em litros, é uma representação da concentração celular obtida durante a fermentação ( $\text{g.L}^{-1}$ );
- Em paralelo foi retirada uma alíquota de aproximadamente 10mL, a fim de medir as absorbâncias das suspensões celulares em diferentes diluições, 1:20, 1:25; 1:30, 1:35, 1:40 e 1:50, com a finalidade de encontrar uma relação entre estes valores e as respectivas concentrações celulares.
- Considerou-se para o cálculo da concentração celular, a diluição utilizada em cada leitura, mantendo a absorbância sempre no limite de linearidade;
- Através da correlação das leituras de absorbância e concentração celular, obteve-se uma curva padrão linear. Durante os ensaios, as regressões lineares apresentaram equações matemáticas com coeficientes de correlação ( $r$ ) em torno de 0,999 para *Hansenula anomala*. O Anexo 1 mostra a curva de calibração para a levedura *Hansenula anomala* CCT2648.

### III.6.3 Dosagem de glicose

A concentração de glicose foi determinada pelo método enzimático colorimétrico glicose oxidase, utilizando o kit Enz Color (Biodiagnóstica Indústria Química Clínica Ltda.). A descrição do método encontra-se no Anexo 2.

### III.6.4 Determinação da concentração de acetato de etila e etanol

Os compostos voláteis obtidos durante o processo, acetato de etila e etanol foram dosados por cromatografia em fase gasosa, através do cromatógrafo CG-90. A coluna capilar era de sílica fundida ( $\text{Ø}0,53 \times 30\text{m}$ ), modelo Supercowax-10. O equipamento era constituído de um detector de ionização de chama (DIC-ar-hidrogênio), a injeção era manual, com o auxílio de uma seringa de 5 $\mu\text{L}$  (HAMILTON

COMPANY) e a integração das áreas resultantes das análises cromatográficas foram realizadas por um microcomputador. A integração e os cromatogramas foram obtidos através de uma placa de interface AD/DA-MICROQUÍMICA.

As amostras depois de descongeladas eram mantidas bem refrigeradas, para evitar perda dos compostos voláteis

### Condições de operação

- Gás de arraste: nitrogênio, aproximadamente  $5,5\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ;
- Gases do detector de ionização de chama: aproximadamente  $310$  e  $75\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , para o ar e hidrogênio respectivamente;
- Temperatura do injetor:  $160^{\circ}\text{C}$ ;
- Temperatura da coluna:  $77,5^{\circ}\text{C}$ ;
- Temperatura do detector:  $180^{\circ}\text{C}$ ;
- Volume de amostra:  $1,0\mu\text{L}$ .

O cromatograma típico das análises de acetato de etila e etanol está disposto no Anexo 3.

Curvas de calibração foram construídas para os compostos etanol e acetato de etila através dos resultados obtidos das injeções de  $1,0\mu\text{L}$  de amostras com concentrações conhecidas (padrões) na coluna capilar do cromatógrafo. Verificaram-se linearidades de 0 a 50 g/L para o acetato de etila e 0 a 200 g/L para o etanol (Anexos 4 e 5 respectivamente).

### III.7 TRATAMENTO DE DADOS

#### III.7.1 Fatores de conversão

Os fatores de conversão nos ensaios de fermentação foram calculados da seguinte forma:

- Conversão de glicose (S) em acetato de etila (P) ou em etanol (P),  $Y_{P/S}$  ( $\text{g}_p \cdot \text{g}_s^{-1}$  – grama de produto obtido/grama de substrato consumido):

$$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f} \quad (5)$$

- Conversão de glicose (S) em células (X),  $Y_{X/S}$  ( $\text{g}_x \cdot \text{g}_s^{-1}$  – grama de células obtidas/grama de substrato consumido):

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} \quad (6)$$

Onde:

- $P_0$  e  $P_f$  = concentração inicial e final de produto (acetato de etila e etanol),  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ;
- $S_0$  e  $S_f$  = concentração inicial e final de substrato (glicose),  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ .
- $X_0$  e  $X_f$  = concentração inicial e final de células,  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ .

### III.7.2 Produtividades

As produtividades em acetato de etila,  $P_{act}$  ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) nos ensaios de fermentação foram calculadas da seguinte forma:

$$P_{Act} = \frac{P_f - P_0}{t} \quad (7)$$

Onde:

t = tempo de fermentação (h) quando o substrato é igual a zero.

### III.7.3 Velocidade específica máxima de crescimento

A partir dos perfis das curvas de concentração celular com o tempo foi possível determinar em cada instante, as velocidades instantâneas de crescimento microbiano ( $dX/dt$ ).

As velocidades específicas máximas de crescimento ( $\mu_{m\acute{a}x.}$ ) foram determinadas pelo coeficiente angular da reta obtida, correlacionando o logaritmo neperiano da concentração celular com o tempo.

$$\ln X = \ln X_0 + \mu_{m\acute{a}x.}t \quad (8)$$

## IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo apresenta estudos com a levedura *Hansenula anomala* realizados em frascos agitados e em reator. Em ambos os casos foram estudados a cinética de crescimento e a produção dos metabólitos secundários, acetato de etila e etanol. Primeiramente realizou-se em frascos agitados o estudo da influência das variáveis concentração inicial de glicose, temperatura, disponibilidade de oxigênio e suplementação dos elementos fósforo e nitrogênio sobre a produção de acetato de etila. A seguir testou-se em fermentador, diferentes vazões.

### IV.1 ENSAIOS EM FRASCOS AGITADOS "SHAKER"

#### IV.1.1 Concentração inicial de glicose e temperatura

Foram realizados testes em frascos agitados para avaliar a influência da concentração inicial de glicose (40, 75 e 100g.L<sup>-1</sup>) e da temperatura (20 e 30°C) na produção de acetato de etila durante o processo fermentativo com a levedura *Hansenula anomala*.

As Figuras IV.1 e IV.2 apresentam a cinética de crescimento da levedura nas temperaturas de 20 e 30°C respectivamente, a uma concentração inicial de 40g.L<sup>-1</sup> de glicose.

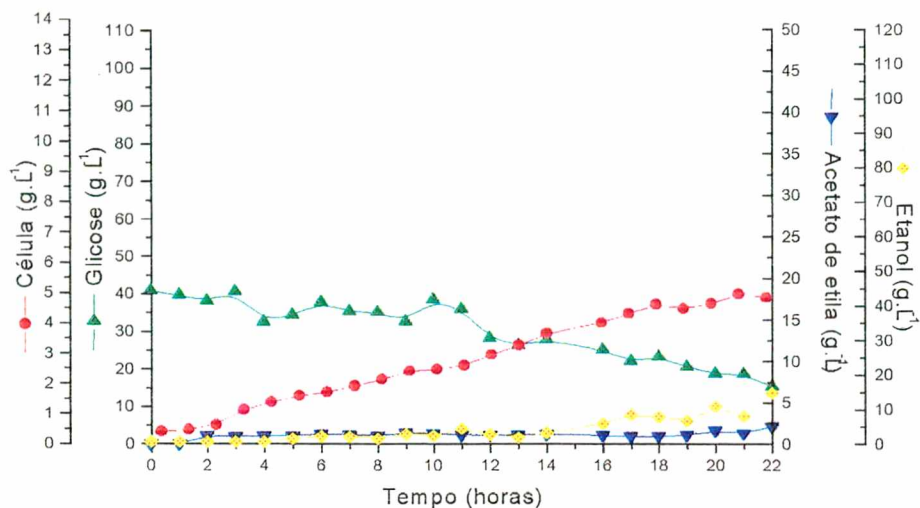


FIGURA IV 1: Cinética de crescimento e produção de acetato de etila e etanol da levedura *Hansenula anomala* em meio YM com concentração inicial de glicose de 40g.L<sup>-1</sup> à temperatura de 20°C.

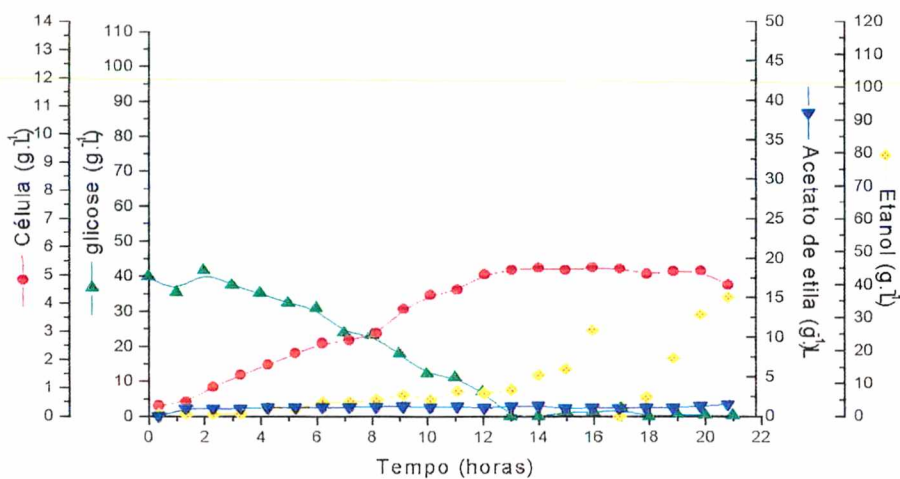


FIGURA IV 2: Cinética de crescimento e produção de acetato de etila e etanol da levedura *Hansenula anomala* em meio YM com concentração inicial de glicose de 40g.L<sup>-1</sup> à temperatura de 30°C.

As curvas de crescimento obtidas a 20 e 30°C apresentam em comum uma curta fase de transição e exponencial seguida por uma fase que se aproxima da linearidade, significando que nesta fase o processo sofreu algum tipo de limitação ou inibição.

Outra característica relacionada às duas cinéticas de crescimento é a breve produção de acetato de etila no início do cultivo. A produção cessa-se e a concentração deste permanece constante em torno de  $1,0\text{g.L}^{-1}$ , independente da temperatura. No final do processo observa-se uma tendência à produção de acetato de etila, como também de etanol.

A Figura IV.2 mostra que a temperatura de 30°C não é adequada para a produção de acetato de etila, mas é ideal para a produção de etanol. Embora a glicose tenha sido totalmente consumida em aproximadamente 13 horas de cultivo, foi verificado um acúmulo desprezível do aroma após 8 horas do esgotamento do substrato.

Para a temperatura de 20°C observa-se que a velocidade de consumo de substrato é menor que a de 30°C, uma vez que após 22 horas de cultivo ainda havia  $15\text{g.L}^{-1}$  de glicose no meio fermentativo. A partir de 18 horas de fermentação observa-se na Figura IV.1, que a produção efetiva do éster se inicia um pouco depois da produção efetiva de etanol.

Apesar da fermentação ter sido interrompida em 22 horas, Figura IV.1, parece haver uma tendência ao acúmulo do acetato de etila e etanol, uma vez que há glicose no meio e a velocidade de crescimento celular é muito baixa.

A temperatura de 30°C favorece o crescimento rápido das células e o consumo do substrato, enquanto a temperatura de 20°C favorece a conversão de substrato em células, uma vez que a concentração final de células é praticamente a mesma (aproximadamente  $5,0\text{g.L}^{-1}$ ) e o consumo de substrato a 20°C é menor.

