

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**ESTUDO DO CRESCIMENTO DE TRÊS LEVEDURAS  
PRODUTORAS DE AROMAS**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Doutor Jorge Luiz Ninow

Co-orientador: Prof. Doutor Agenor Furigo Junior

**DENISE ESTEVES MORITZ**

Florianópolis - SC

1998

“ESTUDO DO CRESCIMENTO DE TRÊS LEVEDURAS  
PRODUTORAS DE AROMAS”

POR

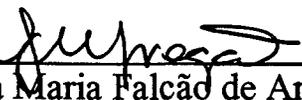
DENISE ESTEVES MORITZ

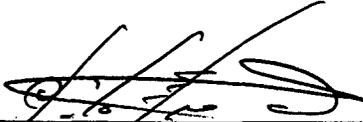
Dissertação julgada e aprovada em sua  
forma final, pelo Orientador e membros  
da Banca Examinadora, composta pelos  
Professores Doutores:

Comissão Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Jorge Luiz Ninow  
Orientador (ENQ/CTC/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Agenor Fúrigo Júnior  
Co-orientador (ENQ/CTC/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Gláucia Maria Falcão de Aragão  
(ENQ/CTC/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Gildo Almeida da Silva  
(EMBRAPA, Bento Gonçalves, RS)

Florianópolis, julho de 1998

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

**ESTUDO DO CRESCIMENTO DE TRÊS LEVEDURAS PRODUTORAS DE  
AROMAS**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Doutor Jorge Luiz Ninow

Co-orientador: Prof. Doutor Agenor Furigo Junior

DENISE ESTEVES MORITZ

Florianópolis - SC

1998

A parte experimental deste trabalho foi desenvolvida no laboratório de Engenharia Bioquímica do Departamento de Engenharia Química e Alimentos (EQA), UFSC, Florianópolis, SC.

Ao meu esposo Helcio e aos meus  
filhos Ana Luiza e Pedro Henrique,  
com muito amor.

Aos meus pais, que propiciaram esse  
meu caminho.

Em memória de minhas filhas  
Fernanda e Beatriz

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Jorge Luiz Ninow pela orientação e amizade demonstrada ao longo destes anos de trabalho, especialmente durante a realização e redação da dissertação.

Ao Dr. Agenor Furigo Junior, agradeço também pela orientação, amizade e apoio prestados nestes anos de convivência, também pelas correções durante a redação da dissertação.

À Dr<sup>a</sup>. Gláucia e Dr. Boris pelos conselhos, disponibilidade e competência em esclarecer as dúvidas.

Aos professores , Dr. Gildo Silva, Dr<sup>a</sup>. Gláucia Maria Falcão Aragão por aceitarem revisar este trabalho e participar da banca de defesa desta dissertação.

Aos amigos, Rita, Alexandre, Fábio, Roberta, Rodrigo, Michaela, Salete, Julieta, Márcia e Camila que estiveram totalmente dispostos a ajudar em qualquer momento e cuja presença tornou o dia a dia mais agradável e divertido.

Aos colegas do departamento de Engenharia Química, Edevilson, Ildo, Rogéria, Carlúcia, Eiza e demais funcionários, professores e pesquisadores pelo companheirismo e amizade.

À coordenação do curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, em especial à Dr<sup>a</sup>. Margarida Mendonça e ao João Santana, pelo apoio nos momentos que precisei.

Ao meu marido Helcio, meus filhos Ana Luiza e Pedro Henrique, pela paciência, incentivo e principalmente pelo carinho que me deram nos momentos mais difíceis.

Aos meus familiares, especialmente meus pais Ruy e Daise que sempre tiveram uma palavra de carinho e estímulo, aos meus irmãos Rosana, Regis e Sérgio, ao Gérson pelo inesgotável apoio e à Carmen pela hospedagem e carinho, o meu muito obrigada.

Meus agradecimentos à diretoria da Indústria de Química Fina em Santa Catarina QUIMSAR, especialmente à pessoa do Dr. Rosendo Yunes pelo apoio técnico.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>i</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>iv</b>
<b>NOMENCLATURA</b>	<b>v</b>
<b>RESUMO</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>viii</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>4</b>
1 - AROMAS	4
1.1 - Terminologia	4
1.2 - Histórico	5
1.3 - Definição	6
1.4 - Aplicações	7
1.5 - Classificação	8
1.5.1 - Aroma artificial	8
1.5.2 - Aroma natural	9
1.6 - Aplicação da biotecnologia à produção de compostos naturais biologicamente ativos.	9
1.6.1 - O progresso da biotecnologia	10

1.6.2 - Formas de produção de aromas via processos biotecnológicos	11
1.6.3 - Microrganismos produtores de aromas	12
1.6.4 - Estudos genéticos para produção de aromas	13
1.7 - Mercado mundial e nacional	14
1.8 - Acetoína, Diacetil e 2,3 butanodiol objeto deste trabalho	15
1.8.1 - Diacetil	15
1.8.2 - Acetoína	18
1.8.2.1 - Biossíntese de acetoína por bactérias	20
1.8.2.2 - Biossíntese de acetoína por leveduras	21
1.8.2.3 - Fatores que afetam a produção de acetoína pelas leveduras	26
1.8.2.4 - Principais microrganismos produtores de acetoína e/ou diacetil	28
1.8.3 - 2,3 Butanodiol	30
2 - IMPORTÂNCIA MICROBIOLÓGICA PARA FORMAÇÃO DE AROMAS NOS VINHOS	31
2.1 - Vinho	31
2.2 - Composição dos vinhos	32
2.3 - Microbiologia do vinho	34
3 - CARACTERÍSTICAS DAS LEVEDURAS OBJETO DESTE ESTUDO	36
3.1 - - <i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	36
3.2 - <i>Kloeckera apiculata</i>	37
3.3 - <i>Hansenula anomala</i>	38
3.4 - Acetoína produzida nos vinhos por diferentes espécies de leveduras	38
3.5 - Fatores que afetam o crescimento celular	40
3.5.1 - Vitaminas exógenas requeridas	40
3.5.2 - Assimilação de carbonos	40

3.5.3 - Concentração de glicose	41
3.5.4 - Temperatura	41
<b>CAPÍTULO II - MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>45</b>
1 - MICRORGANISMOS	45
2 - MEIOS DE CULTURA	45
2.1 - Meio de manutenção	45
2.2 - Preparo do inóculo	46
3 - CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO	47
3.1 - Ensaio preliminares em tubos de ensaio para avaliação do pH, temperatura e concentração do etanol sobre o crescimento celular	47
3.2 - Ensaio realizados em frascos agitados	49
3.3 - Ensaio realizados em fermentador	50
4 - MÉTODOS ANALÍTICOS	53
4.1 - Amostragem	53
4.2 - Determinação da concentração celular	53
4.3 - Dosagem de glicose	56
4.4 - Determinação da concentração de etanol e acetato de etila	57
4.5 - Determinação da concentração de acetoína	59
5 - METODOLOGIA UTILIZADA NOS CÁLCULOS	61
5.1 - Fatores de conversão	61
5.2 - Produtividade máxima	61

5.3 - Velocidades instantâneas e específicas	62
<b>III - RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>65</b>
1 - ENSAIOS PRELIMINARES EM TUBOS DE ENSAIO	65
1.1 - Influência da concentração de etanol e pH sobre o crescimento celular	66
1.2 - Influência da temperatura sobre o crescimento celular	68
2 - ENSAIOS EM FRASCOS AGITADOS	70
2.1 - Influência do pH inicial no crescimento celular	70
2.2 - Evolução do pH	72
3 - ENSAIOS EM FERMENTADOR	74
3.1 - Influência da concentração inicial de substrato sobre o crescimento celular	74
3.2 - Efeito da concentração inicial de glicose na produção de acetoína	80
3.3 - Cinética de crescimento e produção de acetoína a 40 g/L de glicose inicial	82
3.4 - Produção de etanol e acetato de etila	87
3.5 - Influência da sacarose e glicose na produção de acetoína	90
<b>IV - CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b>	<b>93</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>96</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>105</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b>	Esquema da biossíntese de acetoina pelas leveduras..	<b>23</b>
<b>FIGURA 2</b>	Esquema da montagem do experimento de avaliação do efeito da concentração de etanol sobre o crescimento celular nas temperaturas estudadas..	<b>49</b>
<b>FIGURA 3</b>	Fermentador “New Brunswick” com seus acessórios, o cromatógrafo em fase gasosa - CG Instrumentos Científicos e microcomputador, onde é realizada a integração das análises cromatográficas.	<b>52</b>
<b>FIGURA 4</b>	Curva de calibração da biomassa para <i>Hanseniaspora guilliermondii</i> .	<b>55</b>
<b>FIGURA 5</b>	Cromatograma do padrão de acetoina (300mg.L <sup>-1</sup> ).	<b>60</b>
<b>FIGURA 6</b>	Influência do pH e da concentração de etanol sobre o crescimento celular de <i>Hansenula anomala</i> à temperatura de 10 <sup>0</sup> C.	<b>66</b>
<b>FIGURA 7</b>	Influência do pH e da concentração de etanol sobre o crescimento celular para <i>Hanseniaspora guilliermondii</i> à temperatura de 10 <sup>0</sup> C.	<b>67</b>
<b>FIGURA 8</b>	Influência do pH e da concentração de etanol sobre o crescimento celular para <i>Kloeckera apiculata</i> à temperatura de 10 <sup>0</sup> C.	<b>67</b>
<b>FIGURA 9</b>	Influência da temperatura no crescimento das leveduras em meio contendo 3% de etanol, pH inicial 5,0 e S <sub>i</sub> =15 g.L <sup>-1</sup> no período de 5 dias.	<b>69</b>
<b>FIGURA 10</b>	Influência do pH sobre o fator de conversão de substrato em células para as três leveduras do vinho, à concentração inicial de glicose de 15 g.L <sup>-1</sup> .	<b>70</b>
<b>FIGURA 11</b>	Influência do pH sobre o fator de conversão de substrato em células para as três leveduras do vinho, à concentração inicial de glicose de 20 g.L <sup>-1</sup> .	<b>71</b>
<b>FIGURA 12</b>	Evolução do pH inicial 5,5 em função do tempo em meio contendo 20 g.L <sup>-1</sup> de concentração inicial de glicose para as três leveduras mantidas à temperatura de 30 <sup>0</sup> C.	<b>72</b>

- FIGURA 13** Cinética de crescimento da *H'spora guilliermondii* em meio YM contendo uma concentração inicial de glicose de 15 g.L<sup>-1</sup> e a 30<sup>0</sup> C. 75
- FIGURA 14** Cinética de crescimento da *H. anomala* em meio YM contendo uma concentração inicial de glicose de 15 g.L<sup>-1</sup> e a 30<sup>0</sup> C. 75
- FIGURA 15** Cinética de crescimento da *Kl. apiculata* em meio YM contendo uma concentração inicial de glicose de 15 g.L<sup>-1</sup> e a 30<sup>0</sup> C.. 76
- FIGURA 16** Cinética de crescimento da *H'spora guilliermondii* em meio YM a 30<sup>0</sup>C numa concentração inicial de glicose de 20 g.L<sup>-1</sup>. 77
- FIGURA 17** Cinética de crescimento da *Kl. apiculata* em meio YM a 30<sup>0</sup>C numa concentração inicial de glicose de 20 g.L<sup>-1</sup>. 77
- FIGURA 18** Cinética de crescimento da *H. anomala* em meio YM a 30<sup>0</sup>C numa concentração inicial de glicose de 20 g.L<sup>-1</sup>.. 78
- FIGURA 19** Velocidade específica máxima de crescimento e fator de conversão substrato em células em função de diferentes concentrações iniciais de glicose. 79
- FIGURA 20** Evolução da concentração de acetoína em função do tempo para as espécies estudadas à temperatura de 30<sup>0</sup>C e concentração inicial de glicose de 40 g.L<sup>-1</sup>. Agitação de 500 rpm e vazão de ar de 1,5 vvm. 81
- FIGURA 21** Cinética de crescimento da *H'spora guilliermondii* em meio YM com 40 g.L<sup>-1</sup> de glicose inicial a 30<sup>0</sup>C. 82
- FIGURA 22** Cinética de crescimento da *Kl. apiculata* em meio YM com 40 g.L<sup>-1</sup> de glicose inicial a 30<sup>0</sup>C. 84
- FIGURA 23** Produtividade em acetoína , em função do tempo, para as leveduras *H'spora guilliermondii* e *Kl. apiculata*. 85
- FIGURA 24** Etanol formado pelas leveduras (S<sub>i</sub>= 40 g.L<sup>-1</sup>, pH=5,5, temperatura de 30<sup>0</sup>C).. 88
- FIGURA 25** Produção de acetato de etila pelas três leveduras (S<sub>i</sub>=40 g/L; pH=5,5; temperatura de 30<sup>0</sup>C). 89

- FIGURA 26** Cinética de crescimento da *H'spora guilliermondii* em batelada à concentração inicial de substrato de 100 g/L (glicose e sacarose) à temperatura de 30<sup>0</sup>C, pH 5,5, 500 rpm de agitação e 1,5 vvm de vazão de ar. 90
- FIGURA 27** Curva de calibração para *Hansenula anomala*. 107
- FIGURA 28** Curva de calibração para *Kloeckera apiculata*. 107
- FIGURA 29** Curva de calibração do Acetato de etila. 108
- FIGURA 30** Curva de calibração do etanol. 108
- FIGURA 31** Curva de calibração da Acetoína. 108
- FIGURA 32** Velocidade específica máxima para *Hanseniaspora guilliermondii*. Glicose = 15 g.L<sup>-1</sup>;  $\mu_{\max}$  = 0,72. 109
- FIGURA 33** Velocidade específica máxima para *Hansenula anomala* . Glicose = 15 g.L<sup>-1</sup>;  $\mu_{\max}$  = 0,77. 109
- FIGURA 34** Velocidade específica máxima para *Kloeckera apiculata*. Glicose = 15 g.L<sup>-1</sup>;  $\mu_{\max}$  = 0,69. 109
- FIGURA 35** Velocidade específica máxima para *Kloeckera apiculata*. Glicose = 20 g.L<sup>-1</sup>;  $\mu_{\max}$  = 0,51. 109
- FIGURA 36** Velocidade específica máxima para *Hanseniaspora guilliermondii*. Glicose = 20 g.L<sup>-1</sup>;  $\mu_{\max}$  = 0,52. 110
- FIGURA 37** Velocidade específica máxima para *Hanseniaspora guilliermondii*. Glicose = 40 g/L;  $\mu_{\max}$  = 0,44. 110
- FIGURA 38** Velocidade específica máxima para *Hanseniaspora guilliermondii*. Glicose = 100 g.L<sup>-1</sup>;  $\mu_{\max}$  = 0,33. 110
- FIGURA 39** Velocidade específica máxima para *Hansenula anomala*. Glicose = 40 g.L<sup>-1</sup>;  $\mu_{\max}$  = 0,47. 110
- FIGURA 40** Velocidade específica máxima para *Kl. apiculata* Substrato = 40 g.L<sup>-1</sup>;  $\mu_{\max}$  = 0,34. 111

**LISTA DE TABELAS**

<b>TABELA 1</b>	Lista de microrganismos produtores de acetoína e/ou diacetil.	<b>28</b>
<b>TABELA 2</b>	Leveduras produtoras de acetoína.	<b>39</b>
<b>TABELA 3</b>	Vitaminas requeridas pelas leveduras.	<b>40</b>
<b>TABELA 4</b>	Principais fontes de carbono assimiláveis.	<b>41</b>
<b>TABELA 5</b>	Efeito da temperatura na formação de produtos secundários pelas leveduras do vinho.	<b>42</b>
<b>TABELA 6</b>	Composição dos meios de cultura utilizados nos experimentos em frascos agitados.	<b>50</b>
<b>TABELA 7</b>	Procedimento de determinação da glicose.	<b>57</b>
<b>TABELA 8</b>	Resumo dos principais parâmetros cinéticos para as três leveduras, à temperatura de 30 <sup>0</sup> C, pH 5,5 nas concentrações iniciais de glicose de 15, 20 e 40 g/L.	<b>79</b>
<b>TABELA 9</b>	Parâmetros cinéticos para as duas leveduras apiculadas do vinho na concentração inicial de glicose de 40 g/L, pH 5,5, temperatura de 30 <sup>0</sup> C e vazão de ar de 1,5 vvm.	<b>86</b>