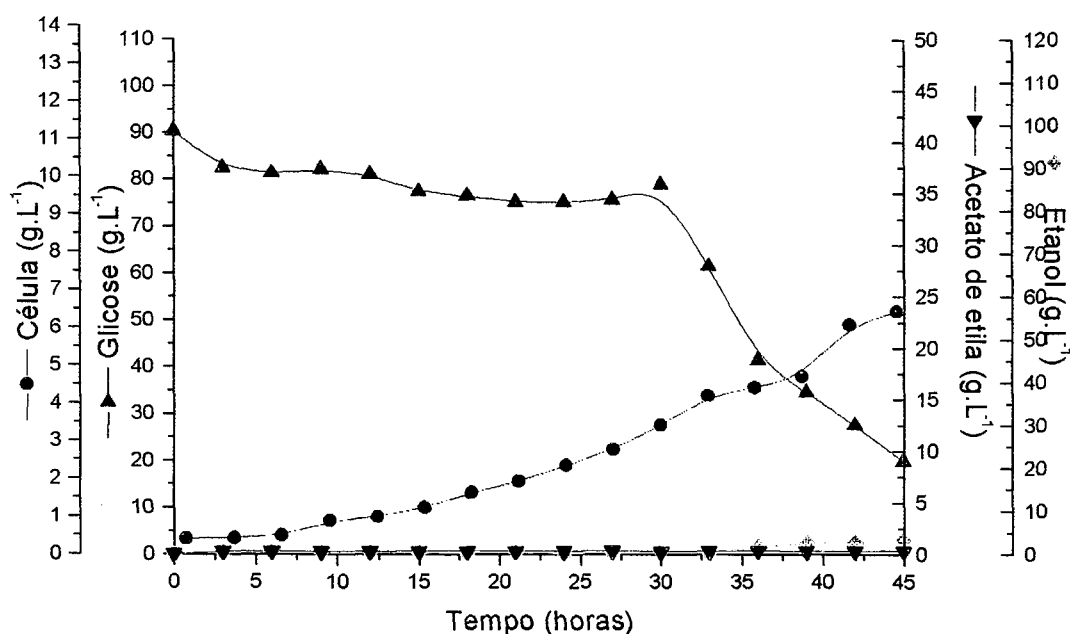
Na Figura IV.1 observa-se que o consumo de substrato se dá em dois estágios com velocidades diferentes. O acúmulo efetivo de etanol no meio de cultivo inicia-se, aparentemente, duas horas após o aumento da velocidade de consumo da glicose.

Observou-se que o acetato de etila se acumulou no meio logo após o acúmulo de etanol, indicando uma ligação no metabolismo desses dois compostos. YOSHIOKA & HASHIMOTO (1983) verificaram nos seus estudos um comportamento semelhante

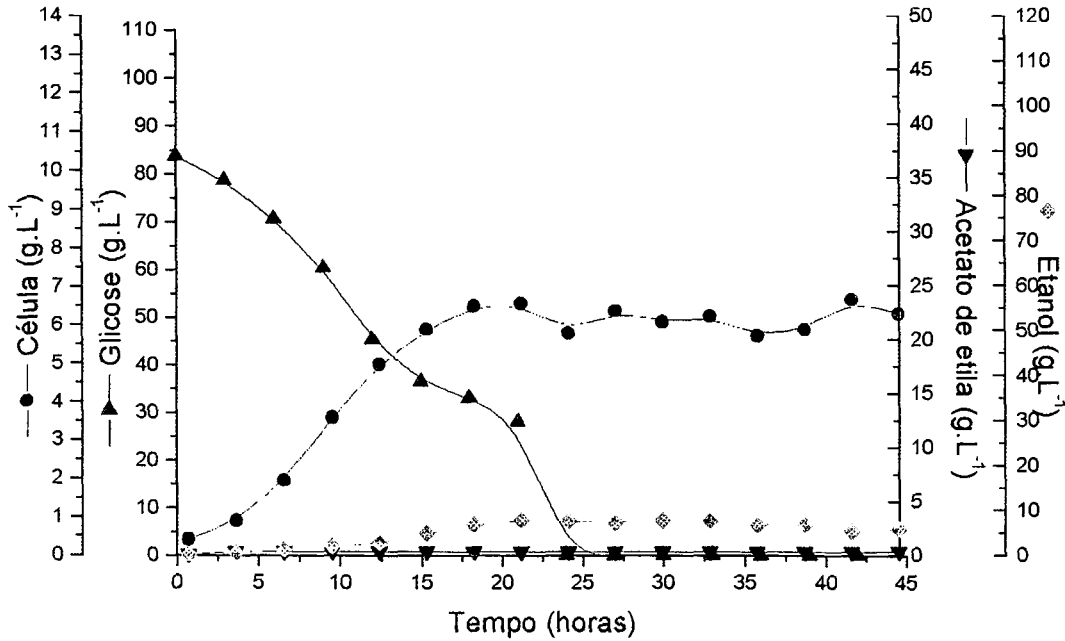


aos obtidos nestes experimentos, com álcool isoamílico e acetato isoamílico. Eles explicam que o álcool foi rapidamente formado a partir do início da fermentação enquanto a formação do éster de acetato iniciou-se dois dias após a inoculação do meio. Os autores explicam que esse comportamento também foi verificado para o acetato de etila. Foi observado também nos dois casos uma oscilação na concentração de etanol, especialmente para altas concentrações de etanol.

As Figuras IV.3 e IV.4 apresentam a cinética de crescimento e produção dos metabólitos acetato de etila e etanol para os ensaios com concentração inicial de glicose de  $75\text{g.L}^{-1}$  nas temperaturas de 20 e  $30^\circ\text{C}$  respectivamente.



**FIGURA IV 3:** Cinética de crescimento e produção de acetato de etila e etanol da levedura *Hansenula anomala* em meio YM com concentração inicial de glicose de  $75\text{g.L}^{-1}$  à temperatura de  $20^\circ\text{C}$ .



**FIGURA IV 4:** Cinética de crescimento e produção de acetato de etila e etanol da levedura *Hansenula anomala* em meio YM com concentração inicial de glicose de 75g.L<sup>-1</sup> à temperatura de 30°C.

O comportamento cinético das culturas a 75g.L<sup>-1</sup> de concentração inicial de glicose foi bastante semelhante ao apresentado nos ensaios com 40g.L<sup>-1</sup> de glicose.

A velocidade de crescimento e consumo de substrato foram maiores a 30°C, sendo que praticamente não houve produção de acetato de etila e etanol nessa temperatura. O substrato é também totalmente consumido.

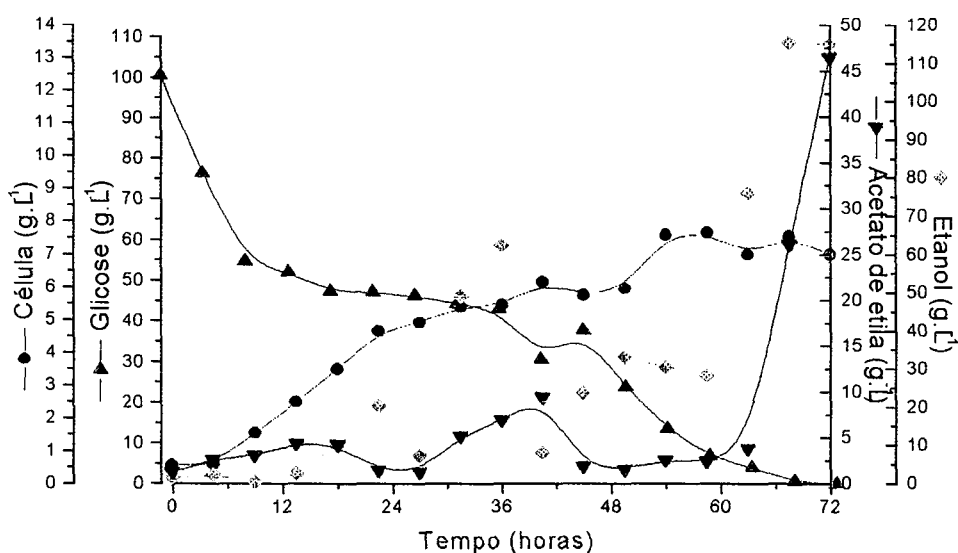
Para a temperatura de 20°C, Figura IV.3, nota-se uma dificuldade maior em consumir o substrato e velocidades de crescimento menores que a 30°C. A mudança na velocidade de consumo de substrato, identificada na Figura IV.1, é mais clara na Figura IV.4.

Ainda para a temperatura de 20°C (Figura IV.3), no final do experimento inicia-se o acúmulo de etanol e, apesar de não estar claro, o acúmulo de acetato de etila deve aumentar.

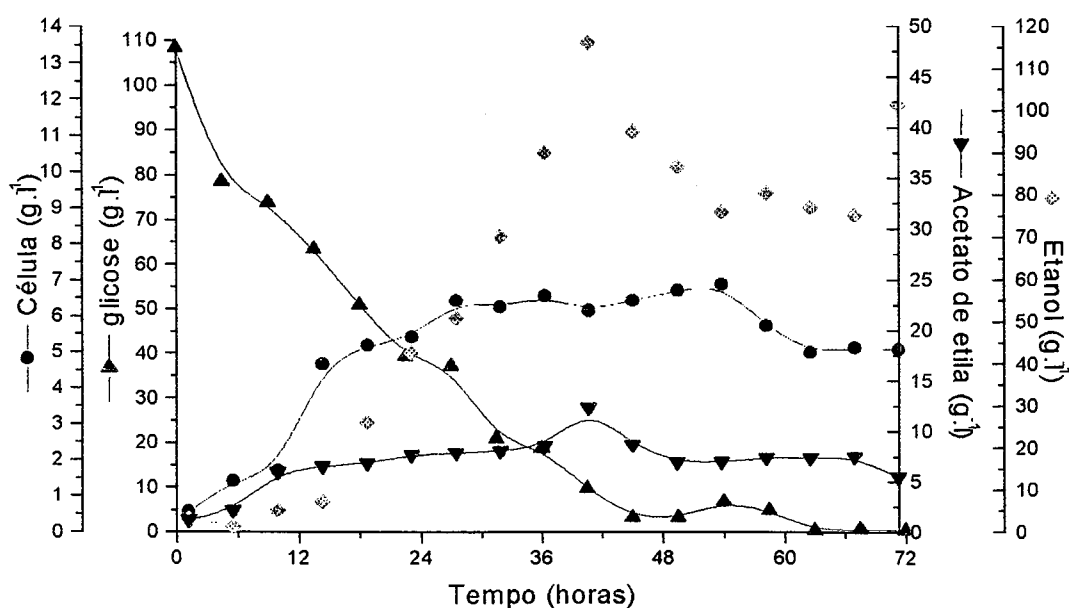
A adição de 75g.L<sup>-1</sup> de glicose no meio fermentativo não apresentou um efeito positivo na produção de acetato de etila. Em termos de produção do aroma, uma concentração inicial de 40g.L<sup>-1</sup> foi mais eficiente que um nível de 75g.L<sup>-1</sup>, pois foi produzido maior quantidade com o início da produção em tempo menor.

O início da produção efetiva de álcool e acetato não parece estar ligado à concentração de glicose no meio, pois a 20°C (Figuras IV.1 e IV.3) o início da produção efetiva de etanol e aumento da velocidade de consumo de substrato se dá em concentrações de glicose diferentes, aproximadamente 28 e 75g.L<sup>-1</sup>, respectivamente para os ensaios representados pelas Figuras IV.1 e IV.3. Porém, a mudança de comportamento da levedura se dá para praticamente a mesma concentração de células (aproximadamente 3g.L<sup>-1</sup>), indicando a falta de algum nutriente que pode ser o oxigênio.

As Figuras IV.5 e IV.6 apresentam as cinéticas de crescimento obtidas com os ensaios realizados nas temperaturas de 20 e 30°C a 100g.L<sup>-1</sup> de glicose.



**FIGURA IV 5:** Cinética de crescimento e produção de acetato de etila e etanol da levedura *Hansenula anomala* em meio YM com concentração inicial de glicose de 100g.L<sup>-1</sup> à temperatura de 20°C.



**FIGURA IV 6:** Cinética de crescimento e produção de acetato de etila e etanol da levedura *Hansenula anomala* em meio YM com concentração inicial de glicose de 100g.L<sup>-1</sup> à temperatura de 30°C.

Analisando-se estas figuras, nota-se que para a concentração inicial de glicose elevada (100g.L<sup>-1</sup>), o metabolismo da levedura apresenta mudanças com relação as concentrações menores. Nesse caso, há o acúmulo de etanol e acetato desde o início da fermentação. Observa-se que a concentração de substrato contribui para formação do éster, no entanto verifica-se que a temperatura é o fator chave que mais influencia no seu acúmulo.