## NOMENCLATURA

<b>abs</b>	Absorbância
<b>ACET</b>	Acetato de Etila
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection (EUA)
<b>BP</b>	Bacto Peptone (Bacto peptona)
<b>CCT</b>	Coleção de Culturas Tropical da Fundação “André Tosello”.
<b>DCU</b>	Unidade de Controle do Fermentador
<b>ETOH</b>	Etanol (g/L)
<b>FDA</b>	Food and Drug Administratios (EUA)
<b>GRAS</b>	Generally Recognized as Safe
<b>HPLC</b>	Hight Performance Liquid Cromatography
<b>m.s.</b>	Matéria Seca
<b>ppm</b>	Partes por Milhão
<b>P<sub>ACET</sub></b>	Produtividade em Acetoína (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
<b>P<sub>ETOH</sub></b>	Produtividade em Etanol (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
<b>P<sub>ETILA</sub></b>	Produtividade em Acetato de Etila (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
<b>P<sub>max</sub></b>	Valores Máximos de Concentração (g/L ou mg/L)
<b>P<sub>X</sub></b>	Produtividade em Células (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
<b>q<sub>p</sub></b>	Velocidade Específica de Formação de Produto (g.g <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )

<b><math>q_s</math></b>	Velocidade Específica de Consumo de Substrato ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )
<b><math>r</math></b>	Coefficiente de correlação Linear
<b><math>\text{rpm}</math></b>	Rotações Por Minuto
<b><math>S</math></b>	Concentração de Substrato ( $\text{g/L}$ )
<b><math>S_0</math></b>	Concentração Inicial do Substrato
<b><math>S_i</math></b>	Concentração Inicial do Substrato
<b><math>S_f</math></b>	Concentração Final de Substrato ( $\text{g/L}$ )
<b><math>t</math></b>	Tempo (h)
<b><math>\text{vvm}</math></b>	Volume de Ar por Volume de Meio por Minuto
<b><math>X</math></b>	Concentração Celular ( $\text{g/L}$ )
<b><math>X_0</math></b>	Concentração Inicial de Células ( $\text{g/L}$ )
<b><math>X_f</math></b>	Concentração Final de Células ( $\text{g/L}$ )
<b><math>X_{\text{max}}</math></b>	Concentração Máxima de Células ( $\text{g/L}$ )
<b><math>\text{YE}</math></b>	Yeast Extract (extrato de levedura)
<b><math>\text{YMA}</math></b>	Yeast Malt Extract Ágar ( ágar extrato de malte e levedura)
<b><math>Y_{P/S}</math></b>	Fator de Conversão de Substrato em Produto (g de células/ g de produto)
<b><math>Y_{X/S}</math></b>	Fator de Conversão de Substrato em Célula (g de células/ g de substrato)
<b><math>\lambda</math></b>	Comprimento de Onda (nm)
<b><math>\mu</math></b>	Velocidade Específica de Crescimento ( $\text{h}^{-1}$ )
<b><math>\mu_{\text{max}}</math></b>	Velocidade Específica Máxima de Crescimento ( $\text{h}^{-1}$ )

## RESUMO

Tendo em vista a necessidade de novos produtos naturais na indústria alimentícia e o custo de produtos de alto valor agregado, diversos grupos de pesquisa vêm se dedicando a investigar bioprocessos capazes de produzir compostos naturais de interesse comercial. Os aromas alimentares podem ser obtidos através de processos sintéticos (química fina), originários de microrganismos ou metabólitos de plantas, ou ainda menos extensamente do metabolismo animal. Os produtos da química fina importados pelo Brasil representam anualmente um montante de 2 bilhões de dólares. Deste montante, o setor de aditivos para alimentos e cosméticos deve representar aproximadamente 100 milhões de dólares anuais, o que indica a sua importância econômica. O aroma sintético derivado da petroquímica ou outra natureza química, está sendo substituído gradativamente pelo de origem enzimática ou de fermentação de microrganismos. Isto deve-se tanto às novas exigências do consumidor como também ao fato de que os flavorizantes e aromatizantes sintéticos são artificiais, enquanto os obtidos por processos biotecnológicos são tidos como “naturais” (Generally Recognized As Safe - GRAS). Esta regulamentação abriu oportunidades ainda maiores para que novas pesquisas sejam realizadas neste setor biotecnológico. O presente trabalho teve como objetivo estudar a cinética de crescimento e produção de aromas alimentares (principalmente acetoína) de três espécies de leveduras do vinho, *Hanseniaspora guilliermondii* (CCT 3800), *Kloeckera apiculata* (CCT0774) e *Hansenula anomala* (CCT2648) em diferentes condições de cultivo. A temperatura, o pH e a concentração inicial de substrato foram os parâmetros estudados. Os resultados mostraram que a temperatura e o pH ótimo de crescimento das leveduras estudadas foram semelhantes entre si e equivalentes a 20°C e 5,5, respectivamente. A concentração de substrato (glicose) foi estudada nas concentrações que variaram entre 10 e 40 g.L<sup>-1</sup>. A evolução do pH nas condições de cultivo foi espontânea e a temperatura, controlada. *Hansenula anomala* (CCT2648) foi a levedura que apresentou a maior velocidade específica máxima de crescimento, na ordem de 0,77 h<sup>-1</sup> quando a concentração inicial de glicose foi 15g.L<sup>-1</sup> a um pH de 5,5 e uma temperatura de 30°C em meio complexo. Esta cepa mostrou-se também como a maior produtora de acetato de etila, com uma concentração final no meio de 3,6 g.L<sup>-1</sup> quando a concentração de substrato foi de 40 g.L<sup>-1</sup>, como previamente descrito em relatos bibliográficos. Por outro lado, não produziu acetoína nem diacetil nas condições de cultivo utilizadas. *Kloeckera apiculata* (CCT 0774) teve a menor velocidade específica máxima de crescimento, na ordem de 0,69 h<sup>-1</sup> na mesma concentração de substrato (15 g.L<sup>-1</sup>), temperatura e pH das outras duas leveduras. Foi detectado níveis de acetoína na ordem de 270 mg.L<sup>-1</sup> quando 40 g.L<sup>-1</sup> de glicose foram utilizados como substrato. *Hanseniaspora guilliermondii* (CCT 3800) apresentou concentrações de acetoína mais altas que as relatadas na bibliografia, 334 g.L<sup>-1</sup> desfavorecendo a sua utilização na elaboração dos vinhos.

## ABSTRACT

Having in mind the necessity of new natural products in the food industry and the cost of high value added products, several research groups are investing their time on investigations of bioprocesses able to manufacture commercial natural compounds. The food aroma can be obtained through synthetic processes (fine chemistry) from microorganisms or plants metabolites, or even less extensively from animal metabolism. The imported fine chemistry products that Brazil imports, represents 2 billion dollars yearly. From that amount, the sector of additives for food and cosmetics represents close to 100 million dollars yearly which shows its economical importance. The synthetic aroma from Petrochemistry or other chemical nature, is being substituted by the enzymatic origin or microorganisms fermentation. This is due to the new consumer requirements as well as because of the synthetic flavorings and aromatizing are artificial, while the ones originated from biotechnological processes are considered as "natural" (GRAS). This role has created opportunities even wider for the new researches being realized on this field. Based on this, the present work had the objective of studying the kinetic growing of three wine yeasts *Hanseniaspora guilliermondii* (CCT3800), *Kloeckera apiculata* (CCT0774) e *Hansenula anomala* (CCT2648) capable of producing aromas for food sector interest. Temperature, pH and initial concentration of the substrate were the parameters studied. Besides, some volatile compounds were also determined. The optimized temperature and pH for growing the studied yeast were similar among themselves, 20°C e 5,5 respectively. The substrate concentration (glucose) was studied on concentrations from 10 g/L to 40 g/L. The evolution of pH on the culture conditions were spontaneous and the temperature controlled. *Hansenula anomala* (CCT 2648) was the yeast which showed the greatest specific maximum growing speed, in the order of 0,77 h<sup>-1</sup> when the initial glucose concentration was 15 g/L and the pH approximately 5,5, and temperature of 30°C on a synthetic environment. This species has showed itself also the greatest producer of ethyl acetate, approximately 3,6 g/L when the concentration of the substrate was 40 g/L as related previously on the bibliography references. On the other side, it hasn't produced acetoin neither diacetyl on the culture conditions utilized. *Kloeckera apiculata* (CCT 0774) had the lowest specific maximum growing speed, in the order of 0,69 h<sup>-1</sup>, in the same concentration of the substrate (15 g/L), temperature and pH of the other two yeasts *Hansenula anomala* e *Hanseniaspora guilliermondii*. Were detected, ethanol levels, ethyl acetate and acetoin in order of 334 e 277 g/L, respectively. *Hanseniaspora guilliermondii* (CCT3800) has presented concentrations of acetoin higher than the related on the bibliography, not indicating it on the wine manufacture.

# ***INTRODUÇÃO***

## INTRODUÇÃO

Os aromas são aditivos indispensáveis usados nas indústrias de alimentos, farmacêutica, de cosméticos e de cigarros. Os aromas alimentares, juntamente com o aspecto e a textura, têm um papel importante no sentido atrativo dos produtos. Embora adicionados em pequenas quantidades e de serem isentos de qualquer interesse nutricional, a aromatização serve exclusivamente para realçar ou melhorar o gosto dos alimentos, conferindo a estes um sabor característico.

O flavor das bebidas alcoólicas é produzido por um grande número de compostos. Dentre eles, a acetoína é importante por causa do seu envolvimento com o buquê do vinho, e é um componente chave na biossíntese de diacetil e 2,3 butanodiol. Esta cumpre um importante papel como potencializador de aromas nas concentrações que podem variar entre 8 a 40 mg.L<sup>-1</sup> (ROMANO *et al.*, 1997). O diacetil cria um flavor não muito bom nas bebidas alcoólicas, tem odor característico e é detectável nos vinhos a baixos níveis (entre 2 a 4 ppm). Por outro lado, o diacetil é um composto importante, por produzir o aroma da manteiga e é derivado da acetoína por oxidação (BERGER, 1995). O 2,3 butanodiol (também formado pela redução da acetoína) é inodoro, e apesar de ser ligeiramente doce, não influencia muito o flavor e o sabor do vinho porém, é o segundo composto neutro mais importante deste, após o glicerol. Sua importância está relacionada ao extrato seco do vinho e é encontrado nas concentrações entre 0,2 a 3 g.L<sup>-1</sup> (HEROLD *et al.*, 1995).

A acetoína é produzida por via sintética a partir do diacetil por redução parcial, ou por ação microbiana, formada durante a fermentação das leveduras a partir de uma fonte de açúcar. É

um produto normal da fermentação alcoólica, e seu conteúdo no vinho pode ser originado por diferentes origens: pelas leveduras durante a fermentação alcoólica, ou por bactérias durante a fermentação malolática (ROMANO e SUZZI, 1996).

Os aromas sintéticos derivados da petroquímica ou outra natureza química, estão sendo substituídos gradativamente pelos de origem enzimática ou fermentação de microrganismos. Isto deve-se tanto às novas exigências do consumidor como também pelo fato de que os flavorizantes e aromatizantes sintéticos são artificiais, enquanto os obtidos por processos biotecnológicos são tidos como “naturais”.

Tendo em vista a necessidade de novos produtos naturais na indústria alimentícia e o custo de extração e purificação destes produtos, diversos grupos de pesquisa vêm se dedicando a investigar bioprocessos capazes de produzir compostos naturais de interesse comercial. A iniciativa da realização deste estudo partiu deste fato. O objetivo deste trabalho é estudar a cinética de crescimento e produção de aromas alimentares (principalmente acetoína) de três espécies de leveduras do vinho, em diferentes condições de cultivo, utilizando para isto meio complexo.

Poucos são os estudos em relação à produção de acetoína por espécies individuais durante os processos fermentativos. Através de estudos bibliográficos, encontrou-se bactérias dos gêneros *Lactococcus diacetylactis*, *Lactococcus lactis lactis*, *Lactobacillus casei* etc. (MOLINARI *et al.*, 1995) e leveduras apiculadas do vinho especificamente *Hanseniaspora guilliermondii* e *Kloeckera apiculata* (ROMANO *et al.*, 1992, 1993, 1996). Optou-se pelas leveduras, principalmente pelo fato de serem microrganismos eucariotos e portanto, possuírem uma maior

maquinaria enzimática. Além disto, graças aos avanços tecnológicos através de manipulações genéticas, a produção de aromas de interesse comercial poderá ser otimizada. Paralelamente, foi escolhida a levedura *Hansenula anomala*, também presente no mosto da uva, responsável pela formação de grande quantidade de ésteres e etil acetato, outros compostos de interesse (PASTORE *et al.*, 1994).

No Capítulo I deste trabalho, foi realizada a revisão bibliográfica apresentando-se as razões pelas quais foram escolhidos os microrganismos, suas características fisiológicas e morfológicas, bem como as principais vias metabólicas utilizadas pelos mesmos. Para um melhor entendimento das necessidades fisiológicas destas leveduras, foi realizado um estudo da composição físico-química dos vinhos. A seguir, são apresentados os principais aromas de interesse neste estudo, sua utilização e os principais microrganismos produtores destes compostos.

No Capítulo II foram descritos o material, os equipamentos, os microrganismos e o meio de cultura utilizados para a realização das fermentações. São relatados, também, os métodos analíticos usados na determinação da concentração de biomassa, glicose, etanol, acetato de etila, diacetil e acetoína.

No capítulo III são apresentados os principais resultados obtidos nesta pesquisa. Apresenta-se os resultados de experimentos realizados em tubos de ensaio, frascos agitados e fermentador de bancada.

Finalmente no Capítulo IV, as conclusões finais do trabalho e as sugestões para futuros trabalhos são relatadas.

## ***CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA***

# CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 1 - Aromas

### 1.1 - Terminologia

O sabor de um 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 certas dúvidas. Para isso, é preciso definir alguns termos empregados.

**Flavorizantes** são substâncias químicas ou misturas acrescentadas a um alimento ou medicamento para suplementar ou modificar seu “flavor” próprio ou para mascarar o original. “Flavor” é uma sensação complexa, é a integração da sensação de odor, gosto, textura, etc. (OSOL e HOOVER, 1975). A International Flavors Fragancias (ANONYME, 1997) consideram o termo flavorizante, como uma ou mais substâncias dotadas de propriedades organolépticas, capazes de conferir e/ou acentuar o sabor dos alimentos considerando como sinônimos: aroma, flavor e aromatizante.

**Sabor** é o conjunto de sensações decorrentes do contato de um alimento com estruturas sensoriais da boca e do nariz. Sinônimos: paladar e gosto (OSOL e HOOVER, 1975).

**Essência**, atualmente em desuso na indústria alimentícia, é mais aplicada a preparações destinadas a conferir odor a produtos não comestíveis, tais como detergentes, cosméticos, sabonetes, etc. (ANONYME, 1997).

## 1.2 -Histórico

O uso de flavorizantes remonta à Antigüidade; possivelmente, até mesmo o homem das cavernas deve ter notado a diferença de odor e paladar quando cozia a carne sobre diferentes variedades de madeira.

O comércio das especiarias teve importante papel na História Universal. Foi na Idade Média que se desenvolveu o uso de ervas flavorizantes, e eram cultivadas em casa. Como estas eram consideradas naquele tempo possuidoras de poderes mágicos, passaram para o domínio do médico, farmacêutico e do alquimista, desenvolvendo assim a indústria de flavorizantes, e que atualmente é uma das mais complexas, produzindo-se substâncias sintéticas, algumas das quais nunca encontradas na natureza (FRAZIER e WHESTOFF, 1979).

Os compostos do “flavor” podem ser divididos de acordo com o critério mais comum em naturais e artificiais. O preço, a eficácia e o tipo do produto final determinam a seleção do agente flavorizante (SIMÃO, 1985).

Os produtos naturais (óleos essenciais, extratos, óleos, resinas) variam dependendo do clima, fertilizantes e área de crescimento. Problemas políticos podem reduzir a colheita ou

impedir a importação (mentol não podia ser importado da China Comunista durante um certo tempo). Estes e outros problemas levaram o “flavorista” a usar o flavorizante sintético. Estes, embora sob o ponto de vista tecnológico, ofereçam vantagens como estabilidade, reprodutibilidade e comparavelmente baixo custo se comparados aos aromas naturais (OSOL e HOOVER, 1975). O Federal Food Drug and Cosmetic Act ( novembro de 1966), regulamentado pela FDA (Food and Drug Administration) no parágrafo 121.1164 declara que as substâncias flavorizantes sintéticas e adjuvantes podem ser usadas em alimentos quando sujeitas às seguintes condições:

1. Usadas em quantidades mínimas requeridas para produzir efeito pretendido e de acordo como todos os princípios da boa prática de manufatura.
2. Ingredientes flavorizantes sintéticos constituem-se de uma ou mais formas apropriadas, usadas sozinhas ou em combinação geralmente reconhecidas como seguras e previamente autorizadas para uso em alimentos (BERGER, 1995).

Do ponto de vista da Saúde Pública, seria muito mais recomendável que se usassem em alimentos os flavorizantes naturais e não os artificiais que são causadores de um modo geral de moléstias alérgicas, além de não apresentarem valor alimentício (vitaminas, aminoácidos, etc.) (SIMÃO, 1985).

### **1.3 - Definição**

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 um odor e/ou um sabor (MOLL E MOLL, 1990, citado por FABRE, 1996). Não devem ser consumidas tal qual (IOFI - International Organization of the Flavor Industry, 1978).

Segundo a Legislação Brasileira (Resolução 22/76 da CNNPA do MS 1976): “Aromatizante é uma substância ou mistura de substâncias de propriedades odoríferas e/ou sápidas, capaz de conferir ou intensificar o aroma e/ou sabor dos alimentos, incluídas as bebidas. Excluem-se desta definição os produtos que apresentam apenas sabor doce, salgado ou ácido” (SIMÃO, 1985).

#### **1.4 - Aplicações**

Devido a suas propriedades olfativas e gustativas bem definidas, os aromas são aditivos indispensáveis usados nas Indústrias de Alimentos, Farmacêutica, de Cosméticos e de Cigarros. Os aromas alimentares, juntamente com o aspecto e a textura, têm um papel importante no sentido atrativo dos produtos. Embora adicionados em pequenas quantidades e de serem isentos de qualquer interesse nutricional, a aromatização serve exclusivamente para realçar ou melhorar o gosto dos alimentos, conferindo a estes um sabor característico (MAYER, 1991, citado por FABRE, 1996).

Também de grande importância é o interesse dos consumidores por alimentos do tipo *light* ou dietéticos. Os aromatizantes aqui oferecem infindáveis opções para realce do sabor e odor dos alimentos formulados com níveis muito reduzidos de ingredientes agradáveis ao paladar (gorduras, sais, açúcar) (ANONYME, 1997).

Os aromas representam ainda para o industrial a vantagem de reduzir a dependência para com a produção agrícola: com efeito, o abastecimento de produtos frescos está sujeito a variações de caráter qualitativo e quantitativo de um ano a outro e pode mesmo ser totalmente escasso em razão a catástrofes naturais (ETIEVANT *et al.*, 1991, citado por FABRE, 1996). Além disso, o poder aromático de substâncias concentradas, bem mais acentuado que o da matéria fresca, é conhecido e controlado. Disponíveis todo o ano, estes aromas possuem uma qualidade organoléptica que pouco varia como o tempo, ao passo que as substâncias vegetais ou animais estão sujeitas a parâmetros tais como a variedade, a natureza do solo, o clima; enfim, eles oferecem a vantagem de estarem acondicionados sob a forma de pó ou líquido, o que os torna bem mais fáceis de usar ou estocar (FABRE, 1996).

## **1.5 - Classificação**

De acordo com a Legislação Brasileira (ANONYME, 1997) os aromatizantes podem ser classificados como:

### **1.5.1 Aroma artificial**

Aquele em cuja elaboração foi utilizada:

- Substância aromatizante artificial (substância quimicamente definida, obtida por síntese ou outro processo químico adequado e que ainda não foi encontrada na natureza, como etil vanilina, etil maltol, adicionada ou não de matéria prima aromatizante natural ( tais como ervas, frutas, especiarias etc.), produto

aromatizante natural (preparação de composição complexa, como infusões, óleos-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 da substância aromatizante natural, tais como vanilina sintética e mentol sintético.

### **1.5.2 - Aroma natural**

Aquele em cuja elaboração foi feito uso exclusivo de matéria prima aromatizante natural quimicamente definida e/ou produto aromatizante natural. É obtida a partir de matérias vegetais ou animais de uma parte por extração (processos físicos), e de outra parte, por processos biotecnológicos (enzimáticos ou microbiológicos). No primeiro caso, a extração é feita a partir de matérias primas tradicionais; no segundo caso, o desenvolvimento recente dos processos biotecnológicos permitem facilitar certas limitações ( FABRE, 1996).

### **1.6 - Aplicação da biotecnologia à produção de compostos naturais biologicamente ativos.**

Um composto é biologicamente ativo quando exerce uma ação específica sobre um determinado ser vivo, seja ele animal, vegetal ou microbiano. Uma vasta gama de compostos orgânicos naturais de origem vegetal, produtos do metabolismo primário e secundário, é biologicamente ativa, isto é, são utilizados para as mais diversas finalidades, tanto na

terapêutica médica, para prevenir ou curar doenças, como na indústria de cosméticos e de alimentos, servindo como aromatizantes, flavorizantes e antioxidantes (PLETSCH, 1998).

Com relação à produção de metabólitos secundários bioativos, a biotecnologia oferece como estratégias: os *processos fermentativos* ou *bioprocessos*, no qual o crescimento da biomassa e a formação de produtos ocorrem em bioreatores; a *micropropagação*, através da qual clones selecionados pelas suas características fenotípicas e livres de patógenos são propagados em condições assépticas e rigorosamente controladas (PLETSCH, 1998); *bioconversão*, mecanismo usado pela microbiologia industrial no qual se utiliza microrganismos para converter uma substância química em uma molécula ou uma série de moléculas homólogas; e a *engenharia genética*, que objetiva a alteração do genoma das células através da introdução de novos genes e a consequente obtenção de células, órgãos e plantas transgênicas com características bioquímicas alteradas (FABRE, 1996).

### **1.6.1 - O progresso da biotecnologia**

Graças aos progressos realizados no domínio do conhecimento e do funcionamento dos organismos vivos, o campo de ação dos processos utilizando microrganismos ou enzimas purificadas para a produção dos aromas é consideravelmente amplo. A multiplicidade das espécies naturais utilizando uma variabilidade nas condições de cultura e uma variabilidade suplementar induzida pela escolha dos processos realizados no domínio da engenharia genética permite a modificação dos sistemas biológicos ao nível molecular. Assim é possível obter-se, de uma parte os microrganismos recombinantes apresentando novas propriedades

metabólicas, e de outra parte enzimas capazes de super produzir certos aromas (LERCH e SCHILLING, 1992, citado por FABRE *et al.*, 1995).

É importante realçar que em relação à engenharia genética aplicada ao setor alimentar, somente poucas cepas são utilizadas tradicionalmente nos processos. Em consequência, o preço destes aromas são muito elevados: de 80 à 4.000 U\$ por Kg (FABRE, 1996), além do mais, os investimentos de pesquisa e desenvolvimento da mesma forma que os custos de funcionamento não são compensados pelos ganhos de produtividade, mas somente por um valor agregado subjetivo induzidos por disposições legais (TOURSEL, 1996, citado por FABRE, 1996).

### **1.6.2 - Forma de produção de aromas via processos biotecnológicos**

Os aromas produzidos por via biotecnológica são chamados também “aromas “neonaturais”, isto é, são sintetizados por um ou vários sistemas enzimáticos próximos ou idênticos à própria matéria prima vegetal (FABRE, 1996).

A via mais utilizada pelos sistemas tradicionais consiste na síntese de substâncias aromáticas por *bioprodução*. Esta se dá por via fermentativa onde a cultura microbiana pode ser melhorada pela otimização das condições de cultivo (FABRE, 1996).

Outro processo que envolve reações múltiplas é a *bioconversão*, onde a partir de sistemas enzimáticos é possível ampliar, degradar ou modificar o substrato, deste modo acrescentando ou substituindo a quimiosíntese (BERGER, 1995).

Fermentações, cultura de células vegetais ou reações enzimáticas são atualmente procedimentos biotecnológicos mais utilizados para produção de aromas.

### **1.6.3 -- Microrganismos produtores de aromas**

Os microrganismos são capazes de produzir numerosas moléculas aromatizantes e certamente eles são utilizados para este fim nas indústrias agroalimentares. A linhagem utilizada provém do ecossistema natural ou de coleções de culturas microbianas. Os mutantes obtidos pela maneira clássica de seleção ou mesmo de cepas transformadas pela engenharia genética são seguidamente preferidas às cepas selvagens pela sua melhor produtividade (FABRE, 1996).

Dentre os microrganismos produtores de aromas estão as bactérias, os fungos filamentosos e as leveduras. As bactérias e as leveduras são, há muito tempo, conhecidas pela síntese de aromas que podem ocorrer de duas formas diferentes; a primeira corresponde à biossíntese de aromas a partir de substratos metabolizáveis, a segunda à bioconversão a partir de precursores particulados adicionados ao meio de cultura.

Entre as cinco classes de fungos existentes que são os ficomicetos, zigomicetos, ascomicetos, basideomicetos e deuteromicetos, os mais estudados para a produção de aromas são os basideomicetos. Com cerca de 25.000 espécies, os basideomicetos formam um grupo importante e são considerados como os mais evoluídos de todos, sendo também os mais conhecidos devido ao seu tamanho macroscópico e o seu interesse no meio alimentar. Suas enzimas são muito utilizadas nos processos de bioconversão (FABRE, 1996).

As bactérias e as leveduras apresentam vantagens consideráveis em relação aos fungos filamentosos, tais como: fácil tecnologia, conhecimento biológico mais aprofundado e diversas intervenções genéticas realizadas com estes microrganismos (GROSS e ASTHER, 1989).

No que concerne à capacidade destes microrganismos de produzir aromas, as concentrações obtidas são baixas, e portanto é indispensável que se faça uso do melhoramento da cepa mutagênica afim de aumentar a produtividade (FABRE, 1996).

#### **1.6.4 - Estudos genéticos para produção de aromas**

Pouco se sabe sobre o caráter genético que envolve a produção de acetoína com relação a leveduras que participam da elaboração do vinho. O que se sabe sobre este assunto, diz respeito a leveduras de cervejaria. Estudos genéticos têm abordado particularmente o uso de linhagens com capacidade reduzida de síntese de compostos indesejáveis na cerveja, tais como diacetil e 2,3 pentanodiona. Estas linhagens são obtidas por seleção ou alteração na sua bagagem genética (GALVAN *et al.*, 1987).

Na tentativa de resolver o problema diacetil, estudos que envolvem o gene ILV (isoleucina/valina/leucina) foram realizados. Sabe-se que a atividade da isomero-redutase (ILV5) resulta no acúmulo dos precursores de compostos dicetônicos. A ampliação do ILV5 resultou num decréscimo de 70-80% nos níveis totais de compostos dicetônicos sem qualquer alteração no perfil organoléptico. Decréscimo nos teores totais de diacetil foi obtido com uma linhagem de levedura de cervejaria possuidora do gene de *Klebsiella terrigenis*

responsável pela formação da enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase. Esta enzima catalisa a formação direta do ácido acetoláctico em acetoína (ROMANO *et al.*, 1996).

### 1.7 - Mercado nacional e internacional

O preço dos produtos produzidos por via biotecnológica ainda não se justifica para alguns álcoois e cetonas que são sintetizados com relativa facilidade a partir de hidrocarbonetos. No entanto, o fato das matérias primas derivadas do petróleo estarem sendo gradativamente substituídas em alimentos, cosméticos etc. por matérias primas “naturais”, sugere o desenvolvimento de produção. Os processos biotecnológicos em geral são menos agressivos ao meio ambiente que seus similares sintéticos (BERGER, 1995).

Os aromas alimentares podem ser obtidos através de processos sintéticos (química fina), originários de microrganismos ou metabólitos de plantas, ou ainda menos extensamente do metabolismo animal. Os produtos da química fina importados pelo Brasil representam anualmente um montante de 2 bilhões de dólares. Deste montante, o setor de aditivos para alimentos e cosméticos deve representar aproximadamente 100 milhões de dólares anuais, o que indica a sua importância econômica (VITOLLO, 1994).

Atualmente, a maior indústria de aromas e essências (International Flavors Fragrances LTDA) opera em 34 países, vendendo anualmente mais de 1,5 bilhões de dólares, sendo que 70% das vendas são realizadas fora dos Estados Unidos. Com sede no Brasil, a empresa produz aromas para alimentos, bebidas, higiene oral, fármacos e fumos, além de fragâncias, com vendas anuais acima de 85 milhões de dólares (ANONYME, 1997).

## 1.8 - Acetoína, Diacetil e 2,3 butanodiol objeto deste trabalho

O flavor das bebidas alcoólicas é produzido por um grande número de compostos. Dentre eles, a acetoína é importante por causa do seu envolvimento com o buquê do vinho, e é um componente chave na biossíntese de diacetil e 2,3 butanodiol. Esta cumpre um importante papel como potencializador de aromas nas concentrações que podem variar entre 8 a 40 mg.L<sup>-1</sup> (ROMANO *et al.*, 1997). O diacetil cria um flavor não muito bom nas bebidas alcoólicas, tem odor característico e é detectável nos vinhos a baixos níveis (entre 2 a 4 ppm). Por outro lado, o diacetil é um composto importante, por produzir o aroma da manteiga e é derivado da acetoína por oxidação. Tanto a acetoína quanto o diacetil tem características aromáticas semelhantes, mas como o diacetil é bem mais potente que a acetoína, é preferido como aditivo (BERGER, 1995). O 2,3 butanodiol (também formado pela redução da acetoína) é inodoro, e apesar de ser ligeiramente doce, não influencia muito o flavor e o sabor do vinho porém, é o segundo composto neutro mais importante deste, após o glicerol. Sua importância está relacionada ao extrato seco do vinho e é encontrado nas concentrações entre 0,2 a 3 g.L<sup>-1</sup> nos vinhos (HEROLD *et al.*, 1995).

### 1.8.1 -Diacetil

O diacetil também conhecido como 2,3 butanodiona, biacetil, dimetil dicetona, dimetil glioxal ou 2,3 dicetobutano de fórmula, C<sub>4</sub> H<sub>6</sub> O<sub>2</sub>, possui cor amarelo esverdeado, peso molecular de 86,09 e ponto de ebulição de 88<sup>o</sup>C (MERCK, 1990). É produzido por via

sintética, a partir da butanona, e por via microbiológica, principalmente por bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Bacillus*, usando como substrato a glicose e outras fontes de carbono. Além de propriedades aromáticas, também apresenta propriedades antimicrobianas (especialmente contra bactérias gram positivas e fungos) (GRANATA e MORR, 1996).

O diacetil é um composto de importância primária numa determinada proporção, sendo importante constituinte do “flavor” da manteiga, coalhada, alguns produtos lácteos e diversos produtos não lácteos como café, pães brancos, lingüiça e margarina. Porém, podem ser desagradáveis em alguns produtos como por exemplo: suco de laranja, suco de maçã, cerveja e algumas outras bebidas alcoólicas (COLLINS, 1972).

Tanto o diacetil como a acetoína são moléculas pequenas e solúveis em água (1:4 para diacetil e acetoína é livremente solúvel) podendo ser separados por ultrafiltração com filtros de pré-capa (BERGER, 1995). A presença de acetoína e diacetil nos vinhos apresenta duas razões principais de interesse: uma por influenciar e potencializar o aroma, flavor, e outra pela sua importância no ciclo metabólico, por formar 2,3 butanodiol a partir da acetoína e/ou diacetil (composto importante na relação álcool em peso/extrato seco reduzido). O diacetil é encontrado nos vinhos em concentrações de 2 – 4 ppm, e 0,25 – 0,5 ppm nos sucos de laranja, sendo seu odor bem distinto a baixas concentrações. É formado a partir da acetoína por oxidação, e é considerado como um composto aromático chave da manteiga e produtos lácteos que envolvam ação bacteriana (GUYMON e CROWELL, 1965), além de *carriers* de outros aromas, como o de vinagre e café (BERGER, 1995). Estudos bibliográficos,

encontraram níveis significativos de 2,3 - butanodiona no mel de loureiros, onde seu papel é ser carreador do aroma do mel (BERGER, 1995).