As curvas de crescimento celular não alteraram o seu comportamento, apesar da alta concentração de açúcar no meio. O autor LANCIOTTI *et al.* (1998) classificou a levedura *Hansenula anomala* como uma espécie osmotolerante e capaz de produzir grandes concentrações de acetato de etila. Talvez esse atributo de suportar elevadas concentrações de açúcar cause a produção de altos níveis de acetato de etila e o comportamento similar das curvas de crescimento em todos os ensaios.

O comportamento cinético da concentração de etanol e acetato de etila é oscilatório. A Figura IV.5 apresenta um rápido acúmulo de etanol a partir de 12 horas de fermentação e uma produção de acetato de etila a partir de 24 horas com contínua formação destes metabólitos num estágio posterior do processo. Justifica-se este comportamento com a hipótese de que o éster formado nos dois períodos da fermentação seja produto da oxidação do etanol. Observa-se no primeiro e segundo caso, que concomitantemente à produção de etanol, há a transformação em acetato de etila. Imagina-se que esse processo ocorra somente quando uma determinada concentração de oxigênio é fornecida ao meio de cultivo (momento da amostragem).

Diante desse comportamento, supõe-se que a concentração de acetato de etila é determinada pela concentração de etanol no meio fermentativo, combinado com o momento correto no fornecimento do oxigênio. A quantidade desse nutriente também determinará o produto final formado.

Esse processo de transformação de etanol em acetato de etila é limitado pela concentração de oxigênio presente no meio e pode ser compreendido melhor ao analisar a via metabólica apresentada por VOET & VOET (1990), Figura II.2. De acordo com essa via, etanol é formado quando o processo se encontra em anaerobiose. Entretanto, as reações são reversíveis e são controladas pela concentração de oxigênio dissolvido no meio. Dependendo da concentração desse nutriente, o etanol será oxidado em acetaldeído e consecutivamente em acetato de etila. No entanto, se concentrações maiores de oxigênio estiverem presentes, ocorrerá a formação de acetil-CoA.

Conforme mostra a via metabólica, etanol é produzido somente em anaerobiose, condição não oferecida nos ensaios realizados. Conforme descrito no Capítulo III, os ensaios foram feitos em frascos erlenmeyers tampados com rolhas de algodão para permitir o equilíbrio dos gases entre o ambiente interno e externo, e agitação a  $150\text{min}^{-1}$ . Porém, o dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) formado em grande quantidade durante a fermentação proporciona um ambiente anaeróbio ou microaerófilo.

O experimento representado na Figura IV.5 mostra que foi obtida uma concentração final de  $46,5\text{g.L}^{-1}$  de acetato de etila, utilizando-se uma concentração inicial de glicose de  $100\text{g.L}^{-1}$  em meio YM e uma temperatura de  $20^\circ\text{C}$ . PEIXOTO

(1996) estudou a produção de acetato de etila por uma linhagem de *Hansenula anomala*, na qual foi verificada uma produção de  $12,5\text{g.L}^{-1}$  de acetato de etila através do emprego de  $100\text{g.L}^{-1}$  de sacarose.

É comum para todos os ensaios a presença de etanol no meio. Alguns autores citam esse processo de produção de aromas a partir de etanol como um mecanismo de desintoxicação da célula (LATRASSE & DAMERON, 1988 e SHARPF *et al.*, 1986). Supõe-se que quando acetato de etila foi produzido, o meio estava desfavorável ao crescimento celular, ou seja, as concentrações de etanol produzidas no ensaio estavam se tornando tóxicas à levedura.

Todas as figuras apresentam no início do processo, uma pequena produção de acetato de etila. De acordo com YOSHIOKA & HASHIMOTO (1983) esse comportamento é função da alta concentração de etanol e da enzima álcool acetiltransferase presente no inóculo que foi transferido ao meio fermentativo. Segundo os autores, essa enzima é responsável pela catálise dos álcoois presentes no meio aos seus respectivos ésteres de acetato. Portanto, a transferência do inóculo ao meio fermentativo provocou a formação inicial de acetato de etila pelo fato dele conter em sua composição determinada quantidade de etanol e da enzima. Tão logo ocorreu o desaparecimento inicial de etanol, cessou-se a atividade enzimática de álcool acetiltransferase e a formação de acetato de etila.

#### IV.1.1.1 Parâmetros cinéticos para os ensaios de glicose e temperatura

Os valores do parâmetro cinético ( $\mu_{\text{máx.}}$ ) e estequiométrico ( $Y_{X/S}$ ) do cultivo de *Hansenula anomala* para as três concentrações iniciais de substrato nas temperaturas de 20 e 30°C estão apresentados na Tabela IV.1.

A velocidade específica máxima de crescimento foi calculada para a curta fase exponencial de crescimento apresentada nos ensaios, utilizando portanto, poucos pontos experimentais.

O fator de conversão de substrato em células variou durante o processo, por isso os resultados apresentados são valores médios. Como foi observado durante a

discussão dos resultados, a variação destes valores é dada pelos dois tipos de metabolismos utilizados pela célula durante o processo fermentativo e também pela formação de acetato de etila e etanol.

**TABELA IV 1:** Velocidade de crescimento específica na fase exponencial ( $\mu_{\text{máx.}}$ ) e fator de conversão de glicose em células ( $Y_{X/S}$ ) dos ensaios realizados a 20 e 30°C, e concentrações iniciais de glicose de 40, 75 e 100g.L<sup>-1</sup> com a levedura *Hansenula anomala*

| <b>Glicose</b><br>(g.L <sup>-1</sup> ) | <b>20°C</b>                               |   | <b>30°C</b>                               |   |
|--|---|---|---|---|
|  | $\mu_{\text{máx.}}$<br>(h <sup>-1</sup> ) | $Y_{X/S}$ <sup>1</sup><br>g.g <sup>-1</sup> | $\mu_{\text{máx.}}$<br>(h <sup>-1</sup> ) | $Y_{X/S}$ <sup>1</sup><br>g.g <sup>-1</sup> |
| 40                                     | 0,45                                      | 0,19  | 0,53                                      | 0,11  |
| 75                                     | 0,12                                      | 0,07  | 0,25                                      | 0,12  |
| 100                                    | 0,16                                      | 0,12  | 0,15                                      | 0,23  |

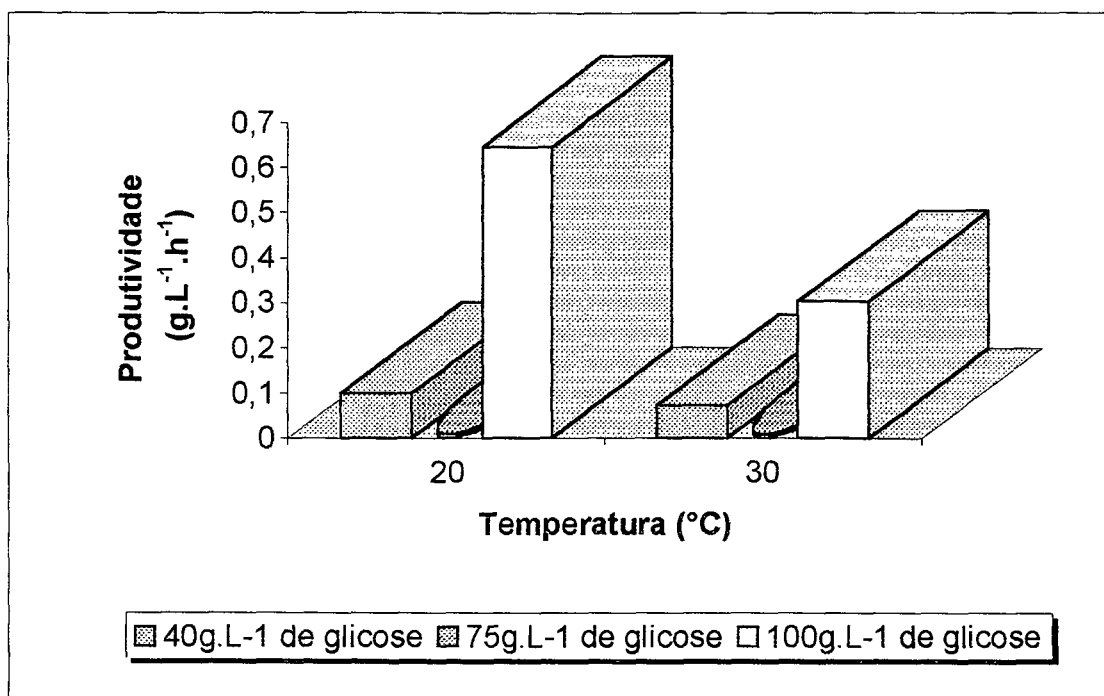
<sup>1</sup>Fator de conversão de substrato em células médio

Observando as velocidades específicas da fase exponencial de crescimento nas temperaturas de 20 e 30°C, percebe-se que o crescimento celular na fase exponencial é menor à temperatura de 20°C quando as concentrações iniciais de glicose são de 40 e 75g.L<sup>-1</sup>. No entanto, com 100g.L<sup>-1</sup> de glicose as velocidades são semelhantes para as duas temperaturas. Apesar do meio apresentar uma quantidade de oxigênio dissolvido maior quando a temperatura de 20°C é usada, este fator torna-se irrelevante quando comparado à temperatura do meio para o crescimento na fase exponencial.

Nota-se que nas temperaturas de 20 e 30°C, os ensaios realizados a 40g.L<sup>-1</sup> apresentaram velocidades específicas máximas de crescimento superiores aos ensaios com 75 e 100g.L<sup>-1</sup> de glicose inicial. Esta diferença entre as velocidades específicas máximas de crescimento indica uma mudança de metabolismo, quando são empregadas concentrações iniciais de 75 e 100g.L<sup>-1</sup> de glicose.

## IV.1.1.2 Produtividade em acetato de etila

A Figura IV.7 apresenta a produtividade em acetato de etila em função da temperatura e da concentração inicial de glicose.



**FIGURA IV 7:** Influência da temperatura e da concentração inicial de glicose no meio YM sobre a produtividade em acetato de etila para a levedura *H. anomala*.

Verifica-se por esta figura que a produtividade em éster varia muito pouco nas temperaturas de 20 e 30°C nos meios de cultivo com concentrações iniciais de 40 e 75g.L<sup>-1</sup> de glicose. No entanto, uma concentração inicial de glicose de 100g.L<sup>-1</sup> e uma temperatura de 20°C foi favorável à produtividade em éster pela levedura *Hansenula anomala*, 0,65g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.

Portanto, pode-se concluir através destes estudos que a concentração de glicose e principalmente a temperatura do meio de cultivo influenciam muito na produção de acetato de etila pela levedura.



KILIAN *et al.* (1979) concordam que a produção de acetato de etila está relacionada com a temperatura. Eles estudaram, através do cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*, o efeito da temperatura sobre a síntese e a retenção de ésteres no meio de fermentação. De acordo com os autores, experimentos realizados na temperatura de 30°C reduziram a produção de ésteres e aumentaram a perda através da volatilização deste composto.