Sabe-se que nas culturas lácticas, há maior capacidade dos microrganismos produzirem mais diacetil que acetoína a partir do leite, mas não produzirem a mesma quantidade quando crescem em caldo de glicose ou lactose sem nenhum citrato ou substituto do citrato. A síntese do diacetil requer um excesso de ácido pirúvico disponível, que não seja necessário ao metabolismo do microrganismo (KANEKO *et al.*, 1991; ANTINONE *et al.*, 1994).

### **Biossíntese de diacetil** (segundo COLLINS, 1972)

Na maioria das bactérias a acetoína e o diacetil são formados a partir do piruvato e é portanto um produto do metabolismo de carboidratos. Em geral pouco ou nenhum diacetil é produzido a partir de carboidratos sem a presença de outra fonte de piruvato. Uma fonte comum é o citrato, assim metabolizado: o citrato é transportado para dentro da célula por uma permease induzível, e é quebrado em acetato e oxaloacetato, que é então descarboxilado a piruvato.

*Streptococcus diacetylactis* fermenta carboidratos a partir da via hexose difosfato (glicolítica) e ácido pirúvico, primariamente para obter energia na forma de Adenosina trifosfato (ATP), necessária para a síntese de material celular. Na glicólise (oxidação), para cada um mol de glicose, dois de piruvato são formados e dois moles de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NAD) são reduzidos. O suprimento de NAD é limitado, para cada

redução do NAD, haverá uma reoxidação, para que a oxidação da glicose possa continuar. Para reoxidação do NAD pelas bactérias, é preciso usar o ácido pirúvico como acceptor de hidrogênio e formar ácido láctico. Assim, a formação de ácido láctico é requerido para o balanço da glicólise e, a menos que outro acceptor de elétrons esteja disponível no sistema, pouco ácido pirúvico estará disponível para a síntese de diacetil e acetoína.

O microrganismo tem outra via para produção do ácido pirúvico quando o citrato está presente no meio e simultaneamente a produção de NAD é reduzida, nenhuma energia é formada, mas o citrato pode ser convertido a ácido láctico, o resultado é um excesso de ácido pirúvico para ser convertido em diacetil, acetoína e outros produtos.

### 1.8.2 - Acetoína

A acetoína, também conhecida como 3- hidroxí-2-butanona, 2,3 butanolona, acetil metil carbinol, dimetilcetol e  $\gamma$ - hidroxí- $\beta$ -oxobutano, é um líquido de odor agradável, de peso molecular 88,10, de fórmula química  $C_4 H_8 O_2$  e ponto de ebulição igual a 148<sup>0</sup>C (MERCK, 1990). Acetoína é considerada um constituinte do vinho e sua presença é significativa em relação às propriedades organolépticas de algumas bebidas. O “flavor” significativo da acetoína se dá pelo seu importante papel como potencializador de aromas, enquanto o diacetil e o 2,3 butanodiol são conhecidos por exalarem odores nas bebidas alcoólicas, que são derivados da acetoína por oxidação.

A acetoína é produzida por via sintética a partir do diacetil por redução parcial, ou por ação microbiana, formada durante a fermentação das leveduras a partir de uma fonte de açúcar.

A acetoína é um produto normal da fermentação alcoólica, e seu conteúdo no vinho pode ser originado de diferentes origens: de leveduras durante a fermentação alcoólica; pela deterioração das leveduras, de bactérias durante a fermentação malolática, e pela deterioração das bactérias (ROMANO e SUZZI, 1996). As quantidades de acetoína podem variar no vinho, em geral, os vinhos tintos mostram níveis mais elevados de acetoína que os vinhos brancos (GUYMON E CROWELL, 1965; RONKAINEN *et al.*, 1970; ROMANO *et al.*, 1996). Trabalhos recentes demonstram que estas concentrações podem atingir em torno de 100 – 200 mg.L<sup>-1</sup> deste composto nos vinhos tintos, dependendo da espécie e estirpe da levedura utilizada (ROMANO *et al.*, 1992, 1996). A acetoína contida nos vinhos doces, produzido pela adição de espíritos de vinho, pela fermentação parcial, têm valores mais elevados (50 – 200 mg.L<sup>-1</sup>) em relação ao correspondente vinho seco, onde há fermentação completa (em torno de 5 – 20 mg.L<sup>-1</sup>). Níveis significativamente elevados de acetoína foram encontrados em amostras de “sherry” (450 mg.L<sup>-1</sup>) (ROMANO e SUZZI, 1996). As leveduras apiculadas têm sua capacidade diminuída nos vinhos brancos, isto deve-se provavelmente aos baixos valores de pH destes vinhos (FLEET *et al.*, 1984).

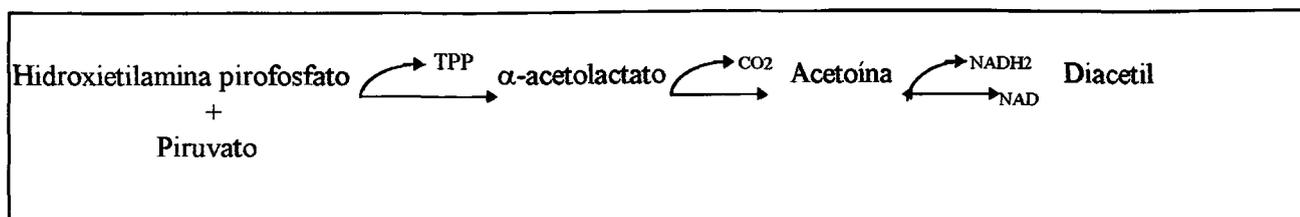
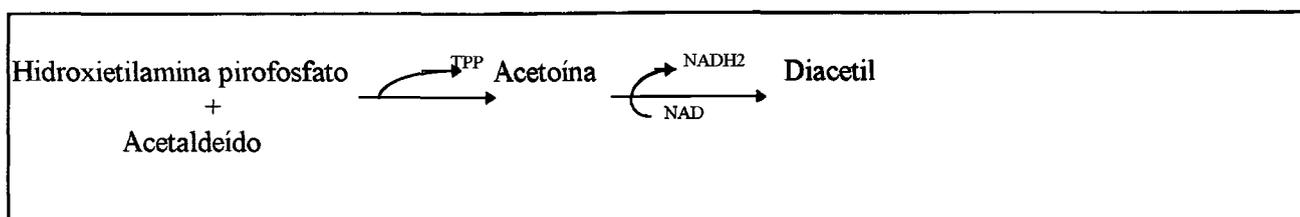
O ácido pirúvico aparece como sendo a fonte geral de acetoína e a sua conversão é derivada de enzimas produzidas por bactérias, leveduras ou células vegetais, e por conversão não enzimática catalisada a partir da tiamina. Alimentos e bebidas produzidos por ação

fermentativa das leveduras, invariavelmente também contém 2,3 butanodiol por redução da acetoína (CROWELL e GUYMON, 1963).

A acetoína é formada na fermentação bacteriana pela reação de uma molécula de ácido pirúvico e outra do complexo acetaldeído - TPP para formar o  $\alpha$ -acetolactato o qual é descarboxilado para formar acetoína. Já a formação de acetoína por ação das leveduras a partir de carboidratos, se dá a partir da condensação de uma molécula de acetaldeído com um complexo acetaldeído – enzima (tiamina pirofosfato) para formar acetoína diretamente (GUYMON e CROWELL, 1965). LEWIS e WEINHOUSE (1958), relatam que o  $\alpha$ -acetolactato é um precursor imediato tanto da acetoína em bactérias como em leveduras. OWADES *et al.* (1996), citado por ROMANO e SUZZI (1996), associam a formação de acetoína e diacetil com a biossíntese de valina durante o processo fermentativo por *S. carlsbergensis*, mostrando que a adição de valina no meio de fermentação suprime a produção de diacetil.

#### **1.8.2.1 -Biossíntese de acetoína por bactérias (segundo Collins, 1972)**

A reação chave para utilização do piruvato é a descarboxilação do piruvato a hidroxietilamina pirofosfato, chamado de Complexo - Acetaldeído - TPP. A descarboxilação do piruvato requer tiamina pirofosfato (TPP) e um metal bivalente ( $Mg^{++}$ ). Hidroxietiltiamina está envolvida em muitas reações por dois mecanismos para formação de acetoína, conforme esquema abaixo:

**Mecanismo I****Mecanismo II****1.8.2.2 -Biossíntese de acetoína por leveduras**

A acetoína é um produto secundário significativo do metabolismo dos carboidratos pelas leveduras do vinho. Ocorre só na presença de carboidratos fermentecíveis, ou do ácido pirúvico não comprometido com o metabolismo microbiano, particularmente para síntese de material celular (COLLINS, 1972).

A presença de compostos carbonila, como o diacetil e acetoína em produtos fermentados, foram inicialmente descritos como sendo produzidos por ação bacteriana. Entretanto, desde 1950, ficou esclarecido que as leveduras também produzem acetoína e diacetil (LEWIS e WEINHOUSE, 1958; JUNE, 1952, citado por COLLINS, 1972). O mecanismo de produção, contudo, foi contestado por muito tempo, até que estudos efetuados

por COLLINS (1972) e WAINWRIGHT (1973), revelaram que a biossíntese de acetoína por leveduras se dava conforme esquema abaixo:

**Via A**

ACETALDEÍDO ATIVO + PIRUVATO — ACETOLACTATO — ACETOÍNA

**Via B**

ACETALDEÍDO ATIVO + ACETIL CoA — DIACETIL — ACETOÍNA

**VIA C**

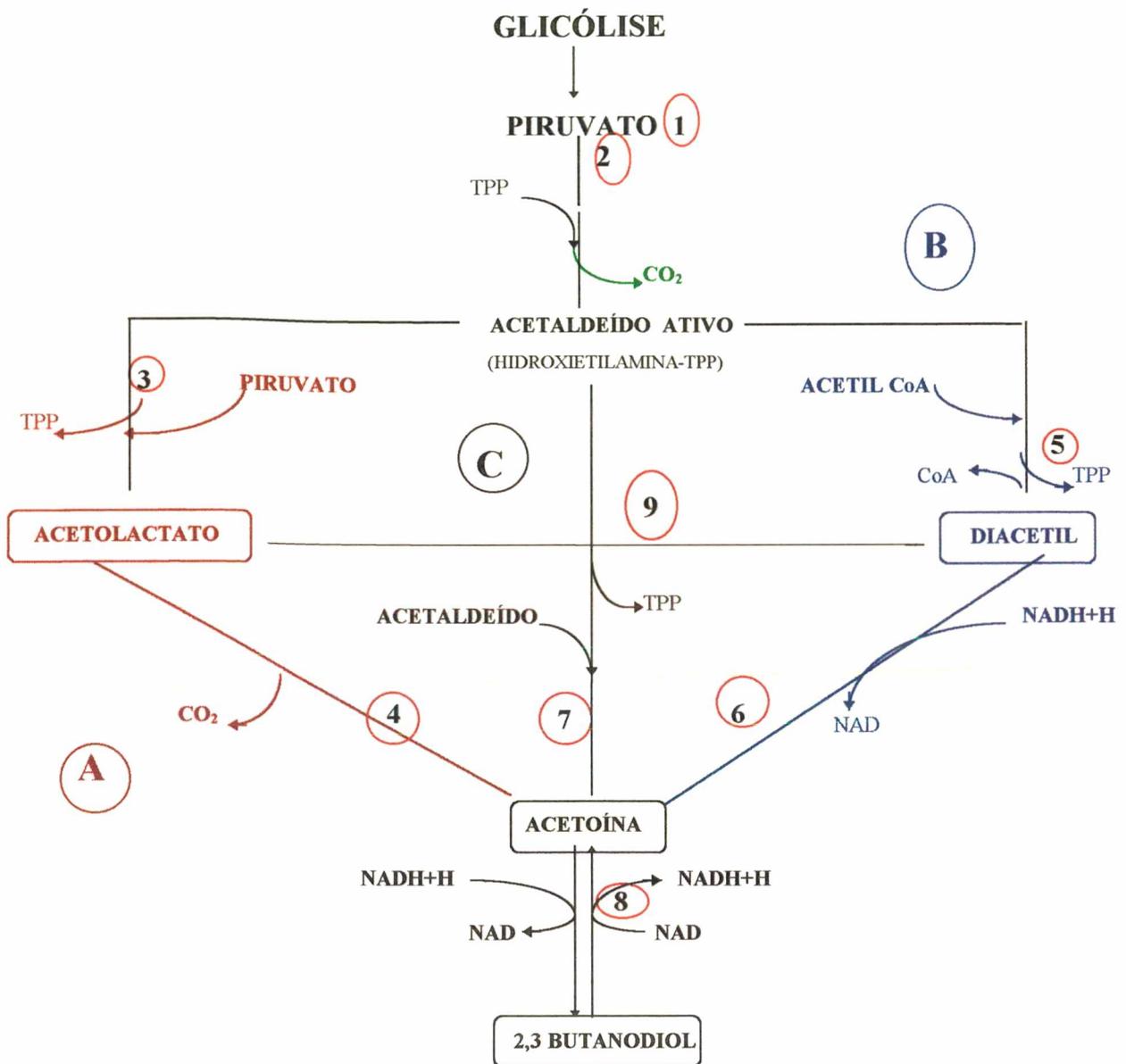
ACETALDEÍDO ATIVO + ACETALDEÍDO — ACETOÍNA

**Via Metabólica “A”**

A síntese de acetoína começa com o piruvato, que é derivado da degradação dos carboidratos. Acetaldeído ativo e piruvato são transformados em  $\alpha$ -acetolactato pela enzima ácido hidróxi sintetase. O  $\alpha$ -acetolactato pode também ser formado a partir de um sistema não enzimático a partir do piruvato e da tiamina (ROMANO e SUZZI, 1996).

De acordo com JUNE (1952), CHUANG e COLLINS (1968), citados por ROMANO e SUZZI (1996), as leveduras podem usar o  $\alpha$ -acetolactato exclusivamente para formar produtos que são importantes para o seu metabolismo, como a valina e ácido pantotênico. A adição de valina não evita a formação de acetoína por parte de *S. cerevisiae*. Isto indica que o  $\alpha$ -acetolactato não serve de intermediário para a síntese de acetoína por estes microrganismos (CHUANG e COLLINS, 1968).

O esquema da biossíntese da acetoína pelas leveduras está resumido na Figura 1.



1 - glicólise, 2- Piruvato descarboxilase, 3- Ác. Acetohidroxi sintetase, 4-  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase, 5- Diacetil sintetase, 6- Diacetil redutase, 7-Condensação acetaldeído, 8- Acetoína redutase, 9- Descarboxilação oxidativa CoA, coenzima A

**FIGURA 1 - Esquema da biossíntese de acetoina pelas leveduras (ROMANO *et al.*,1993; ROMANO e SUZZI, 1996).**

Ao contrário do que tinha sido previamente relatado, foi demonstrado que as leveduras também podem descarboxilar o  $\alpha$ -acetolactato diretamente a acetoína de forma normalmente utilizada por bactérias. Por análise radioativa, DEIANA *et al.* (1996) citado por ROMANO e SUZZI (1996), mostraram que algumas cepas de *Debaryomyces hansenii* foram capazes de formar acetoína a partir de glicose e ácido láctico, pela descarboxilação direta do  $\alpha$ -acetolactato. A acetoína produzida é afetada pelo tipo de cepa, substrato e tempo de incubação.

O  $\alpha$ -acetolactato pode ser degradado não enzimaticamente em diacetil por intermédio de uma descarboxilação oxidativa, e esta decomposição, depende das propriedades físicas das bebidas alcoólicas. A evidência concreta é que o diacetil é formado a partir do  $\alpha$ -acetolactato como um subproduto da biossíntese do ácido  $\alpha$ -oxo-isovalérico, um intermediário da biossíntese de valina, leucina e ácido pantotênico (COLLINS, 1972).

A conversão do  $\alpha$ -acetolactato em diacetil, se dá, em geral, fora da célula e por via não enzimática, necessitando ainda de provas que enzimas de leveduras ou células intactas possam catalisar tal conversão (ROMANO *et al.*, 1996).

### **Via Metabólica “B”**

Outra rota da biossíntese de acetoína nas leveduras, é a condensação do acetaldeído ativo (TPP) com acetil CoA, para formar a diacetil com a redução sucessiva a acetoína. Embora a produção de acetoína seja muito grande, algumas cepas de *S. cerevisiae* são

incapazes de produzirem diacetil por causa da ineficiência da diacetil sintetase, a enzima necessária para a reação da acetil coenzima A com o acetaldeído-TPP (COLLINS, 1972).

Diacetil redutase catalisa a redução do diacetil a acetoína, tendo o NADH como doador de elétrons, mas não consegue catalisar a reação reversa, demonstrando que a redução a diacetil por esta enzima é irreversível (ROMANO e SUZZI, 1996). Diacetil redutase é mais ativa sobre o diacetil a pH 7,0, enquanto que não é muito ativa em valores de pH baixos. Conseqüentemente, nestas condições, haverá uma menor formação de compostos menos odorizantes. A enzima é mais ativa à temperatura de 40°C para *Kluyveromyces marxianus* e *S. carlsbergensis*. A atividade da diacetil redutase tem sido detectada em *S. cerevisiae*, *S. carlsbergensis* e *Candida utilis* (COLLINS, 1972).

### **Via Metabólica “C”**

A acetoína é produzida pela condensação do acetaldeído-TPP com acetaldeído livre, sem a participação do  $\alpha$ -acetolactato. A formação de acetoína por extrato de células de leveduras é estimulada pela adição de acetaldeído. Isto indica que as leveduras formam acetoína por condensação do acetaldeído livre com o complexo acetaldeído-TPP. O mecanismo descrito por COLLINS (1972), confirma que a acetoína não pode ser oxidada a diacetil, contrariamente ao que havia sido relatado por diversos autores (ROMANO e SUZZI, 1996).

### 1.8.3.3 - Fatores que afetam a produção de acetoína pelas leveduras

#### Aeração

A acetoína (acetil metil carbinol) é encontrada normalmente a partir de determinadas fermentações do mosto da uva por leveduras em condições altamente aeradas. Condições de aeração favorecem o acúmulo de acetoína, aumentando também a formação de álcoois superiores, especialmente isobutil álcool e menos intensamente isoamil álcool (GUYMON e CROWEL, 1965).

Um meio pobre em oxigênio (0,2 mg de O<sub>2</sub>/L) induz uma formação rápida de  $\alpha$ -acetolactato e níveis máximos são obtidos por meios muito aerados (17,4 mg de O<sub>2</sub>/L). A formação de  $\alpha$ -acetolactato dependente de oxigênio está intimamente relacionada à utilização de carboidratos, aminoácidos, treonina, lisina, potássio, íons e cátions presentes no meio (BASSIT *et al.*, 1993).

#### Inóculo

A atividade metabólica das leveduras reduz rapidamente o diacetil a acetoína e este a 2,3 butanodiol. Este metabolismo rápido explica a ausência de grandes quantidades de diacetil durante a fase ativa da fermentação. Quanto mais leveduras estiverem presentes, mais rapidamente o diacetil é reduzido. Logo, uma quantidade elevada de inóculo favorece à formação de acetoína. Em trabalhos realizados por ROMANO *et al.* (1997), utilizando meio sintético para determinação dos produtos resultantes de fermentação, pelas leveduras

apiculadas do vinho, foram utilizados uma concentração de inóculo de  $5 \text{ g.L}^{-1}$  de peso seco. Nos trabalhos realizados por HAUKELI e LIE (1972), o qual estudaram o comportamento cinético de algumas linhagens de leveduras do vinho, foram utilizados uma concentração de inóculo de  $2,5 \text{ g.L}^{-1}$  de peso seco. Isto indica que a concentração de inóculo ideal está entre  $2,5$  e  $5 \text{ g.L}^{-1}$  de peso seco.

### **Concentração de glicose**

A quantidade de diacetil sintetase nas células de *S. cerevisiae* é influenciada pela idade da cultura, e pela composição do meio, especificamente a concentração de glicose. A concentração de glicose recomendada por WICKERHAM (1951), citado por ROMANO (1993) é de  $50 \text{ g.L}^{-1}$ .

### **pH**

O pH é um importante parâmetro na regulação do metabolismo microbiano para produção de 2,3 butanodiol. Condições alcalinas favorecem a produção de ácidos orgânicos enquanto a formação de acetoína e 2,3 butanodiol é privilegiada em valores de pH ligeiramente ácidos (JANSEN, 1983).

### **Temperatura**

O aumento da temperatura aumenta também a formação de subprodutos, como glicerina, acetoína, 2,3 butanodiol e acetaldeído. Para ácidos voláteis, a temperatura ideal é de  $25^{\circ} \text{C}$  (RANKINE, 1967). Para a produção de acetoína, a temperatura ideal é em torno de  $30 - 35^{\circ} \text{C}$ . A concentração de acetoína aumenta em 100% à temperatura de  $35^{\circ} \text{C}$  em relação à temperatura de  $15^{\circ} \text{C}$  (LAFON, 1955, citado por AMERINE *et al.*, 1979).

## 1.8.2.4 -Principais microrganismos produtores de acetoina e /ou diacetil.

TABELA 1 - Lista de microrganismos produtores de acetoina e/ou diacetil .

Gênero	Forma	T°C ótima*	Espécies	Produtos finais secundários	Referências bibliográficas
<i>Streptococcus</i>	Cocos	40-44°C	<i>S. thermophilus</i>	Acetaldeído Acetoina, Diacetil, etanol	BERGER, 1995.
<i>Lactobacillus</i>	Bacilos	40-44°C	<i>L. bulgaricus</i>	Acetaldeído, Acetoina, Diacetil, Etanol	GRANATA e MORR, 1996.
			<i>L. helveticus</i>	Acetaldeído, Acido acético, Diacetil, etanol	BAUMES <i>et al.</i> , 1986.
			<i>L. lactis</i>	Acetaldeído, Diacetil, etanol	BASSIT <i>et al.</i> , 1993.
			<i>L. acidophilus</i>	Acetaldeído	ANTINONE <i>et al.</i> , 1994.
		25-30°C	<i>L. casei</i>	Acido acético, etanol	ANTINONE <i>et al.</i> , 1994.
<i>Bacillus</i>	Bacilos	25-30°C	<i>B. subtilis</i>	Ac. Acético, diacetil, 2,3 butanodiol	DETTWILLE, 1993 RENNA <i>et al.</i> , 1993.
<i>Lactococcus</i>	Cocos	25-30°C	<i>L. lactis</i>	Acetaldeído, diacetil, etanol	GRANATA e MORR, 1996.
			<i>L. cremoris</i>	Acetaldeído, diacetil, etanol	BERGER, 1995.
			<i>L. diacetylactis</i>	Acetona, etanol, diacetil	KANEKO <i>et al.</i> , 1991, MONNET <i>et al.</i> , 1994.
<i>Pediococcus</i>	Cocos	25-30°C	<i>P. acidilactici</i>	Acetoina, diacetil	BERGER, 1995.
<i>Leuconostoc</i>	Ovóide	25-30°C	<i>L. cremoris</i>	Etanol, acetoina, diacetil.	KANEKO <i>et al.</i> , 1991
			<i>L. dextranicum</i>	Acetoina, Diacetil	KANEKO <i>et al.</i> , 1991.
			<i>L. lactis</i>	Acetoina, diacetil	KANEKO <i>et al.</i> , 1991.
<i>Bifidobacterium</i>	Bacilos	35-38°C	<i>B. breve</i> <i>B. bifidum</i> , <i>B. B. longum</i> , <i>B. infantis</i>	Ac. Succínico, acetoina, diacetil, etanol.	BERGER, 1995.
<i>Listeria</i>	Bacilos	30°C	<i>Lysteria</i> <i>monocytogenes</i>	Acetoina, 2,3 butanodiol.	ROMICK e FLEMING, 1998.

<i>Saccharomyces</i>	leveduras	12-25°C	<i>S. cerevisiae</i> NCYC240	Diacetil, etanol, 2-acetolactato, acetoina,	HAUKELI e LIE, 1972.
<i>Saccharomyces</i>	leveduras	12-25°C	<i>S. cerevisiae</i> CBS2246	Diacetil, etanol, 2,3pentaodiona, 2-acetolactato, acetoina,	HAUKELI e LIE, 1972.
<i>Saccharomyces</i>	leveduras	12-25°C	<i>S. cerevisiae</i> <i>baker's yeast</i>	Diacetil, etanol, 2,3pentaodiona, 2-acetolactato acetoina,	HAUKELI e LIE, 1972.
<i>Saccharomyces</i>	leveduras	12-25°C	<i>S. cerevisiae</i> <i>var. ellipsoideus</i>	Diacetil, etanol, 2,3pentaodiona, 2-acetolactato acetoina	HAUKELI e LIE, 1972.
<i>Saccharomyces</i>	leveduras	12-25°C	<i>S. carlsbergensis</i>	Diacetil, etanol, 2,3pentaodiona, acetoina	LEWIS e WEINHOUSE, 1958, HAUKELI e LIE, 1972.
<i>Saccharomyces</i>	leveduras	12-25°C	<i>S. diastaticus</i>	Diacetil, etanol, 2-3 pentanodiona acetoina	HAUKELI e LIE, 1972.
<i>Saccharomyces</i>	leveduras	12-25°C	<i>S. sake</i>	Diacetil, etanol, acetoina,	HAUKELI e LIE, 1972.
<i>Zygosaccharomyces</i>	leveduras	20°C	<i>Z. bailii</i>	Propanolol, isobutanol, etanol, acetoina	ROMANO <i>et al.</i> 1992.
<i>Hanseniaspora</i>	leveduras	20-30°C	<i>H'spora.</i> <i>guilliermondii</i>	Acetoina, 2- acetolactato, 2,3 butanodiol	ROMANO <i>et al.</i> 1996.
<i>Hansenula anomala</i>	leveduras	20-30 <sup>0C</sup>	<i>H. anomala</i>	Etil acetato, etanol	BERGER, 1995.
<i>Kloeckera</i>	leveduras	20-30°C	<i>Kl. apiculata</i>	Acetoina 2- acetolactato, 2,3 butanodiol	ROMANO <i>et al.</i> 1996.
<i>Candida</i>	leveduras	20-30°C	<i>C. stellata</i>	Acetoina, etanol, 2- acetolactato, 2,3 butanodiol	ROMANO <i>et al.</i> 1996.
<i>Saccharomycodes</i>	leveduras	20-30°C	<i>S. ludwigii</i>	Acetoina, etanol. 2,3 butanodiol	ROMANO <i>et al.</i> 1996.
<i>Torulaspora</i>	leveduras	20 -30°C	<i>T. delbrueckii</i>	Acetoina, etanol, 2,3 butanodiol	ROMANO <i>et al.</i> 1996.

### 1.8.3 – 2,3 butanodiol

O 2,3 butanodiol, também conhecido como 2,3 butilenoglicol, 2,3 dihidroxibutano, dimetilenoglicol, é um líquido viscoso, incolor e inodoro, possui as três formas isoméricas: meso, dextro e levoméica. O 2,3 butanodiol não tem um apreciável efeito sensorial de qualidade para os vinhos, entretanto, pode contribuir de alguma maneira quanto a sua viscosidade. Existe uma relação inversa entre a produção de acetoína e 2,3 butanodiol para as linhagens de leveduras. As leveduras altamente produtoras de acetoína são baixas produtoras de 2,3 butanodiol e vice versa. As baixas produtoras de 2,3 butanodiol sugerem o baixo poder fermentativo das leveduras ou mais, um defeito da acetoína redutase, enzima que cataliza a redução de acetoína em 2,3 butanodiol (ROMANO e SUZZI, 1996).

O extrato seco do vinho é composto pelas substâncias voláteis e não voláteis presentes no mesmo, das quais fazem parte proteínas, pectinas, matérias corantes, sais minerais, açúcares, aminoácidos, polióis (glicerol e 2,3 butanodiol) e ácidos (lático, succínico e tartárico), entre outras. O glicerol representa cerca de um terço do extrato seco (Garoglio 1959 citado por GIUGLIANI, 1984), enquanto que o 2,3 butanodiol encontra-se na concentração de 0,1 a 1,6 g.L<sup>-1</sup> (LEE 1980, citado por GIUGLIANI, 1984).

## 2 - Importância microbiológica para formação de aromas nos vinhos

O aroma dos vinhos é determinado por 400 a 600 compostos voláteis de diversas classes, como os álcoois, ácidos, ésteres, aldeídos, cetonas, terpenos, lactonas, e outros. Estes compostos são substâncias oriundas das uvas, modificados durante a vinificação, ou resultantes da ação microbiana durante a fermentação e maturação do vinho. A concentração total destes compostos é em torno de 0,8 a 1,0 g.L<sup>-1</sup>. Dentre estes compostos com propriedades aromáticas estão os álcoois superiores, formados durante a fermentação (isobutanol, isoamil álcool e 2-feniletanol), e outros em menor quantidade, dentre eles a acetoína (SOUMALAIN, 1971).

### 2.1 - Vinho

Bebida alcoólica fermentada, que é obtido, genericamente, pela fermentação alcoólica de um suco de fruta natural madura, principalmente a uva (*Vitis vinifera*). Alguns autores, admitem que este nome, vinho, seja reservado só para a bebida proveniente da uva. Na verdade, o vinho mais antigo que se conhece não era proveniente de fruta mas sim de mel (hidromel) (BORZANI *et al.*, 1983).

Muitos são os tipos de vinhos existentes de acordo com a uva ( e a região) de onde provêm, com a concentração alcoólica final, com as modificações que sofrem conforme o tipo de fermentação e mesmo com determinadas adições que se lhe fazem.

Sua classificação segundo a legislação brasileira divide-se em: de mesa; espumantes; licorosos e compostos; podendo em cada caso serem tintos, rosados ou brancos (BORZAN *et al.*, 1983).

Normalmente, os vinhos têm uma concentração alcoólica entre 10% a 13%, volume/volume ou grau Gay-Lussac (AMERINE *et al.*, 1979).

O vinho é um produto de transformação do mosto da uva pelos microrganismos vivos. Desta forma, sua composição bem como a evolução são diretamente ligados aos fenômenos bioquímicos. Essa definição permite compreender a extrema complexidade da sua composição química, dos compostos envolvidos no aroma e flavor e define ainda, o valor alimentar do vinho: provinda de células vivas, contém quantidades diluídas de elementos necessários à vida (AMERINE *et al.*, 1979).

## **2.2 - Composição dos vinhos**

Os principais componentes dos vinhos são: água, açúcares, álcoois, ácidos orgânicos, sais de ácidos minerais e orgânicos, compostos fenólicos, compostos nitrogenados, pectinas, gomas e mucilagens, compostos voláteis e aromáticos.

O teor de açúcar da uva varia em torno de 15% a 30% em função de vários fatores, tais como o estágio de maturação, o clima, o solo e variedade da uva. Os açúcares são constituídos quase que exclusivamente de glicose e frutose em proporções sensivelmente iguais no momento da maturação (relação de frutose/glicose varia de 0,71 - 1,45 (FARTAS,

1988). Durante a fermentação essa relação aumenta, visto que a maioria das leveduras fermenta preferencialmente a glicose.

Álcool etílico é o constituinte mais importante do vinho após a água, que representa cerca de 85% a 90%. Admitindo-se que o grau alcoólico dos vinhos varia entre 9°GL e 15°GL, o álcool etílico representa de 72 a 120 g.L<sup>-1</sup>. Desse total, cerca de 0,5% é representado por outros álcoois, tais como: metílico, isobutílico, isoamílico, hexílico, feniletílico, etc (FARTAS, 1988).

A glicerina (produto da fermentação alcoólica) é, após o álcool etílico, o constituinte do vinho mais importante em proporção, cerca de 5 a 10 g.L<sup>-1</sup>. A glicerina é um álcool com três funções álcoois. Seu sabor adocicado, quase igual ao da glicose, contribui para a maciez do vinho, mas não constitui o fator principal. O butilenoglicol é outro poliol constituinte do vinho, seu teor varia de 0,3 a 1,5 g.L<sup>-1</sup>. Os álcoois superiores sempre presentes nos vinhos são: 1-propanol; 1-butanol; 2-butanol; 2-metil-1-propanol; 2-metil-1-butanol; 3-metil-1-butanol; 1-pentanol; e 1-hexanol (BORZANI *et al.*, 1983).