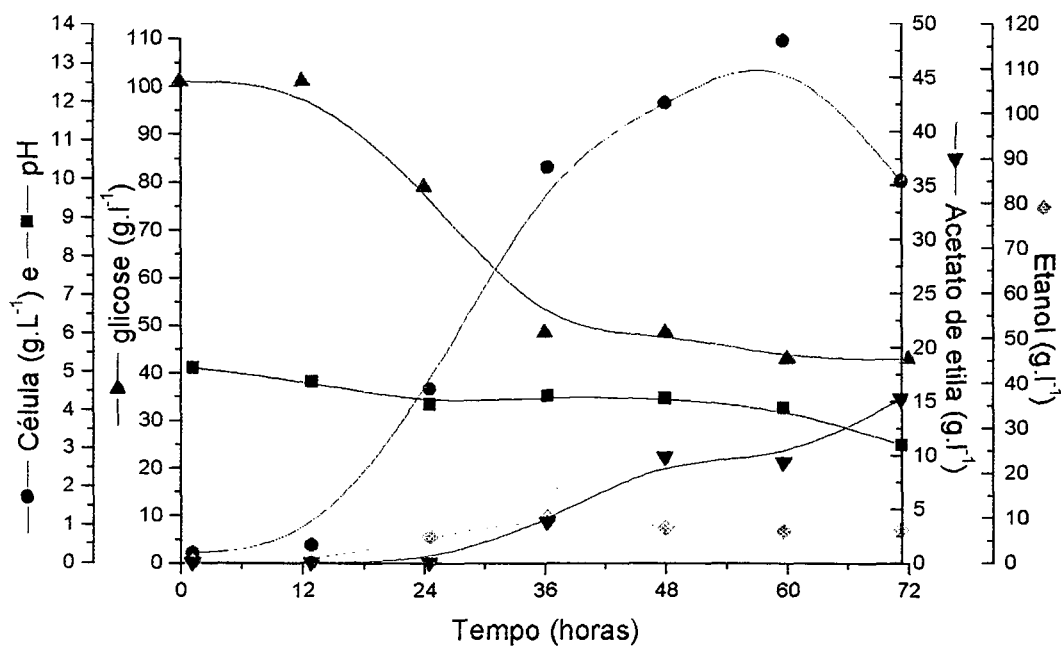
Apesar dos resultados da Tabela IV.1 terem mostrado que a melhor temperatura para o crescimento da levedura é de 30°C, optou-se por adotar a condição de 20°C e concentração de 100g.L<sup>-1</sup> de glicose nos experimentos posteriores. Esta escolha é dada pelas seguintes razões:

- Durante este estudo pôde-se observar que é melhor trabalhar com concentrações iniciais altas de glicose, neste caso 100g.L<sup>-1</sup>, porque a levedura *Hansenula anomala*, osmotolerante, promove a produção imediata e em grandes quantidades de acetato de etila e etanol.
- Para temperatura de 20°C, obteve-se maiores concentrações de acetato de etila.

#### IV.1.2 Estudo da disponibilidade de oxigênio

Dada a maior produção de acetato de etila na temperatura de 20°C, onde há maior dissolução do oxigênio no meio fermentativo, procurou-se investigar o efeito do oxigênio na produção do éster, usando-se frascos erlenmeyers de 300 e 1000mL.

As Figuras IV.5 e IV.8 apresentam os ensaios realizados na temperatura de 20°C e concentração inicial de glicose de 100g.L<sup>-1</sup> em erlenmeyer de 1000 e 300mL, respectivamente.



**FIGURA IV 8:** Cinética de crescimento da levedura *Hansenula anomala* e produção de acetato de etila e etanol no meio YM com 100g.L<sup>-1</sup> de glicose em erlenmeyer de 300mL, pH 5,5, 150min<sup>-1</sup> e 20°C.

Ao comparar as curvas de crescimento celular dos experimentos realizados em frascos de 300mL (Figura IV.8) e frascos de 1000mL (Figura IV.5), verifica-se a formação de uma fase lag maior para o ensaio de 300 mL, quando menos oxigênio está dissolvido no meio. A disponibilidade de oxigênio parece afetar também a velocidade inicial de consumo de substrato, bem como o aproveitamento de glicose, que para o frasco de 1000mL foi total. Para o frasco de 300mL houve um resíduo de 45 g.L<sup>-1</sup> de glicose após 72 horas de condução do processo fermentativo.

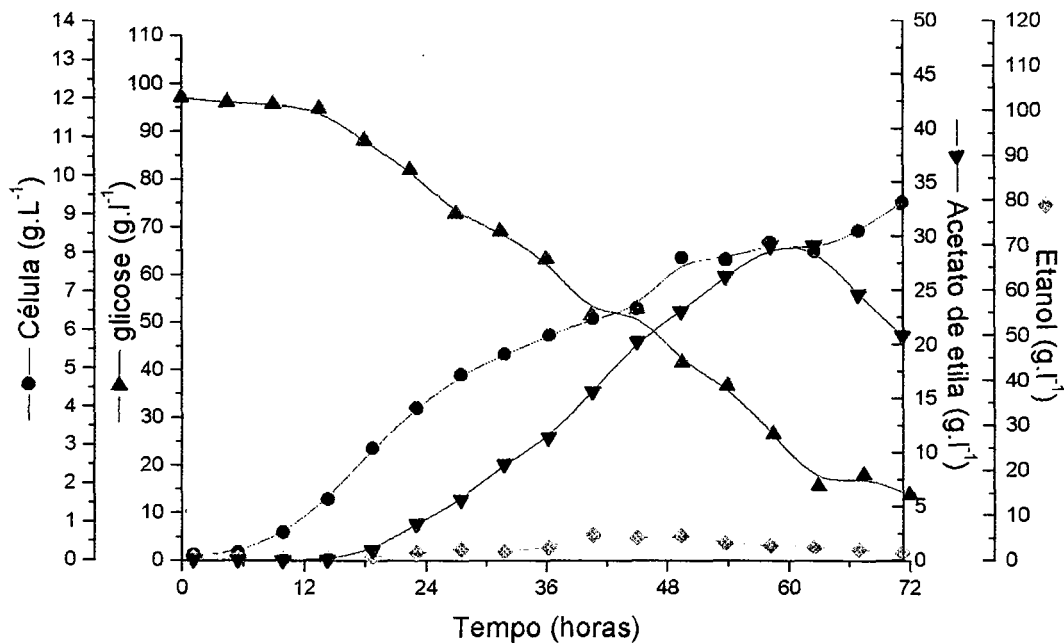
Paradoxalmente, há uma maior formação de células para menores concentrações de oxigênio dissolvidos, aproximadamente 13,0g.L<sup>-1</sup> para 300mL e 8,0g.L<sup>-1</sup> para 1000mL. Associando-se o fato de menor consumo de substrato apresentado nas menores concentrações de oxigênio dissolvido, conclui-se que o fator

de conversão de substrato em células é bem maior quando pouco oxigênio está presente no meio de cultivo.

Nota-se também, para o frasco de 300mL, que o consumo de glicose foi praticamente inibido em 36 horas de fermentação. Paralelamente a esse comportamento, a velocidade de crescimento celular diminuiu e a concentração de etanol manteve-se constante em  $3,6\text{g.L}^{-1}$ .

No ensaio representado na Figura IV.5, realizado em frasco erlenmeyer de 1000mL, a produção de acetato de etila e etanol foi de  $46,6\text{g.L}^{-1}$  e de  $122,3\text{g.L}^{-1}$ , respectivamente, enquanto no ensaio em frasco erlenmeyer de 300mL (Figura IV.8), as concentrações foram muito inferiores, de aproximadamente  $15,0$  e  $3,0\text{g.L}^{-1}$  respectivamente para acetato e etanol. Estas concentrações mostram uma disponibilidade menor de oxigênio afeta negativamente a produção de acetato de etila e etanol.

Considerando os melhores resultados obtidos com o frasco erlenmeyer de 1000 mL, foi realizado um novo teste com um frasco de 2000 mL. Os resultados são apresentados na Figura IV.9. Esses resultados não foram obtidos em duplicata, como foram os resultados para erlenmeyer de 300 e 1000mL.



**FIGURA IV 9:** Cinética de crescimento da levedura *Hansenula anomala* e produção de acetato de etila e etanol no meio YM com 100g.L<sup>-1</sup> de glicose em erlenmeyer de 2000mL, pH 5,5, 150min<sup>-1</sup> e 20°C.

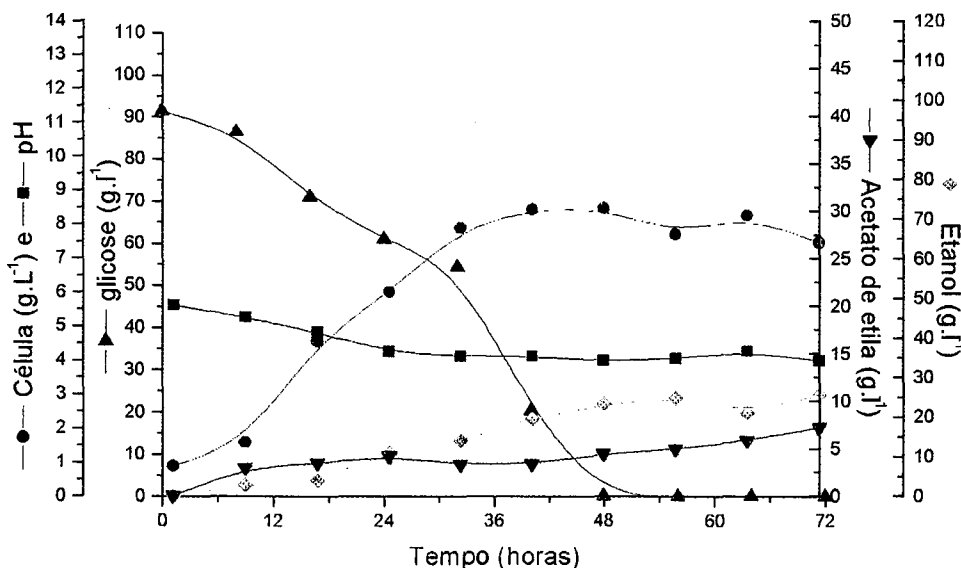
Observa-se que a produção de acetato de etila e etanol é bem menor para o frasco de 2000mL (Figura IV.9) que para o frasco de 1000 ml (Figura IV.5). Os resultados indicam que tanto a falta de oxigênio, como o excesso de oxigênio prejudicam a formação de acetato de etila. ARMSTRONG *et al.* (1984) obtiveram resultados semelhantes no estudo com a levedura *Candida utilis*, demonstrando que a aeração teve um efeito significativo na produção do éster. Outros autores citaram que, para o acúmulo do éster, o oxigênio é peça fundamental para sua produção (TABACHNICK & JOSLIN, 1953 e NORDSTRÖM (1964) *apud* ARMSTRONG *et al.*, 1984).

**IV.1.3 Influência da suplementação dos compostos  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e uréia no meio fermentativo**

Apesar do meio de cultivo conter extrato de levedura e peptona bacteriológica, compostos que apresentam altos índices de aminoácidos e peptídeos, procurou-se verificar se há carência dos elementos fósforo e nitrogênio para a produção de acetato de etila pela célula, uma vez que a concentração de glicose a ser metabolizada pela levedura é alta. Para este estudo foram adicionados ao meio fermentativo os compostos  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e uréia.

Observou-se que a produção de acetato de etila foi maior quando o frasco erlenmeyer de 1000mL foi utilizado, logo, para analisar a carência destes elementos, continuou-se realizando os testes nessa condição.

A Figura IV.10 apresenta a cinética de crescimento da levedura e a produção dos metabólitos acetato de etila e etanol quando o meio foi suplementado com  $1,0\text{g.L}^{-1}$  de uréia.



**FIGURA IV 10:** Cinética de crescimento da levedura *Hansenula anomala* e produção de metabólitos no meio YM contendo  $100\text{g.L}^{-1}$  de glicose e  $1,0\text{g.L}^{-1}$  de uréia a pH 5,5,  $150\text{min}^{-1}$  e  $20^\circ\text{C}$ .

Neste ensaio obteve-se  $8,0\text{g.L}^{-1}$  de acetato de etila, indicando não ter efeito positivo na suplementação do meio com nitrogênio, para a formação do éster. Ao contrário, a produção foi menor, o que sugere um efeito negativo pela uréia adicionada.

Da mesma forma, não foi observada alteração na produção de células, isso indica que o meio apresentava concentrações suficientes para o seu crescimento.