Os principais ácidos orgânicos do vinho são: a) Os provenientes da uva: L(+) tartárico, L(-) málico e cítrico; e b) os provenientes da fermentação: succínico, láctico e acético. Existem outros ácidos orgânicos em pequenas quantidades: galacturônico, glucurônico, glucônico, citramálico, dimetilglicérico, pirúvico, cetoglutárico, isocítrico fumárico, etc. A acidez fixa do vinho é basicamente formada dos seguintes ácidos: tartárico, málico, láctico, succínico e cítrico; enquanto a acidez volátil é dada principalmente pelo

ácido acético ( o baixo teor em acidez volátil indica boa sanidade do produto) (BENDA, 1981).

O vinho contém de 2 - 4 g.L<sup>-1</sup> de sais dos ácidos orgânicos e minerais. Os principais constituintes de sais de vinho são: ânions minerais: fosfato, sulfato, cloreto e sulfito; ânions orgânicos: tartarato, malato e lactato; cátions: K, Na, Mg, Ca, Fe, Al, Cu; Oligoelementos: F, SI, I, Br, Zn, Mn, Pb, Co, Cr, Ni, etc.

Além destes constituintes, há também: os ácidos fenólicos que conferem aos vinhos a coloração e grande parte do sabor; substâncias nitrogenadas, substância nutritiva indispensável à leveduras e bactérias; ésteres, como o acetato de etila; aldeídos e cetonas, como acetona, acetoína, diacetil e butilolactona e as vitaminas, importantes como fator de crescimento para os microrganismos.

### 2.3 - Microbiologia do vinho

A fermentação do suco de uva e do vinho se dá por uma intervenção microbiológica complexa tradicionalmente envolvendo um crescimento seqüencial de várias leveduras, bactérias do ácido láctico e talvez bacteriófagos. As leveduras são responsáveis pela fermentação alcoólica primária do suco enquanto outros microrganismos podem provocar outros tipos de fermentações, como a maloláctica por bactérias do ácido láctico. Tradicionalmente, os vinhos têm sido produzidos por fermentações naturais de leveduras e bactérias lácticas originárias da uva e de equipamentos vinícolas (FLEET *et al.*, 1984).

A qualidade do vinho é rigorosamente definida pela ecologia microbiana de fermentação. Várias espécies de microrganismos se desenvolvem durante a fermentação. A extensão na qual se desenvolvem é que determina o tipo e a concentração das muitas substâncias que podem contribuir com o aroma e flavor característicos dos vinhos (HEARD e FLEET, 1988).

O etanol, para as leveduras que fermentam o mosto da uva, é um componente importante no que se refere à tolerância dos microrganismos em suportarem determinadas concentrações deste composto. Isto pode interferir muitas vezes na qualidade do produto final, principalmente dos compostos relacionados ao aroma e flavor dos vinhos (HEARD e FLEET, 1986).

Um fator importante, é a temperatura do processo de vinificação aliada à concentração de etanol existente no meio de fermentação. Segundo CALDWELL (1995), baixas temperaturas aumentam a resistência da membrana celular às intolerâncias do meio, diminuindo assim as trocas metabólicas e aumentando sua capacidade de sobreviver a altas taxas de etanol. GAO e FLEET (1988), estudaram o comportamento das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* e *Kloeckera apiculata*. Demonstraram que a habilidade da *Kloeckera apiculata* e *Candida stellata* em tolerar o etanol está significativamente aumentada a baixas temperaturas. Estas duas espécies podem atuar em fermentações de mosto conduzidas a baixas temperaturas.

Numerosos estudos têm sido realizados quanto à importância e identificação da maioria das espécies de leveduras e/ou bactérias lácticas que se desenvolvem durante o

processo de vinificação (RANKINE, 1967; ROSET *et al.*, 1971; FLEET *et al.*, 1984; GAO e FLEET, 1988; BAUMES *et al.*, 1986; ROMANO *et al.*, 1992, 1993, 1996; CIANI e PICCIOTTI, 1995; SILVA, 1996).

As leveduras do gênero *Saccharomyces* são necessárias para a fermentação do mosto. Algumas cepas de leveduras selvagens como as apiculadas ou outras, podem ser prejudiciais para a qualidade do vinho quando elas se desenvolvem durante a fermentação, embora isto possibilite a produção de “flavors” que conferem um caráter distinto e especial aos vinhos (AMERINE *et al.*, 1979).

### 3 - Características das leveduras objeto deste estudo

#### 3.1- *Hanseniaspora guilliermondii* (SMITH, 1984)

Sinônimos: *Hanseniaspora melligeri* e *Hanseniaspora apuliensis*

Crescimento em meio de glicose, extrato de levedura, água e peptona: Após 2 dias de crescimento à 25 °C as células são apiculadas, de forma alongada ou oval, de tamanho entre (2,2 - 5,8) x (4,5 - 10,2) µm. Apresentam reprodução por brotamento bipolar. A utilização de açúcares e compostos carbonados se dá da seguinte forma:

Fermentação:

Glicose	+	Maltose	-	sacarose	-
Galactose	-	Lactose	-		

Assimilação de compostos carbonados:

Galactose	-	Raffinose	-	Eritritol	-
Sacarose	-	Ribitol	-	Maltose	-

Celobiose	+	Xilose	-	Manitol	-
Trealose	-	Arabinose	-	Ác succínico	-
Lactose	-	Ramnose	-	Inositol	-
Maltose	-	Ác. cítrico	-	Glicerol	-

Crescimento à 37°C: +

Crescimento em meio livre de vitaminas: -

### 3.2 - *Kloeckera apiculata* (SMITH, 1984)

Sinônimos: *Saccharomyces apiculatus*, *Kloeckera germanica*, *Pseudosaccharomyces muelleri*, *Kloeckera muelleri* e *Kloeckera lindneri*.

Crescimento em meio de glicose, extrato de levedura, água e peptona : Após 2 dias de crescimento à 25 °C as células são apiculadas, de forma alongada ou oval, de tamanho entre (1,5 - 5,0) x (2,5 - 11,5) µm. Apresentam reprodução por brotamento bipolar. A utilização de açúcares e compostos carbonados se dá da seguinte forma:

Fermentação:

Glicose	+	Maltose	-	Sacarose	-
Galactose	-	Lactose	-		

Assimilação de compostos carbonados:

Galactose	-	Raffinose	-	Eritritol	-
Sacarose	-	Ribitol	-	Maltose	-
Celobiose	+	Xylose	-	Manitol	-
Trealose	-	Arabinose	-	Ác succínico	-
Lactose	-	Ramnose	-	Inositol	-
Maltose	-	Ác. cítrico	-	Glicerol	-

Crescimento em meio livre de vitaminas: -

Crescimento à 37°C: +

### 3.3 - *Hansenula anomala* (SMITH, 1984)

Sinônimos: *Saccharomyces anomalus*, *Willia anomala*, *Endomyces anomalus*, *Hansenula espherica*, *Monilia javanica*, *Hansenula javanica*, *Hansenula schneegii*, *Candida pelliculosa*, *Hansenula bispora*, *Hansenula nivea*, *Hansenula panis*, *Candida beverwijkii*.

Crescimento em 5% de ágar extrato de malte: após três dias de crescimento à 25 °C, as células são esféricas e alongadas (1,9 - 4,1) x (2,1 - 6,1) µm. A utilização de açúcares e compostos carbonados se dá da seguinte forma:

Fermentação:

Glicose	+	Maltose	-
Galactose	-	Lactose	-
Sacarose	+	Rafinose	- ou +

Assimilação de compostos carbonados:

Galactose	-	Raffinose	-	Eritritol	+
Sacarose	+	Ribitol	-	Maltose	+
Celobiose	+	Xylose	-	Manitol	+
Trealose	+	Arabinose	-	Ác succínico	+
Lactose	-	Ramnose	-	Inositol	-
Maltose	-	Ác. cítrico	+	Glicerol	-

Crescimento em meio livre de vitaminas: +

Crescimento à 37°C: +

### 3.4- Acetoína produzida nos vinhos por diferentes espécies de leveduras

Diversos estudos são realizados quanto a seleção das cepas de leveduras utilizadas na elaboração dos vinhos, com intuito de melhorar a sua produção industrial para melhoria da

qualidade dos vinhos. As leveduras selvagens têm um papel importante na produção de substâncias relacionados ao sabor e flavor dos vinhos, mas pelo fato de seu papel não estar bem claro e os riscos de insucesso do vinho associado a sua presença bem conhecidos, é que prefere-se eliminar a sua presença.

Devido à complexidade dos processos que envolvem a elaboração dos vinhos e ao fato de que as fermentações naturais ainda são mantidas em alguns países da Europa como a França por exemplo, é que se fazem necessários avanços quanto ao conhecimento destes microrganismos e principalmente a qualidade e a quantidade dos compostos que produzem.

Na Tabela 2, é mostrada a produção de acetoína pelas principais leveduras selvagens encontradas nas uvas e no mosto do vinho.

**TABELA 2 - Leveduras do vinho produtoras de acetoína (ROMANO,1996)**

Espécie	Número de cepas	Produção de acetoína (mg.L <sup>-1</sup> )
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	0-0
	10	26,3-76,2
	100	0,1-194,6
<i>Kloeckera apiculata</i>	2	90-220
	10	68,6-225,0
	<b>48</b>	<b>55,8-187,4</b>
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	<b>48</b>	<b>50,3-258,1</b>
<i>Candida stellata</i>	10	34,9-254,1
<i>Zygosacharomyces balli</i>	35	17,1-34,4
<i>Sacharomycodes ludwigii</i>	20	55,5-362,7
	10	211,7-478,3



potássio-5-ceto-Dgluconato, ácido láctico, ácido succínico, ác. cítrico e inositol. Os autores concluíram que a fonte principal de carbono é a glicose para as leveduras de interesse, sendo que nenhuma das leveduras relacionadas assimilava glicerol ou sacarose.

**TABELA 4: Principais fontes de carbono assimiláveis pelas leveduras do vinho.**

	Glicose	Celobiose	Maltose	Rafinose
<i>H'spora. valbyensis</i>	+	+	-	-
<i>H'spora. uvarum</i>	+	+	-	-
<i>H'spora. osmophila</i>	+	+	+	-
<i>Kl. apiculata</i>	+	+	-	-
<i>Kl. magna</i>	+	+	+	-
<i>S. ludwigii</i>	+	+	-	-

### 3.5.3 -Concentração de glicose

A concentração ótima de açúcar para uma velocidade máxima de crescimento é em torno de 1 – 2%. Para um máximo rendimento em etanol por grama de açúcar fermentado a concentração ótima de açúcar é altíssima (em torno de 20%). A concentração de glicose recomendada por WICKERHAM (1951) é de 50 g.L<sup>-1</sup> citado por ROMANO *et al.*(1993).

### 3.5.4 - Temperatura

Alguns autores apresentam evidências de que as leveduras do vinho podem se aclimatar a baixas temperaturas. PEDERSON *et al.* (1959) encontraram que em sucos de uvas estocados em tanques à -2°C desenvolveu-se grande número de células leveduriformes, entre elas diversas espécies representadas por cepas de *Saccharomyces*, *Torulopsis*,

*Hanseniaspora*, e predominantemente *Candida*. SMITH (1984) cita um bom crescimento destas leveduras à 37<sup>o</sup>C em meio contendo glicose, extrato de levedura e peptona.

O efeito da temperatura no qual a levedura se submete está relacionado diretamente a vários fatores, tais como a respiração celular, metabolismo fermentativo, crescimento celular e tolerância ao etanol.

O metabolismo fermentativo das leveduras pode ocorrer em um espaço muito amplo de temperatura, por ex.: são encontrados valores de crescimento para *Saccharomyces cerevisiae* em temperaturas altas, próximas a 40 - 45<sup>o</sup>C ou maiores. Sendo que dentro dos limites de 15 - 35<sup>o</sup>C a fermentação é mais segura. Em temperaturas mais baixas, a velocidade de crescimento celular é menor, mas no entanto, pela menor evaporação do etanol, tem-se uma concentração final de álcool maior que a temperaturas mais elevadas (BENDA, 1981, citado por PRESCOTT e DUNN'S, 1983).

A Tabela 5 demonstra o efeito da temperatura na formação de alguns subprodutos originários do metabolismo das leveduras.

**TABELA 5 - Efeito da temperatura na formação de produtos secundários pelas leveduras do vinho (Lafon, 1955, citado por AMERINE *et al.*, 1979).**

Produto fermentado	15 <sup>o</sup> C	20 <sup>o</sup> C	25 <sup>o</sup> C	30 <sup>o</sup> C	35 <sup>o</sup> C
Açúcar fermentado em g.L <sup>-1</sup>	220	191	198	175	139
Etanol em vol %	12.6	11.5	11.9	10.5	7.8
Glicerina em mM.L <sup>-1</sup>	62	69	68	73	78
Ác. Acético em mM.L <sup>-1</sup>	11.8	15.3	15.5	14.1	14.3
Ác. Succínico mM.L <sup>-1</sup>	6.5	6.1	5.4	5.2	5.3
Acetoína em mM.L <sup>-1</sup>	1.1	1.1	1.5	1.3	2.2
2,3 Butanodiol em mM.L <sup>-1</sup>	5.3	5.7	6.4	6.4	7.4
Acetaldeído em mM.L <sup>-1</sup>	0.6	0.7	1.1	1.2	1.2

Altas temperaturas também conduzem a altas concentrações de ácido pirúvico e de ác. 2-cetoglutárico. A concentração de ácido pirúvico é 3 vezes mais alta à temperatura de 30<sup>0</sup>C que a 20<sup>0</sup>C (RIBÉREAU-GAYON e PEYNAUD, 1966).

A formação de álcoois superiores também depende da temperatura. Sendo a sua maior produtividade a 20<sup>0</sup>C (AMERINE *et al.*, 1979). À medida que a temperatura aumenta, diminui a formação de álcoois superiores e a 35<sup>0</sup>C somente ¼ dos álcoois superiores são formados em relação àqueles formadas a 20<sup>0</sup>C.

## **CAPÍTULO II - MATERIAL E MÉTODOS**

## CAPÍTULO II - MATERIAL E MÉTODOS

### 1 - Microrganismo

Os microrganismos utilizados para a realização dos ensaios fermentativos foram as leveduras apiculadas: *Hanseniaspora guilliermondii* CCT 3800, *Kloeckera apiculata* CCT 0774 (ATCC 18212) e não apiculada: *Hansenula anomala* CCT 2648 (DSM 70255) obtidas da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”. Estas foram escolhidas aleatoriamente com base em estudos bibliográficos ( ROMANO *et al.* 1992, 1993 (A); 1993 (B), 1996; HEARD e FLEET. 1986, 1988). Os autores utilizavam cepas selvagens selecionadas a partir da região de interesse para estudos relacionados à produção de compostos aromáticos para elaboração dos vinhos.

### 2 - MEIOS DE CULTURA

#### 2.1 - Meio de manutenção

Meio YMA (Yeast Malt Extract Agar) com a seguinte composição:

Extrato de levedura (YE):	3 g.L <sup>-1</sup>
Extrato de malte (ME)	3 g.L <sup>-1</sup>
Bacto peptona (BP):	5 g.L <sup>-1</sup>
Glicose	10 g.L <sup>-1</sup>
Ágar	20 g.L <sup>-1</sup>

O meio após ter seu pH ajustado em 5,5 com solução de ácido cítrico 0,5%, foi transferido para tubos de ensaio com rosca e esterilizado a 121<sup>o</sup>C por 15 minutos em autoclave. Após a esterilização, o meio ainda quente foi inclinado sob a bancada em um ângulo de aproximadamente 30<sup>o</sup> até completo resfriamento.

As leveduras foram inoculadas e incubadas por 24 horas a 30<sup>o</sup>C em estufa bacteriológica. Após este tempo de crescimento os tubos contendo os microrganismos foram conservadas a 4<sup>o</sup>C em refrigerador. A repicagem foi feita a cada dois meses. Este meio foi usado no repique e na conservação da cepa.

## 2.2- Preparo do inóculo

O meio de cultivo foi o YM:

Extrato de levedura (YE):	3 g.L <sup>-1</sup>
Extrato de malte(ME):	3 g.L <sup>-1</sup>
Bacto Peptona(BP):	5 g.L <sup>-1</sup>
Glicose(*):	10; 15; 20 e 40 g.L <sup>-1</sup>

(\*) Em um dos experimentos com a cepa *Hanseniaspora guilliermondii* (CCT3800), misturou-se 50 g.L<sup>-1</sup> de glicose com 50g.L<sup>-1</sup> de sacarose).

O inóculo foi preparado a partir de uma cultura estoque. A cultura estoque serviu para iniciar o crescimento dos microrganismos em cultivo submerso (frascos agitados) e daí para o reator. Esta fase destinou-se à adaptação da levedura ao consumo do substrato (glicose) e ao pH utilizado. Difere do meio YMA pela variação quanto à concentração de glicose e pelo fato de não conter ágar em sua composição.

Transferiu-se duas alçadas de células da cultura estoque para o frasco Erlenmeyer contendo caldo de cultivo. O frasco foi tamponado com algodão para permitir a aeração adequada e incubado em um banho termostaticado agitado. O movimento giratório agita o líquido sem que umedeça o tampão de algodão e a força centrífuga do meio de fermentação desloca o fluido formando uma camada que é arejada por difusão através da superfície líquida (TRAVASSOS *et al.*, 1988). A temperatura de incubação foi de 30°C e a agitação de aproximadamente 150 rpm. A concentração celular foi determinada por turbidimetria e gravimetria de modo que atingisse um valor de concentração próximo a 2,5 g.L<sup>-1</sup> de células. Esta suspensão foi usada como inóculo, numa fração de 10% em fermentador ou em frascos agitados. Este valor foi escolhido para que não houvesse alteração significativa na concentração dos nutrientes no meio de cultivo.

### **3- Condições de operação**

#### **3.1- Ensaios preliminares em tubos de ensaio para avaliação do efeito do pH, temperatura e concentração do etanol sobre o crescimento celular.**

Meio de cultivo:

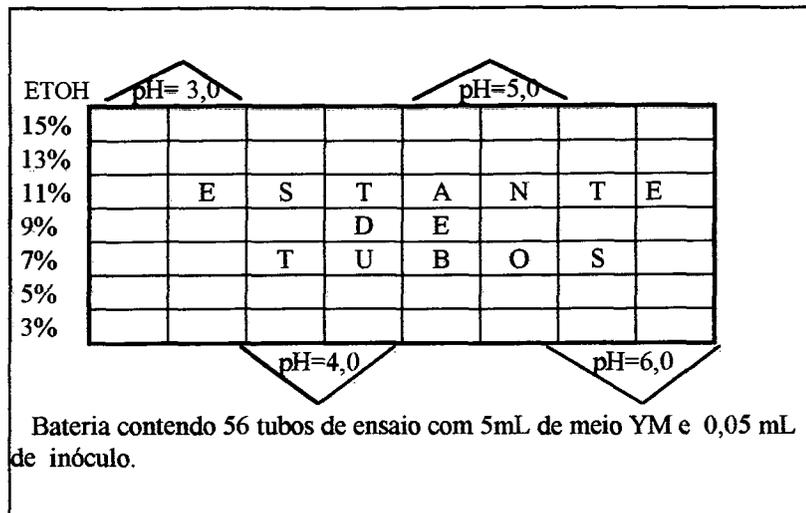
Extrato de levedura (YE):	3 g.L <sup>-1</sup>
Extrato de malte(ME):	3 g.L <sup>-1</sup>
Bacto Peptona(BP):	5 g.L <sup>-1</sup>
Glicose:	15 g.L <sup>-1</sup>

Ajustados para conter concentrações de etanol de: 3, 5; 7; 9; 11; 13 e 15 % (v/v) por adição de álcool etílico absoluto em meio estéril.

Os ensaios foram realizados em tubos estéreis contendo 5 mL de meio, inoculados com 0,05 mL de uma pré cultura (24h-YM) com uma concentração de células conhecida no pré inoculo em torno de  $2,5 \text{ g.L}^{-1}$  para cada uma das leveduras *Hanseniaspora guilliermondii* (CCT 3800), *Kloeckera apiculata* (CCT0774) e *Hansenula anomala* (CCT 2648). Os tubos foram incubados em diferentes temperaturas:  $10^{\circ}\text{C}$ ,  $20^{\circ}\text{C}$  e  $30^{\circ}\text{C}$  em geladeira, em banho refrigerado (MICROQUÍMICA) e estufa bacteriológica, respectivamente, durante 15 dias.

O crescimento das leveduras foi acompanhado com leituras diárias em espectrofotômetro (550 nm) como descrito no item (4.2) e calculados em concentração em  $\text{g.L}^{-1}$  a partir de uma curva de calibração. Os ensaios foram realizados em duplicata, e os resultados analisados pela média das concentrações.

Foi determinado simultaneamente ao estudo da tolerância ao etanol, a influência do pH; variando-se entre pH 3,0; pH 4,0; pH 5,0 e pH 6,0, ajustado previamente por adição de uma solução contendo 5 % de ácido cítrico (PA). O experimento foi montado como esquematizado na Figura 2.



**FIGURA 2** - Esquema da montagem do experimento de avaliação do efeito da concentração de etanol sobre o crescimento celular nas temperaturas estudadas (10, 20 e 30°C).

#### Montagem:

Foram utilizados um total de 504 tubos de ensaio com rolha de borracha, contendo meio YM (Yeast Malt Extract) esterilizado em autoclave 121°C por 15 minutos, inoculados com 0,05 mL de inóculo em 168 tubos de cada uma das leveduras (*Hanseniaspora guilliermondii*, *Kloeckera apiculata* e *Hansenula anomala*) incubados nas três temperaturas (10°C, 20°C e 30°C), sendo assim, 56 tubos em cada temperatura para cada uma das leveduras (56\*3= 168), como descrito anteriormente. A concentração de glicose inicial foi a mesma em todos os tubos (15 g.L<sup>-1</sup>).

### 3.2 - Ensaios realizados em frascos agitados

Os meios de cultivo descritos na Tabela 6 foram avaliados, em duplicata, em frascos de Erlenmeyer, conforme descrito no item 2.2

**TABELA 6 - Composição dos meios de cultura utilizados nos experimentos em frascos agitados.**

Parâmetro avaliado	Meios	Composição
pH	MH1 - 3,0	Extrato de levedura: 3 g.L <sup>-1</sup>
	MH2 - 4,5	Extrato de Malte: 3 g.L <sup>-1</sup>
	MH3 - 5,5	Bacto Peptona: 5 g.L <sup>-1</sup> Glicose: 15 g.L <sup>-1</sup>
Concentração de substrato	MS1 - 10 g.L <sup>-1</sup>	Extrato de levedura: 3 g.L <sup>-1</sup>
	MS2 - 15 g.L <sup>-1</sup>	Extrato de Malte: 3 g.L <sup>-1</sup>
	MS3 - 20 g.L <sup>-1</sup>	Bacto Peptona: 5 g.L <sup>-1</sup> Glicose: 10,15,20 g.L <sup>-1</sup>
Microrganismo	MHAN - <i>H. anomala</i>	Extrato de Levedura: 3 g.L <sup>-1</sup>
	MGUI - <i>H'spora. guilliermondii</i>	Extrato de Malte: 3 g.L <sup>-1</sup>
	MKLO - <i>Kl. apiculata</i>	Bacto Peptona: 5 g.L <sup>-1</sup> Glicose: 15 e 20 g.L <sup>-1</sup>

Controle de crescimento:

No final dos ensaios fermentativos (em frascos agitados), foram tomados 3 mL de cada um dos frascos de Erlenmeyers (seis) para avaliação de possível contaminação (em placas de Petri contendo o meio YMA) e do crescimento. Esta análise foi importante para se excluir os erros possíveis, uma vez que de cada Erlenmeyer foram colhidas assepticamente duas amostras de 10 mL para avaliação da concentração celular, concentração de glicose e pH.

### 3.3 - Ensaios realizados em fermentador

Os ensaios foram realizados em fermentador “New Brunswick Scientific CO INC - Modelo BIOFLO III”, em regime descontínuo, com cuba de 6L, e volume útil de 4L. O meio de cultura utilizado está descrito na Tabela 6.

Nesta etapa de fermentação, foi testada a concentração de glicose: (15, 20 e 40 g.L<sup>-1</sup>) para as leveduras *Hansenula anomala* (CCT2648), *Hanseniaspora guilliermondii* (CCT3800) e *Kloeckera apiculata* (CCT0774).

Para a cepa *Hanseniaspora guilliermondii* (CCT3800), foi usado além destas concentrações, uma mistura de substratos contendo 50 g.L<sup>-1</sup> de glicose e 50 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. Esta modificação foi realizada apenas com esta cepa, por apresentar um melhor comportamento cinético. O objetivo deste estudo específico foi avaliar a capacidade de crescimento e produção de acetoína por este microrganismo frente a outro substrato mais econômico (sacarose).

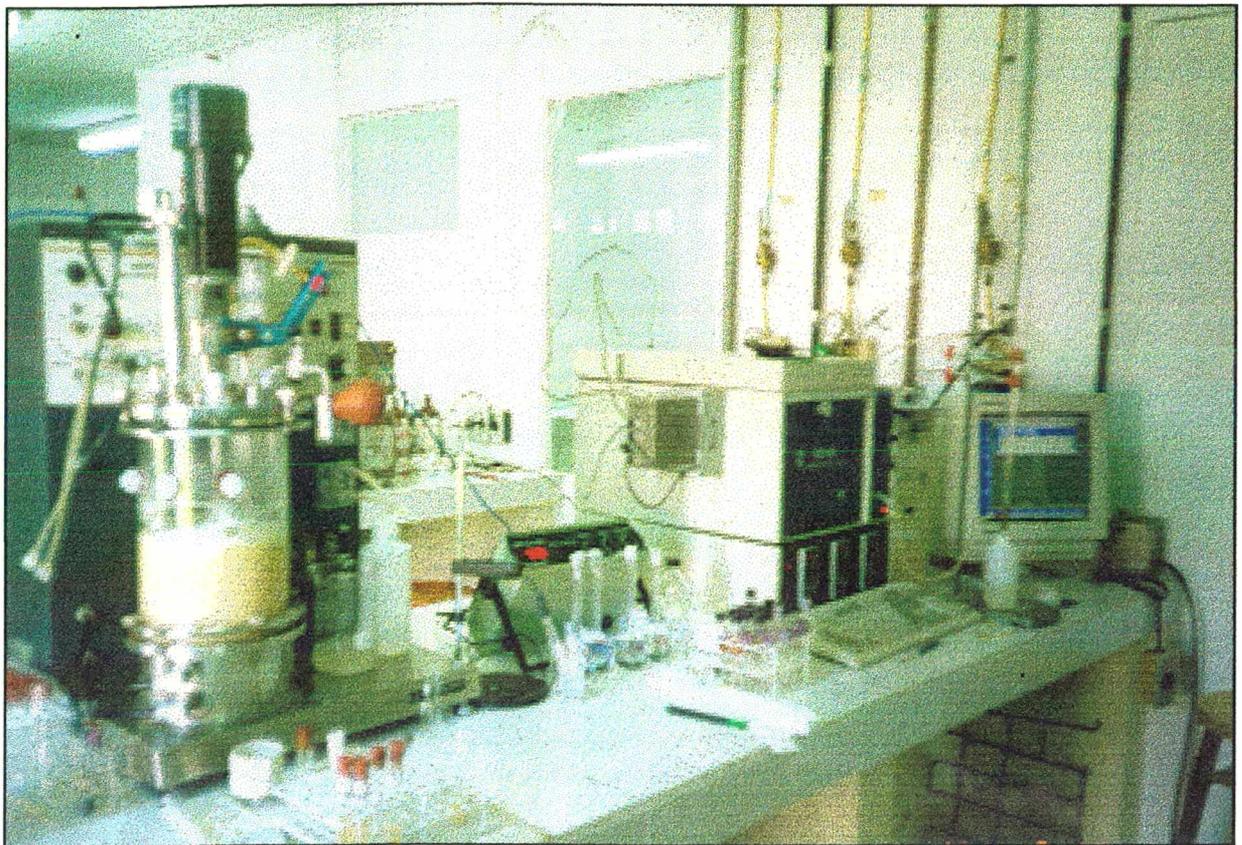
A temperatura, agitação, e a vazão de ar foram mantidas constantes em todos os experimentos a 30°C e 500 rpm e 1,5 vvm respectivamente. O pH não foi controlado. O controle de formação de espuma foi efetuado pela adição de 200 µL de antiespumante polipropilenoglicol (AVERAGE M<sub>n</sub> ca.2.000 - ALDRICH CHEMICAL COMPANY, INC.).

#### Descrição do fermentador:

O fermentador é dotado de sondas para controle automático de pH, nível de espuma e sensor de temperatura. Possui quatro bombas peristálticas que permitem controlar parâmetros importantes do processo, tais como pH, através de soluções ácidas e básicas (não utilizado neste estudo, pois o pH dos processos não foi controlado) e nível de espuma através da adição de anti-espumante. A agitação do processo é realizada por um motor que contém duas turbinas colocadas em dois níveis diferentes. Para obtenção da aeração

desejada, ar estéril é introduzido no meio, proveniente de um compressor de ar cuja vazão (1,5 vvm) é controlada através de um rotâmetro.

A Figura 3 mostra o fermentador “NEW BRUNSWICK” com seus acessórios, o cromatógrafo em fase gasosa - CG Instrumentos Científicos e microcomputador, onde foi realizada a integração das áreas referentes às análises cromatográficas.



**FIGURA 3 - Fermentador “NEW BRUNSWICK” com seus acessórios, o cromatógrafo em fase gasosa - CG Instrumentos Científicos e microcomputador.**

## **4 - Métodos analíticos**

### **4.1 - Amostragem**

Durante os ensaios de fermentação, foram retiradas alíquotas de aproximadamente 12 mL de amostra em intervalos de tempo de 1,5 horas na fase inicial do processo, diminuindo-se, conforme o caso, para 30 minutos durante a fase exponencial de crescimento e 1 hora no decorrer da fermentação.

Após a inoculação, as amostras foram retiradas de forma estéril do fermentador, através de um dispositivo acoplado ao mesmo, preparadas para a determinação da concentração celular, glicose, etanol, acetato de etila diacetil e acetoína.

### **4.2 - Determinação da concentração celular**

A concentração celular durante as fermentações foi determinada por dois métodos: por turbidimetria e por gravimetria.

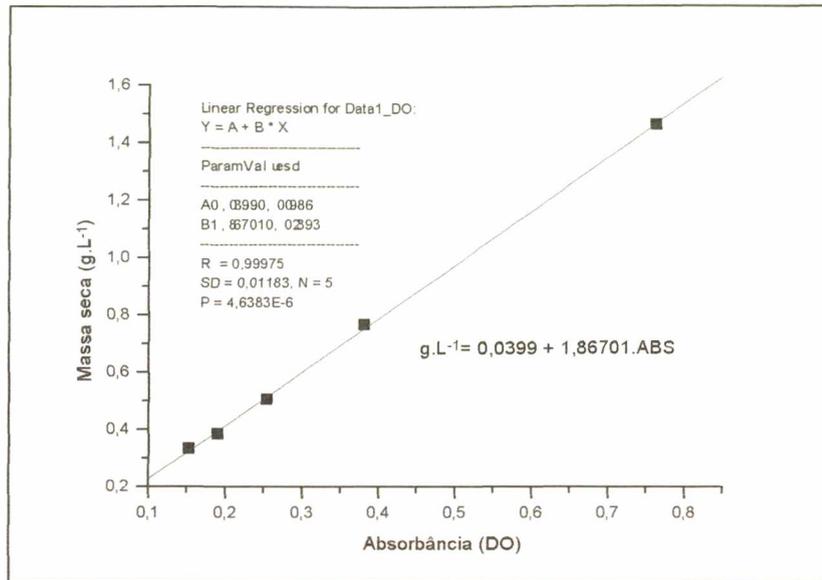
A determinação gravimétrica da concentração celular, expressa em massa de material seco por unidade de volume (uma das formas de se caracterizar crescimento), foi utilizada para traçar curvas de calibração e confirmar os resultados obtidos com a medida da absorbância.

As medidas de absorbância foram realizadas a um comprimento de onda  $\lambda = 550$  nm (após análise da melhor faixa de absorção do fermentado) em espectrofômetro (modelo

E225-D, marca CELM) e convertidas em concentração celular, massa de matéria seca por unidade de volume, através do uso de uma curva de calibração (Figura 4).