Está ilustrado na Figura IV.11 a cinética de crescimento e produção de acetato de etila e etanol para o ensaio com adição de  $0,5\text{g.L}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

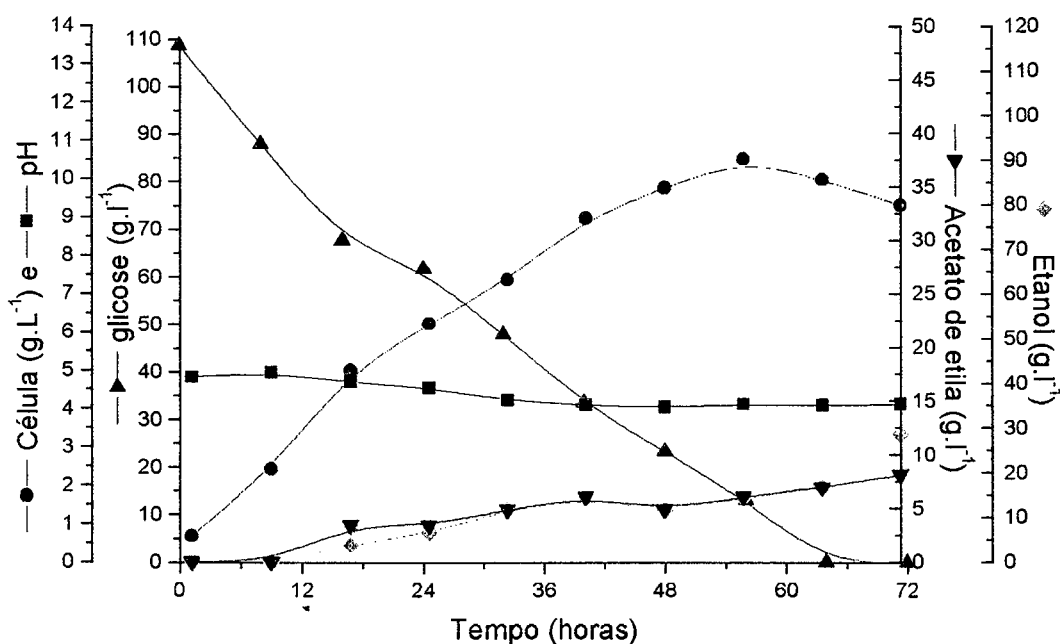


FIGURA IV 11: Cinética de crescimento da levedura *Hansenula anomala* e produção de metabólitos no meio YM contendo  $100\text{g.L}^{-1}$  de glicose e  $0,5\text{g.L}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a pH 5,5,  $150\text{min}^{-1}$  e  $20^\circ\text{C}$ .

Verifica-se que o fósforo tem um efeito positivo na produção celular, aproximadamente  $11,0\text{g.L}^{-1}$ , enquanto no ensaio realizado sem suplementação (Figura

IV.5), obteve-se uma concentração em torno de  $8\text{g.L}^{-1}$ . No entanto, para a formação do éster, não observa-se a necessidade de fazer maiores adições deste elemento.

De acordo com os estudos realizados por COGAN (1995), a adição de fósforo promove a produção de éster no cultivo destas bactérias, somente quando concentrações baixas de glicose estão presentes no meio de cultivo.

A Figura IV.12 apresenta a cinética de crescimento da levedura *Hansenula anomala* e a produção de acetato de etila quando o meio foi suplementado com  $1,0\text{g.L}^{-1}$  de uréia e  $0,5\text{g.L}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

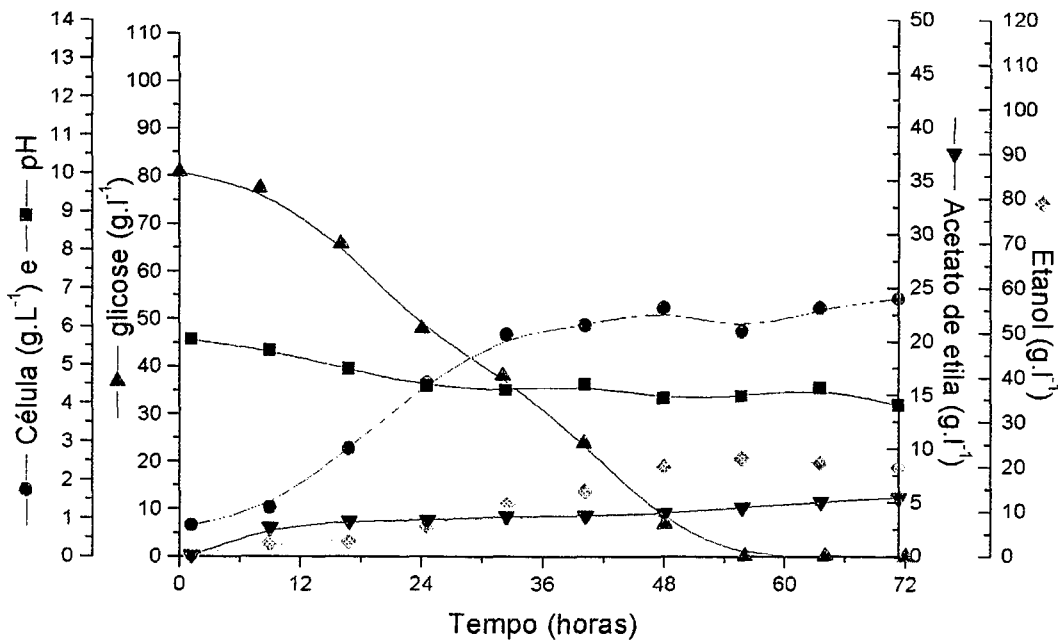


FIGURA IV 12: Cinética de crescimento da levedura *Hansenula anomala* e produção de metabólitos no meio YM contendo  $100\text{g.L}^{-1}$  de glicose,  $1,0\text{g.L}^{-1}$  de uréia e  $0,5\text{g.L}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 5,5,  $150\text{min}^{-1}$  e  $20^\circ\text{C}$ .

Observa-se que a adição dos sais  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e uréia diminui a produção de células. O crescimento celular foi inibido quando o meio de cultivo apresentava uma concentração em torno de  $37\text{g.L}^{-1}$  de glicose.

Verifica-se também que a suplementação do meio inibiu a produção de acetato de etila. A concentração manteve-se praticamente constante num período de aproximadamente 54 horas.

Observa-se nas Figuras IV.8 a IV.12 que a glicose sempre foi totalmente consumida. A adição dos sais não inibiu o seu consumo.

Estas figuras mostram, também, que a produção de etanol e acetato foi influenciada negativamente pela suplementação do meio com estes compostos. KAZUO & YOSHIOKA (1984), estudando a formação de ésteres pela levedura *Saccharomyces uvarum* durante a fermentação de açúcares, explicam que a deficiência de nitrogênio ajuda no transporte de certos peptídeos que não são assimilados com uma quantidade suficiente de aminoácidos. Esta ausência provoca a formação de ácidos graxos insaturados na membrana celular auxiliando no transporte de maltose e não de glicose para formação de ésteres de acetato.

## **IV.2 ENSAIOS EM FERMENTADOR**

### **Influência da aeração**

Com base nos resultados obtidos nos testes em “shaker”, direcionou-se os estudos para a produção do éster em reator. Foi fixada a concentração inicial de glicose em  $100\text{g.L}^{-1}$  e temperatura de  $20^\circ\text{C}$ , as melhores condições obtidas nos testes em “shaker” para a produção de acetato de etila. O objetivo dos testes em reator foi analisar a produção de acetato frente a diferentes condições de aeração.

As Figuras IV.13, IV.14 e IV.15 mostram o comportamento cinético do sistema com aeração de aproximadamente  $60$ ;  $300$  e  $600\text{mL.min}^{-1}$ , respectivamente.



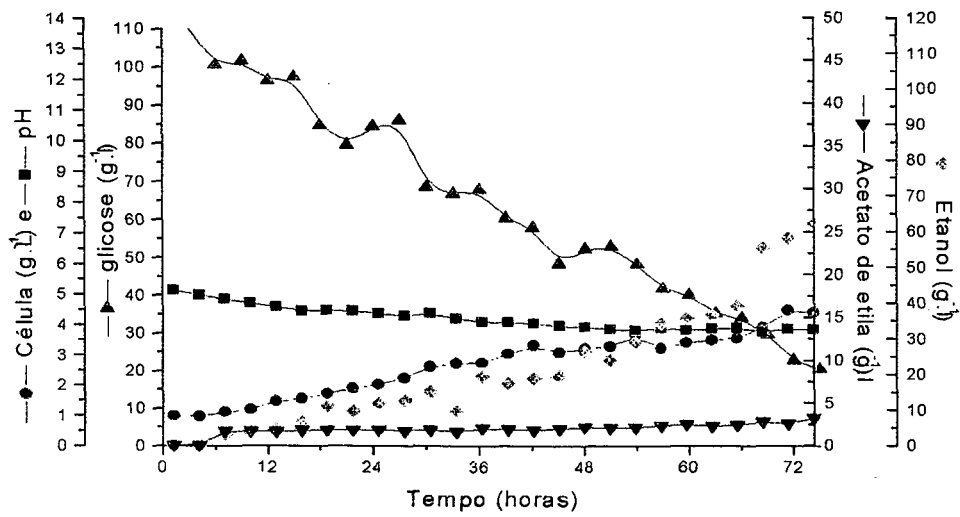


FIGURA IV 13: Cinética de crescimento da levedura *Hansenula anomala* no processo em batelada com aeração de 60mL.min<sup>-1</sup> em meio YM contendo uma concentração inicial de glicose de 100g.L<sup>-1</sup> e pH 5,5.

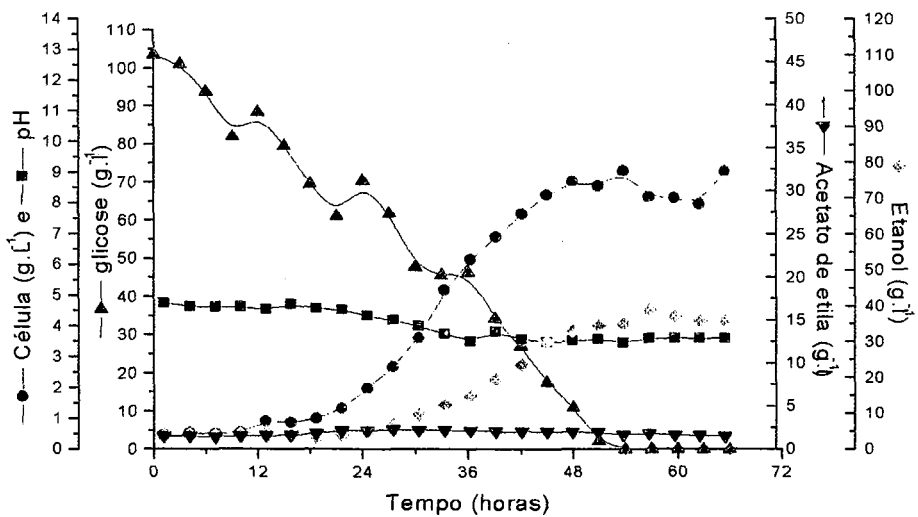
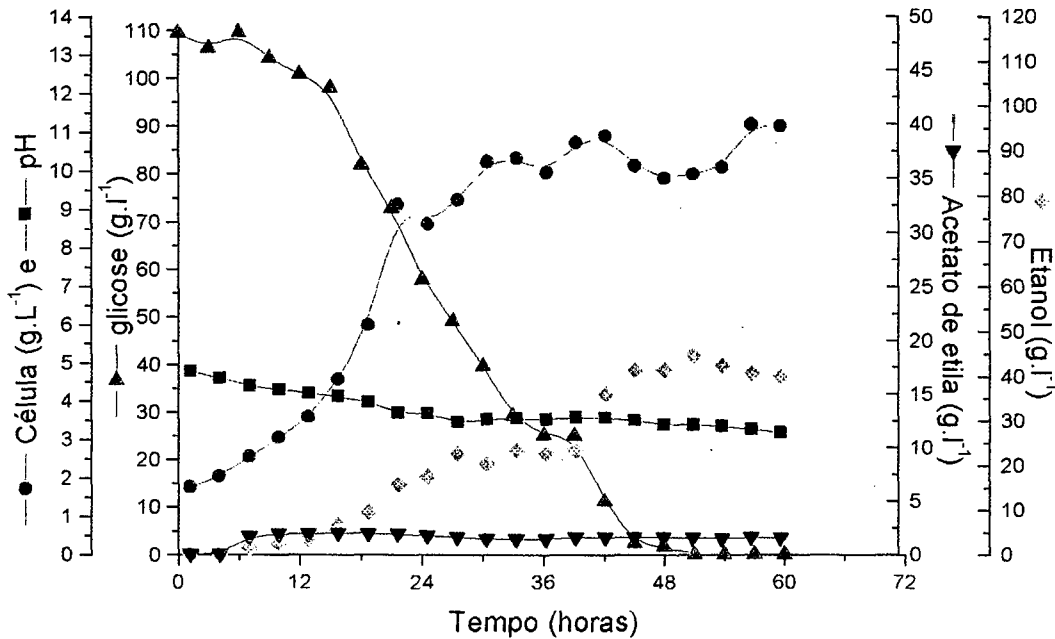


FIGURA IV 14: Cinética de crescimento da levedura *Hansenula anomala* no processo em batelada com aeração de 300mL.min<sup>-1</sup> em meio YM contendo uma concentração inicial de glicose de 100g.L<sup>-1</sup> e pH 5,5.



**FIGURA IV 15:** Cinética de crescimento da levedura *Hansenula anomala* no processo em batelada com aeração de 600mL.min<sup>-1</sup> em meio YM contendo uma concentração inicial de glicose de 100g.L<sup>-1</sup> e pH 5,5.

Analisando os experimentos realizados, nota-se que a velocidade de consumo de glicose aumenta com o aumento da vazão de ar. A concentração final de células também é maior a altas vazões de ar (4,5, 9,0 e 11,5g.L<sup>-1</sup> para as aerações de 60, 300 e 600mL.min<sup>-1</sup>, respectivamente). Assim, a conversão de glicose em células aumenta com o aumento do suprimento de oxigênio.

No estudo para baixa aeração (60 mL.min<sup>-1</sup>) produziu-se a maior concentração de etanol (63g.L<sup>-1</sup>) e a menor concentração de células. Isso indica uma deficiência no fornecimento de oxigênio, induzindo um metabolismo anaeróbico ou microaerófilico. Para aerações mais altas verifica-se concentrações máximas de etanol praticamente semelhantes (38,0 e 44,0 g.L<sup>-1</sup> para aerações de 300 e 600 mL.min<sup>-1</sup>, respectivamente).

Esse comportamento é característico do efeito Crabtree, ou seja, independente do fornecimento de oxigênio ao meio fermentativo produz-se concentrações elevadas de etanol.

Portanto, pode-se afirmar que para concentrações de glicose da ordem de  $100\text{g.L}^{-1}$  determina que o perfil metabólico de produção de energia da levedura é anaeróbio.

Nos três ensaios realizados em reator a produção de acetato de etila foi bastante baixa, obtendo-se concentrações menores que  $3,3\text{ g.L}^{-1}$ , bem abaixo que os resultados obtidos em *shaker* ( $46,5\text{ g.L}^{-1}$ ). Assim sendo, conclui-se que o fornecimento de oxigênio ao meio fermentativo, nos níveis estudados, prejudica a produção do éster.

Há a possibilidade de perdas de acetato de etila na corrente de saída do biorreator devido a alta volatilidade desse composto, apesar dos experimentos estarem sendo realizados a baixa temperatura ( $20^{\circ}\text{C}$ ). Porém, a ausência do aroma característico do acetato de etila na saída do biorreator indica que as perdas do composto não foram consideráveis e confirma a baixa produção do éster nas condições estudadas.

Através destes experimentos pode-se concluir, juntamente com os estudos em frascos erlenmeyer, que a formação do éster é extremamente sensível a presença de oxigênio no meio de cultivo e que a produção deste composto pela levedura *Hansenula anomala* é dependente dele.

Estes resultados concordam com TABACHNICK & JOSLYN (1953), DAVIES *et al.* (1951) e NORDSTRÖM (1964), onde afirmam que a tensão de oxigênio no meio de cultivo é um fator muito importante que influencia no acúmulo do composto acetato de etila em *Hansenula anomala* e outros microrganismos. ARMSTRONG *et al.* (1964), estudando a conversão de etanol a acetato de etila, pela levedura *Candida utilis*, boa produtora do éster, pôde observar também, que para níveis elevados de aeração, o rendimento em éster decresce.

## V. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

### V.1 CONCLUSÕES

Neste trabalho estudou-se a influência da temperatura, concentração de glicose, suplementação do meio com nitrogênio e fósforo e fornecimento de oxigênio ao meio de cultivo na cinética de produção de acetato de etila por *Hansenula anomala* CCT 2648.

- Com relação à temperatura de cultivo e concentração de glicose na produção de acetato de etila em frascos agitados, pode-se concluir que a levedura *Hansenula anomala* mostrou-se excelente produtora deste éster quando alia-se às condições de cultivo elevadas concentrações de glicose com baixa temperatura. Com efeito, no ensaio a  $100\text{g.L}^{-1}$  de concentração inicial de glicose à temperatura de  $20^{\circ}\text{C}$ , obteve-se  $46,5\text{g.L}^{-1}$  de acetato de etila quando foi utilizado um erlenmeyer de 1000mL.
- Com relação à disponibilidade de oxigênio no meio de cultivo, verificou-se que tanto em condições de excesso (erlenmeyer de 2000mL) como em condições de carência (erlenmeyer de 300mL), houve prejuízo na formação de acetato de etila. Os melhores resultados foram obtidos com frascos de 1000mL.
- Com relação ao estudo do efeito da suplementação do meio com sais de uréia e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , na produção de acetato de etila, verificou-se uma influência negativa. Em todos os ensaios com suplementação destes sais, a produção de acetato de etila foi menor do que no ensaio sem suplementação, indicando que o meio

complexo YM certamente continha estes elementos (fósforo e nitrogênio) em quantidade suficiente.

- No reator, a produção de acetato de etila não foi favorecida através da aeração do meio de cultivo, obtendo-se concentrações máximas de  $3,3\text{g.L}^{-1}$  quando  $60\text{mL.min}^{-1}$  de ar foi fornecida (condições baixas de fornecimento de oxigênio). Nos ensaios com aerações maiores ( $300$  e  $600\text{mL.min}^{-1}$ ), estimulou-se o consumo de glicose e a maior produção de biomassa.
- Todas as vazões de ar estudadas nos ensaios em biorreator favoreceram somente a produção de etanol. Uma aeração de  $60\text{mL.min}^{-1}$  induziu um metabolismo anaeróbico ou facultativo, contribuindo para uma elevada concentração de  $63\text{g.L}^{-1}$  de etanol. A levedura *Hansenula anomala* também produziu boas concentrações deste álcool, em torno de  $40\text{g.L}^{-1}$ , mesmo quando foram empregadas aerações altas de  $300$  e  $600\text{mL.min}^{-1}$ , indicando a ocorrência do efeito Crabtree.
- Verificou-se em todos os ensaios realizados no estudo da influência do oxigênio na produção de acetato de etila que a formação do éster é extremamente influenciada pela concentração deste nutriente no meio de cultivo.

## V.2 PERSPECTIVAS

- Com uma sonda de oxigênio, fazer medições das concentrações deste composto no meio de fermentação, avaliando a sua contribuição na produção de acetato de etila durante todo o processo, uma vez que as análises realizadas neste trabalho demonstraram oscilações nas curvas de produção de etanol e acetato de etila;
- Estudar concentrações superiores a  $100\text{g.L}^{-1}$  de glicose, uma vez que a levedura é osmotolerante e apresenta habilidade de produzir altas concentrações de acetato de etila quando concentrações elevadas desse substrato estão presentes no meio;
- Estudar a produção de acetato de etila com temperaturas menores, já que a levedura *Hansenula anomala* produziu muito mais acetato de etila a temperatura de  $20^{\circ}\text{C}$  e não de  $30^{\circ}\text{C}$ . O uso de temperaturas menores também diminui o processo de perdas do aroma, além de diminuir os gastos com a energia para reter estes compostos;
- Fazer testes de injeção de oxigênio no meio de cultivo, nos períodos em que a concentração de etanol é alta;
- Analisar a influência do  $\text{CO}_2$  na produção de acetato de etila para fazer estudos posteriores em escala maior.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, B., KRINGS, U. & BERGER, R. G. Dynamic extraction, an efficient screening procedure for producing basidiomycetes. **Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.** 15, 5-6, 178-181, 1993.

AKHTA, M., SUBDEN, R. E., CUNNINGHAM, J. D. & FYFE, C. Production of volatile yeast metabolites in fermenting grape musts. **Canadian Institute Food Science Technology Journal**, 18(4), 280-3, 1985.

ANONYME (1997): **Manual IFF ("International Flavors and Fragrances") Essências e Fragrâncias Ltda.**

ARMSTRONG, D. W.; MARTIN, S. M. & YAMAZAKI, H. Production of ethyl acetate from dilute ethanol solutions by *Candida utilis*. **Biotechnology and Bioengineering**, 26, 1038-41, 1984.

ARMSTRONG, D. W. Selective production of ethyl acetate by *Candida utilis*. In: Biogenesis of aromas (T. H. Parliment and Croteau, eds.). Washington, DC, **ACS Symposium Series**, 317, 254-265, 1986.

- ARMSTRONG, D. W & BROWN, L. A. Aliphatic, aromatic, and lactones compounds. In: **Bioprocess production of aroma, fragrance, and color ingredients**, edited by Alan Gabelman, 1994.
- BARFORD, J. P. & HALL, R. J. An examination of the Crabtree effect in *Saccharomyces cerevisiae*. The role of respiratory adaptation. **Journal Genetic Microbiology**, 114, 267-275, 1979.
- BERGER, R; G.; DRAWERT, F. & HADRICH, S. Microbial sources of flavor compounds. **Bioaroma'87: Analysis – Biochemistry – Biotechnology**. Edited by Peter Schreier, 415-434, 1988.
- BERGER, R. G. **Aroma Biotechnology**. 1<sup>st</sup> - Ed. Berlin: Springer-Verlag, 239, 1995.
- BOELEN, M. H., BOELEN H. & GEMERT, L. J. Trends in aroma research and gas chromatography-olfactometry. **Perfumer & Flavorist**, 20, 1-6, 1995.
- CASTRILLO, J. I. & UGALDE, U. O. Energy metabolism of *Kluyveromyces marxianus* in deproteinated whey. Chemostat studies. **Modeling Journal Biotechnology**, 22, 145-152, 1992.
- CHEETHAM, P. S. J. The flavor and fragrance industry. In: The science and the business. Edited by V. Moses and R. E. Cape., Harwood Acad., London, **Biotechnology**, 481-506, 1991.
- CHRISTEN, P. & LOPEZ-MUNGUÍA, A. Enzymes and Food Aroma - A Review. **Food Biotechnology**, 8(2 e 3), 167-190, 1994.



- CIANI, M. F. Selective sugar consumption by apiculate yeasts. **Applied Microbiology**, 28, 203-206, 1999.
- CIMPRICH P., SLAVIK J. & KOTYK A. Distribution of individual pH values in a population of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, 130, 245-252, 1995.
- COGAN, T. M. Flavor production by dairy starter cultures. **Journal Applied Bacteriology** 79: 49S-64S, 1995.
- COOLINS, E. B. Biosynthesis of aroma compounds by microorganisms. **Journal Dairy Science**, 55, 1022-1028, 1972.
- CRABTREE, H. D. Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. **Biochemical Journal**, 23, 536-545, 1929
- DATTA, R. **Biotechnology Bioengineering Symposium**, 11, 521, 1981.
- DAVIES, R., FALKINER, E. A., WILKINSON, J. F. & PEEL, L. **Biochemical Journal**, 49, 58, 1951.
- DI STEFANO, R., CIOLFI, G. & DELFINI, C. Composti volatili prodotti dai lieviti. **Rivista di Viticoltura e Enologia**, 34(8), 342-55, 1981.
- DZIEZAK, J. D. Biotechnology and aroma development: In industrial research perspective. **Food Technology**, 4, 108-13, 1986.

- ELLIS, L. C. Free radicals in tissue culture. Part IV: Effects on cells in culture. **Art to Science**, 10, 1-5, (1991). Cyclone publication.
- FABRE, C. E., DUVIAU, V. J., BLANC, P. J. & GOMA, G. Identification of volatile flavour compounds obtained in culture of *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology Letters**, 17(11), 1207-1212, 1995.
- FABRE, C. Nouveaux procedes de production d'arômes naturels par bioconversion. Toulouse: L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE TOULOUSE, 202, 1996. These (Doctorat espécialité Biologie et Genetique Moleculaires Et Cellulaires – Biotechnologie), 1996.
- FLEET, G. H. & HEARD, G. M. Yeasts growth during fermentation. In: **Wine Microbiology and Biotechnology**, edited by G. H. Fleet, Harwood Academic Publishers. Chur. Switzerland, 27, 1993.
- FRANCE K. K. & HU, W. S. Oxygen uptake of mammalian cells in micro carrier culture – response to changes in glucose concentration. **Biotechnology Letters**, 7, 147-152, 1985.
- GATFIELD, I. L. Production of flavor and aroma compounds by biotechnology. **Food Technology**, 42 (10) 110-122, 169, 1988.
- GATFIELD, I. L. Enzymatic and microbial generation of flavors. **Perfumer & Flavorist**, 20, 5-14, 1995.

- GEBICKI, S. & GEBICHI, J. M. Formation of peroxides in amino acids and proteins exposed to oxygen free radical. **Biochemical Journal**, 289, 743-9, 1993.
- GODFREY, T. **In industrial enzymology: The application of enzymes in industry.** Godfrey, T.; Riechelt, J., Edited by Nature Press, New York, 424-427, 1983.
- GONZÁLEZ-SISO, M. I., RAMIL, E., CERDÍAN, M. E. & FREIRE-PICOS, M. A. Respirofermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis* ethanol production and the Crabtree effect. **Enzyme Microbiology Technology**, 18, 185-591, 1996.
- GILLIES B., YAMAZAKI, H. ARMSTRONG, D. W. Production of flavor esters by immobilized lipase. **Biotechnology Letters**, 9: 709, 1987.
- HAGEDORN, S. & KAPHAMMER, B. Microbial biocatalysis in the generation of aroma and fragrance chemicals. **Microbiology**, 48, 773-800, 1994.
- HEATH, H. B. & REINECCIUS, G. Aroma chemistry and technology. In: **Biogenesis of aroma in fruits and vegetables.** New York, Published by Van Nostrand Reinhold Company, 1986.
- HERRÁIZ, T. Production biotecnologica de compuestos del aroma de alimentos. In: Aplicacion en la industria Alimentaria. **Alimentaria**, 35-39, 1990.
- HORTON, H. W. **Food Technology**, 41, 80, 1987.

- JANSSENS, L., DE POOTER, H. L., SCHAMP, N. M. & VANDAMME, E. J. Biosynthesis of esters by *Geotrichum penicillatum*. **Bioflavour'87**. In: Analysis - Biochemistry - Biotechnology. Editor Peter Schreier, 465-471, 1988.
- JANSSENS, L., DE POOTER, H. L., SCHAMP, N. M. & VANDAMME, E. J. Production of flavors by microorganisms. **Process Biochemistry**, 27, 195-215, 1992.
- JIANG, J. Volatile metabolites produced by *Kluyveromyces lactis* and their changes during fermentation. **Process Biochemistry**, 30(7), 635-640, 1995.
- KANG, H. S., DIM, J. H. & SHIN, H. K. Partial purification and catalytic properties of alcohol acetyltransferase from *Hansenula anomala*. **Korean Journal Applied Microbiology Bioengineering**, 14(1), 69-73, (1986).
- KATZ, I. Biogenesis of aromas. In: Biogenesis of aromas (T. H. Parliament and Croteau, eds.) Washington, DC, **ACS Symposium Series**, 317, 380-386, 1986.
- KEMPLER, G. M. Production of aroma compounds by microorganisms. **Advances in Applied Microbiology**, 29, 29-51, 1983.
- KIERS, J., ZEEMAN, A. M., LUTTIK, M., THIELE, C., CASTRILLO, J. I., STEENSMA, H. Y., VAN DIJKEN, J. P. & PRONK, J. T. Regulation of alcoholic fermentation in batch and chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis* CBS 2359. **Yeast**, 14, 459-469, 1998.

- KILLIAN, E. & OUGH, C. S. Fermentation esters – formation and retention as affected by fermentation temperature. **American Journal of Enology and Viticulture**, 30(4), 301-305, 1979.
- KIRK-OTHMER. Aroma and spices. **Encyclopedia of Chemical Technology**, 10, 3<sup>rd</sup> - edited by John Wiley & Sons Inc. 456-486, 1983.
- KIRK-OTHMER. Esters organic. **Encyclopedia of Chemical Technology**, 9, 3<sup>rd</sup> - edited by John Wiley & Sons Inc., 291-310, 1983.
- KRINGS, U., ABRAHAM, B. G. & BERGER, R. G. Plant impact volatiles from higher fungi - A biotechnological perspective. **Perfumer & Aromaist**, 20, 79-86, 1995.
- KRINGS, U. & BERGER, R. G. Biotechnological production of flavors and fragrances. **Applied Microbiology Biotechnology**, 49, 1-8, 1998.
- LANCIOTTI, R., SINIGALHIA, M, GARDINI, F & GUERZONI, ME. *Hansenula anomala* as spoilage agent of cream-filled cakes. **Microbial Research**, 153(2), 145-148, 1998.
- LATRASSE, A. & DAMERON, P. An ester producing microorganism: *Geotrichum candidum* (STARON). In: Analysis – Biochemistry – Biotechnology. **Bioflavour'87**. Editor Peter Schreier, 465-471, 1988.
- LEYVA, J. S., MANRIQUE, M., PRATS, L., LOUREIRO-DIAS, M. C. & PEINADO, J. M. Regulation of fermentative CO<sub>2</sub> production by the food spoilage yeast

*Zygosaccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, 24, 270-275, 1999.

MANLEY, C. H. **The development and regulation of aroma, fragrance, and color ingredients produced by biotechnology**. *Process of Production of Aroma, Fragrance and Color Ingredients*, edited by Alan Gabelman, 19-39, 1995.

MARIC, V. & HOUGH, J. S. Continuous fermentation of high gravity brewer's wort by a yeast mixture. **Prehrambeno-Tehnoloska Revija**, 17 (3), 111-114, 1979.

MAYER, B. G. **Les matières premières de l'aromatisation**. *Pour la Science*, 160, 30-389, 1991 *apud* FABRE, C. **Nouveaux procedes de Production d'arômes naturels par bioconversion**. Toulouse: L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE TOULOUSE, 202, 1996. These (Doctorat espécialité Biologie et Genetique Moleculaires Et Cellulaires – Biotechnologie).

MARQUES, D. B. & PASTORE, G. M. Produção de aromas naturais por microrganismos. **Boletim SBCTA**, 33(1), 80-85, 1999.

McHILL. Ethyl acetate. **McHill encyclopedia of science and technology**, 5, 96, 1971.

MOLL, N. & MOLL, M. **Additifs alimentaires et auxiliares technologiques**. Ed. Masson, Paris, 83-84, 1990. *Apud* FABRE, C. **Nouveaux procedes de production d'arômes naturels par bioconversion**. Toulouse: L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE TOULOUSE, 202, 1996. These (Doctorat espécialité Biologie et Genetique Moleculaires Et Cellulaires – Biotechnologie).

- MORETTO, E. & FETT R. **Manual de Aditivos para Indústria de Alimentos**. 2ª edição, Editora da UFSC, 112, 1988.
- MORITZ, D. E. Estudo do crescimento de três leveduras produtoras de aromas. **Dissertação de Mestrado do Programa de Biotecnologia**. Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC, Florianópolis, 1998.
- MORITZ, D. E., FÜCHTER, A., Furigo, Jr. A. & NINOW, J. L. Produção de acetato de etila por *Hansenula anomala* CCT 2648. **XIII Simpósio Nacional de Fermentações**, 2000.
- NAGODAWITHANA, T. W. & STEINKRAUS, H. K. **Applied Environmental Microbiology**, 31,158-162, 1976.
- NORDSTRÖM, K. **Journal of the Institute of Brewing**, 68, 398, 1962.
- NORDSTRÖM, K. **Journal of the Institute of Brewing**, 69, 142, 1963.
- NORDSTRÖM, K. Studies on the formation of volatile esters in fermentation with Brewer's Yeast. **Svensk Kem. Tidskr.** 76, 9-43, 1964.
- OLIVEIRA, D. Uso de um sensor de compostos voláteis para o controle de uma fermentação batelada alimentada de *Saccharomyces cerevisiae*. **Dissertação de Mestrado em Engenharia Química**, Universidade Federal de Santa Catarina,-UFSC, Florianópolis, 1995.

- OSOL, A. & HOOVER, J. E. Ed. **Remington's Pharmaceutical Sciences**. 15. Easton, Penn., Mack, 1975.
- PAMPULHA M. F. & LOUREIRO, V. Interaction of the effects of acetic acid and ethanol on inhibition of fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, 11(4), 269-274, 1989.
- PARLIMENT, T. H. Sample preparation techniques for gas-liquid chromatographic analysis of biologically derived aromas. In: *Biogenesis of Aromas* (T. H. Parliment and Croteau, eds.). Washington, DC, **ACS Symposium Series**. 317, 34-52, 1986.
- PASTORE, G. M. SATO, H. H., YANG, T. S., PARK, Y. K. & MIN, D. B. Production of fruity aroma by newly isolated yeast. **Biotechnology Letters**, 16, 389-392, 1994.
- PEIXOTO Jr., N. H. G. Produção de acetato de etila por uma linhagem de *Hansenula anomala*. **Dissertação de mestrado da Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro, 1996.**
- POSTMA, E., VERDUIN, C., SCHEFFERS, W. A. & VAN DIJKEN, J. P. Enzymatic analysis of the Crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Environmental Microbiology**, 55, 468-477, 1989.
- QURESHI, N., TAMHANE, D. V. Production of mead by immobilized cells of *Hansenula anomala*. **Applied Microbiology Biotechnology**, 27, 27-30, 1987.



- RIEGER, M., KÄPPELI, O. & FIECHTER, A. The role of limited respiration in the incomplete oxidation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal Genetic Microbiology**, 129, 653-661, 1983.
- ROMANO, P. & SUZZI, G. Origin and production of acetoin during wine yeast fermentation. **Applied Environmental Microbiology**, 62, 309-315, 1996.
- ROMANO, P., SUZZI, G., COMI, G., ZIRONI, R. & MAIFREDI, M. Glycerol and other fermentation products of apiculate yeast. **Journal Applied Bacteriology**, 82, 615-618, 1997.
- SARIASLANI, F. S. & ROSAZZA, J. P. N. Biocatalysis in natural products chemistry. **Enzyme Microbiology and Technology**, 6, 242-253, 1984.
- SCHARPF, Jr. L. G., SEITZ, E. W., MORRIS, J. A. & FARBOOD, M. I. Generation of aroma and odor compounds through fermentation processes. In: *Biogenesis of Aromas* (T. H. Parliment and Croteau, eds.). Washington, DC, **ACS Symposium Series**, 317, 323-346, 1986.
- SCHINDLER, J. & SCHMID, R. D. Fragrance or aroma chemicals. In: *Microbial Synthesis and Enzymatic Transformation*. **Process Biochemistry**, 2-8, 1982.
- SHULER, M. L. & KARGI, F. **Bioprocess Engineering: Basic Concepts**. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, 479, 1992.
- SIMÃO, A. M. *Aditivos para alimentos sob o aspecto toxicológico*. São Paulo: **Nobel**, 1985.

- SONNLEITNERM, B. & KÄPELLI, O. Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by its limited respiratory capacity: Formulation in verification of a hypothesis. **Biotechnology Bioengineering**, 28, 927-937, 1986.
- STANBURY P. F. & WHITAKER A. **Principles of fermentation technology**, Pergamon Press, 9, 169-192, 1984.
- SULIVAN, S. J., ROBERTS, R. J. & SPITZ, D. R. Replacement of media in cell culture alters oxygen toxicity: Possible role of lipid aldehydes and glutathione transferases in oxygen toxicity. **Journal Cell Physiology**, 147, 427-433, 1991.
- TABACHNICK, J & JOSLIN, M. A. Formation of esters by yeast. 1. The production of ethyl acetate by standing surface cultures of *Hansenula anomala*. **Journal Bacteriology**, 65, 1-9, 1953.
- THOMAS, K. C. & DAWSON, P. S. S. Relationship between iron limited growth and energy limitation during phased cultivation of *Candida utilis*. **Canadian Journal Microbiology**, 24, 440-447, 1978.
- TRINDER, R. In: CELM – Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos. **Annual Clinica Biochemistry**. São Paulo. Instruções para a determinação enzimática de glicose pelo método Glicose-E, 1969.
- UNGER, L. Basic business trends in the worldwide aroma and fragrance industry (1987-1990). **Perfumer & Aromaist**, 14(3), 42-45, 1989.

VAN URK, H., VOLL, W. S. L., SCHEFFERS, W. A. & VAN DIJKEN, J. P. Transient-state analysis of metabolite fluxes in Crabtree-positive and Crabtree-negative yeasts. **Applied Environmental Microbiology**, 56, 281-287, 1990.

VOET, D. & VOET, J. G. **Biochemistry**. John Wiley & Sons Inc, 1990.

WALKER, G. M. **Yeast Physiology and Biotechnology**, John Wiley & Sons 1999.

WELSH, F. W. Overview of bioprocess aroma and fragrance production. **In: Bioprocess production of aroma, fragrance and color ingredients**. Edited by Alan Gabelman, 1995.

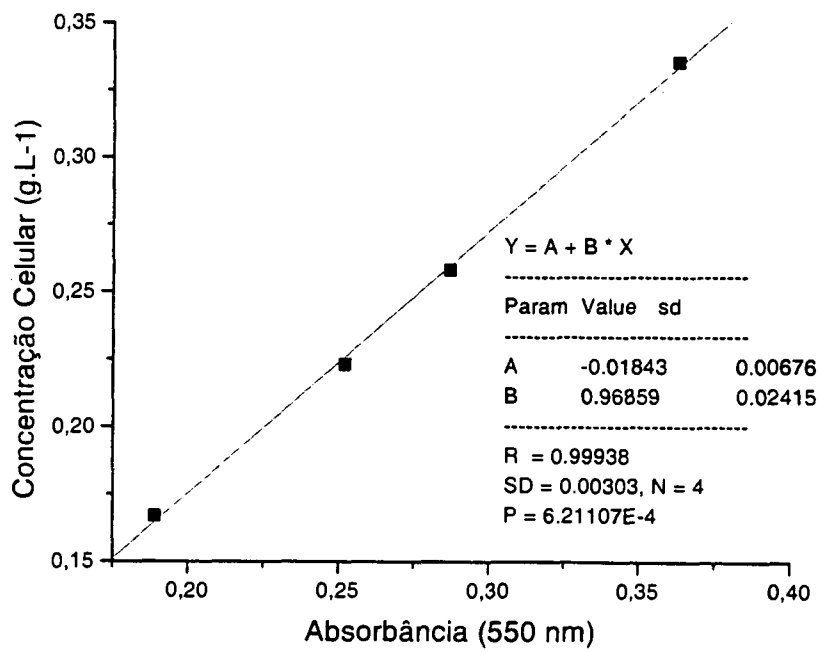
WIJAYA, C. H. Analysis of aroma components produced by *Hansenula anomala* grown on coconut water substrate. **Bui. Tek. dan Industri Pangan**, 6(1), 12-5, 1995.

YOSHIOKA, K. & HASHIMOTO N. Ester formation by brewer's yeast during sugar fermentation. **Agriculture Biological Chemistry**, 48(2), 333-340, 1984.

## ANEXOS

## ANEXO 1

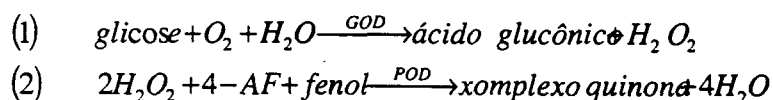
## Curva de calibração de células



## ANEXO 2

### Determinação de glicose pelo método enzimático colorimétrico glicose oxidase.

Neste método, a glicose é oxidada pela enzima glicose oxidase (GOD) a ácido glucônico e água oxigenada (1). Em presença de peroxidase (POD),  $H_2O_2$  produz a copulação oxidativa do fenol com a 4-aminofenazona (4-AF) dando lugar à formação de um cromógeno vermelho cereja (2), cuja intensidade da cor é proporcional à concentração de glicose na solução em análise. A seqüência reacional é apresentada a seguir:



As leituras de absorvância foram feitas em espectrofotômetro (modelo E225D, CELM) a 500 nm. O procedimento completo é descrito na Tabela 1.

#### Reagentes utilizados

1. **Reagente colorimétrico enzimático:**  $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$  4-aminofenazona,  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$  hidroxibenzoato,  $5.000 \text{ U.L}^{-1}$  glicose oxidase,  $500 \text{ U.L}^{-1}$  peroxidase em 250 mL de água
2. **Tampão e estabilizador:**
3. **Padrão de glicose:** Solução de glicose a  $100 \text{ mg.dL}^{-1}$

TABELA 1: Procedimento para determinação de glicose nas amostras:

| Soluções     | Branco (mL) | Padrão (mL) | Teste (mL) |
|--------------|-------------|-------------|------------|
| Reagente cor | 2,0         | 2,0         | 2,0        |
| Padrão       | -           | 0,02        | -          |
| Amostra(*)   | -           | -           | 0,02       |

(\*)Amostra: amostras retiradas durante o período de fermentação.

- As amostras foram diluídas em água destilada de modo que fosse obtida uma solução de glicose com concentração entre 4,0 e 50,0 mg.L<sup>-1</sup>;
- Todas as soluções foram agitadas vigorosamente (homogeneização) e colocadas em banho-maria a 37°C durante 10 minutos. As absorbâncias da amostra e padrão foram determinadas a 500 nm, acertando o zero com o branco.
- As medidas de absorbância devem ser feitas no tempo máximo de 1 hora. Período que a cor permanece estável.

### Cálculo

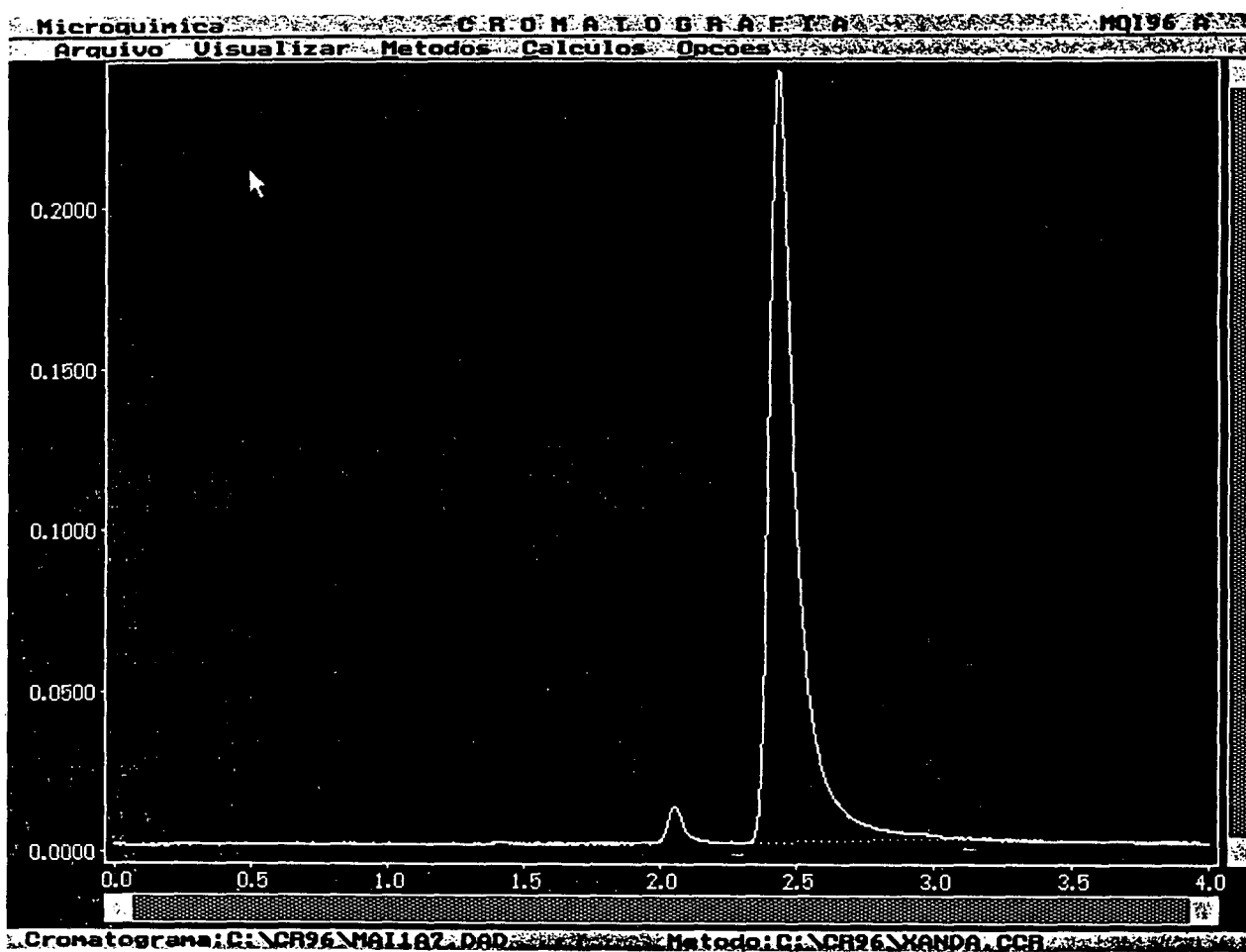
$$(3) \text{ mg de glicose por dL} = \frac{Abs(teste)}{Abs(padr\tilde{a}o)} \times 100$$

### Linearidade

O resultado da medição é linear até 400 mg.dL<sup>-1</sup>. Amostras com concentrações superiores foram diluídas e testadas novamente.

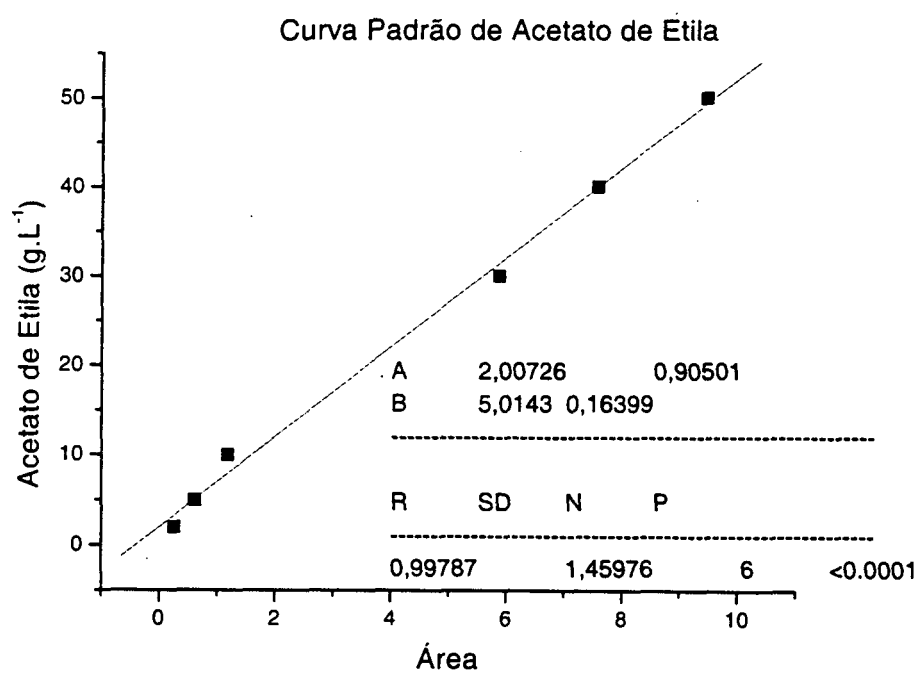
## ANEXO 3

Cromatograma típico das análises de etanol e acetato de etila realizadas por cromatografia em fase gasosa



## ANEXO 4

## Curva de calibração de acetato de etila





## ANEXO 5

## Curva de calibração de etanol