O procedimento para a construção desta curva foi o seguinte:

- Aliquotas de 50 ml de cada cultura das três leveduras *Hanseniaspora guilliermondii*, *Kloeckera apiculata* e *Hansenula anomala* foram coletadas no final da fermentação, filtrados em filtro Millipore com membrana de 0,8  $\mu\text{m}$  previamente secas em estufa à 105°C . Após secagem até peso constante (24h a 105°C) a concentração celular foi determinada pela diferença de peso seco.
- O peso da amostra obtido após pesagem da membrana dividido pelo volume do fermentado fornece a concentração do número de células. Este valor expressa a concentração de massa seca.
- Aproximadamente 20 mL do fermentado foram retirados e realizadas diluições 1:2; 1:4; 1:6; 1:8; e 1:10 , lendo-se a absorbância em espectrofotômetro (550 nm).
- A curva obtida correlacionando-se a absorbância com a concentração celular ( $\text{g.L}^{-1}$ ) apresentou limites de linearidade. As equações matemáticas que descreveram este trecho apresentaram coeficientes de correlação (r) iguais a 0,999 ; 0,999 e 0,997 para *H'spora guilliermondii*, *Kl. apiculata* e *H. anomala*, respectivamente. A Figura 4 mostra a curva de calibração para *Hanseniaspora guilliermondii* (CCT3800). As outras curvas de calibração encontram-se no Anexo 3.



**FIGURA 4 - Curva de calibração da concentração celular para *H'spora guilliermondii*.**

As equações obtidas por regressão linear foram as seguintes:

**Para *Hanseniaspora guilliermondii* (CCT 3800):**

$$X_{g.L}^{-1} = 0,0399 + 1,86701 * Abs \quad (1)$$

**Para *Hansenula anomala* (CCT2647)**

$$X_{g.L}^{-1} = 1,3983 - 0,2535 * Abs \quad (2)$$

**Para *Kloeckera apiculata* (CCT0774)**

$$X_{g.L}^{-1} = 1,2786 * Abs - 0,0362 \quad (3)$$

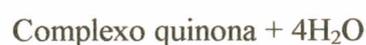
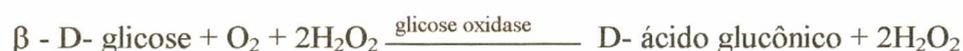
Onde X= concentração de células ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e abs = absorvância da suspensão diluída.

Considerou-se, para o cálculo da concentração celular, a diluição utilizada em cada leitura, mantendo a absorvância sempre no limite de linearidade.

### 4.3 - Dosagem de glicose

O teste usado para a determinação de glicose foi o da “Biodiagnóstica - Enz Color”

#### Princípio do método “glicose Enz Color”



O peróxido de hidrogênio formado reage com a 4- aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase (POD - Doador hidrogênio-peróxidorreductase), através de uma reação oxidativa de acoplamento formando uma antipirilquinonimina vermelha cuja intensidade de cor é proporcional à concentração da glicose na amostra.

#### Reagentes utilizados

**1. Reagente Glicose Enz Color:** 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 7 - Procedimento de determinação da glicose.**

Soluções	Branco	Padrão	Teste
Reagente cor	2,0mL	2,0mL	2,0mL
Padrão	-	20µL	-
Amostra Fermentado)	-	-	20µL

\* Homogeneizar suavemente, incubar durante 10 minutos a 37<sup>0</sup>C. Ler a absorbância da amostra (A Teste) e da solução padrão (A padrão). A cor é estável por duas horas.

#### Cálculo

$$\text{mg de glicose por dL} - dL = \frac{A(\text{teste}) * 100}{A(\text{padrao})} \quad (4)$$

Linearidade: O método é linear até 400 mg.dL<sup>-1</sup>. Amostras com concentrações superiores devem ser diluídas com água destilada e restestadas.

#### 4.4 - Determinação da concentração de etanol e acetato de etila

A concentração de etanol e acetato de etila foi determinada por cromatografia em fase gasosa, usando-se cromatógrafo CG-90-DIC com detector de ionização de chama (DIC ar-hidrogênio), injetor manual e coluna POROPAK Q - 80-100 mesh, de 1 mm de diâmetro interno e 2m de comprimento acoplado a um microcomputador, onde foi realizada a integração das áreas resultantes das análises cromatográficas. A integração e os

cromatogramas foram obtidos através de uma placa de interface AD/DA- (MICROQUÍMICA).

#### **Condições de operação:**

- \* Gases de arraste: Nitrogênio com fluxo de  $25 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .
- \* Gases da chama: Hidrogênio e ar com vazão de  $35 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e  $300 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  respectivamente.
- \* Temperatura da coluna:  $105^{\circ}\text{C}$
- \* Temperatura do detector:  $230^{\circ}\text{C}$
- \* Temperatura do injetor:  $185^{\circ}\text{C}$
- \* Volume da amostra:  $2,0 \mu\text{L}$

Uma curva de calibração foi preparada para cada série de testes, com concentração de etanol e acetato de etila variando entre  $0,2$  e  $5,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  variando entre  $0,2$  e  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . O tempo de análise foi de  $4,0$  minutos. As amostras, bem como os padrões, foram diluídos, de forma que a concentração se enquadrasse na faixa da curva de calibração.

Foi realizado uma curva de calibração para diacetil nas concentrações que variaram entre  $5$  e  $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , nas mesmas condições utilizadas para a obtenção das curvas de etanol e acetato de etila, contudo, não foram detectados picos deste composto em nenhum dos ensaios fermentativos realizados.

#### 4.5 - Determinação da concentração de acetoína

A concentração de acetoína foi determinada por cromatografia em fase gasosa, usando o mesmo equipamento descrito anteriormente (CG-90), porém, nas seguintes condições:

- \* Gases de arraste: Nitrogênio com fluxo de  $25 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .
- \* Gases da chama: Hidrogênio e ar com vazão de  $35 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e  $300 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  respectivamente.
- \* Temperatura da coluna:  $155^{\circ}\text{C}$
- \* Temperatura do detector:  $230^{\circ}\text{C}$
- \* Temperatura do injetor:  $185^{\circ}\text{C}$
- \* Volume da amostra:  $3,0 \mu\text{L}$

A curva de calibração para acetoína foi preparada com concentrações variando entre  $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  e  $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

A Figura 5 mostra o cromatograma de um padrão injetado

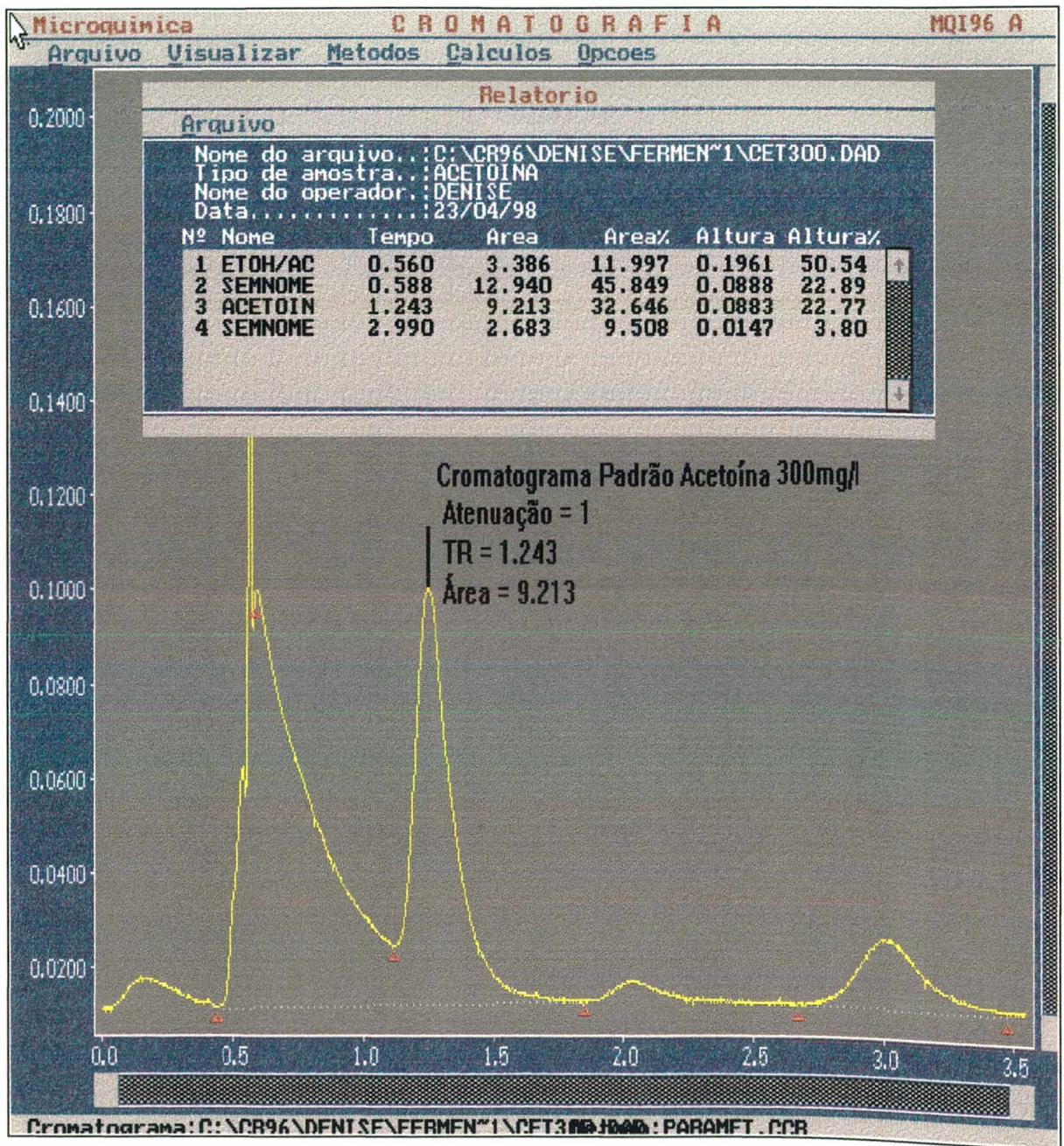


FIGURA 5 - Cromatograma do padrão de acetoína (300 mg.L<sup>-1</sup>).

## 5 - Metodologia utilizada nos cálculos

### 5.1 Fatores de conversão

Fator de conversão de substrato em produtos: ( $g_P \cdot g_S^{-1}$ ) (grama de produto/ grama de substrato consumido).

$$Y_{P/S} = (P_{\max}) / (S_0 - S_f) \quad (5)$$

Fator de conversão de substrato em células : ( $g_X \cdot g_S^{-1}$ ) (grama de células/ g de substrato consumido).

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

Onde:

$X_{\max}$ ,  $P_{\max}$  : valores máximos de concentração de células ( $X_{\max}$ ) ( $g \cdot L^{-1}$ ) e de produto ( $P_{\max}$ ) ( $g \cdot L^{-1}$  ou  $mg \cdot L^{-1}$  dependendo do produto formado), respectivamente.

$X_0$ ,  $S_0$  : valores iniciais de concentração celular ( $g \cdot L^{-1}$ ) e concentração de substrato ( $g \cdot L^{-1}$ ), respectivamente.

$S_f$  : Concentração final do substrato ( $g \cdot L^{-1}$ ).

### 3.5.2 - Produtividade máxima

Produtividade máxima em células ( $g \cdot (L \cdot h)^{-1}$ ) :

$$P_X = (X_{\max}) / t \quad (7)$$

Produtividade máxima em etanol

$$P_{\text{ETOH}} = (P_{\text{ETOHmax}}) / t \quad (8)$$

Produtividade máxima em acetato de etila

$$P_{\text{ETILA}} = (P_{\text{ETILAmáx}}) / t \quad (9)$$

Produtividade máxima em acetoína

$$P_{\text{ACET}} = (P_{\text{ACETmáx}}) / t \quad (10)$$

onde:

t = tempo de fermentação estimado quando o substrato é igual a zero (h) à  $X_{\text{max}}$  ( $\text{g.L}^{-1}$ ).

### 5.3 Velocidades instantâneas e específicas

A partir dos perfis de concentração celular, formação do produto e consumo do substrato com o tempo, foi possível determinar, em cada instante, as velocidades instantâneas de crescimento microbiano ( $dX/dt$ ), formação do produto ( $dP/dt$ ) e consumo de substrato ( $dS/dt$ ).

Dividindo-se as velocidades instantâneas pela concentração celular no ponto, obtêm-se as velocidades específicas de crescimento ( $\mu$ ), formação de produto ( $q_p$ ) e consumo de substrato ( $q_s$ ):

$$\mu = 1/X \, dX/dt \quad (11)$$

$$q_p = 1/X \, dP/dt \quad (12)$$

$$q_s = 1/X \, dS/dt \quad (13)$$

As velocidades instantâneas e específicas de crescimento, formação de produto e consumo de substrato foram determinadas segundo metodologia descrita por LE DUY e ZAJIC (1973). Para isso, foram traçadas curvas suavizadas a partir dos pontos experimentais. O intervalo de tempo, estabelecido para retirada das amostras foi de uma hora nos ensaios realizados em fermentador.

A velocidade específica máxima de crescimento foi calculada através do coeficiente angular da reta obtida plotando-se o logaritmo neperiano da concentração celular em função do tempo, quando o crescimento microbiano estava na sua fase exponencial de crescimento.

## **CAPÍTULO III - RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## CAPÍTULO III - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, estão apresentados e discutidos os resultados obtidos neste trabalho. Primeiramente, são apresentados os resultados de experimentos realizados em tubos de ensaio, objetivando-se o estudo fisiológico das leveduras *Hansenula anomala* (CCT2648), *Hanseniaspora guilliermondii* (CCT3800) e *Kloeckera apiculata* (CCT0774). A seguir estão explicitados os resultados referentes à cinética efetuada em frascos agitados e fermentador, observando principalmente a influência da concentração inicial de glicose sobre o crescimento celular e produção de acetoína.

### 1 - Ensaio preliminares em tubos de ensaio

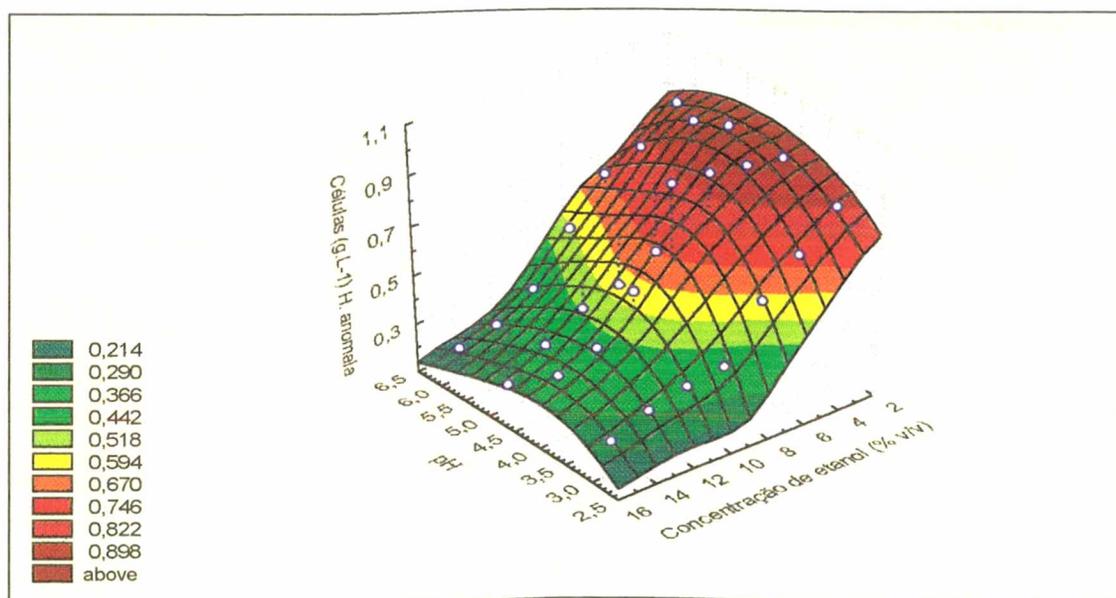
Objetivando-se conhecer algumas características de crescimento celular em meio complexo pelas leveduras utilizadas neste trabalho, *Hansenula anomala*, *Hanseniaspora guilliermondii* e *Kloeckera apiculata*, foram simuladas algumas situações possíveis de ocorrer durante o processo de vinificação, tais como: baixas temperaturas, diferentes concentrações de etanol e diferentes valores de pH. O meio utilizado foi o YM e a concentração inicial de substrato (glicose) manteve-se constante em 15 g.L<sup>-1</sup>.

### 1.1 - Influência da concentração de etanol e pH sobre o crescimento celular

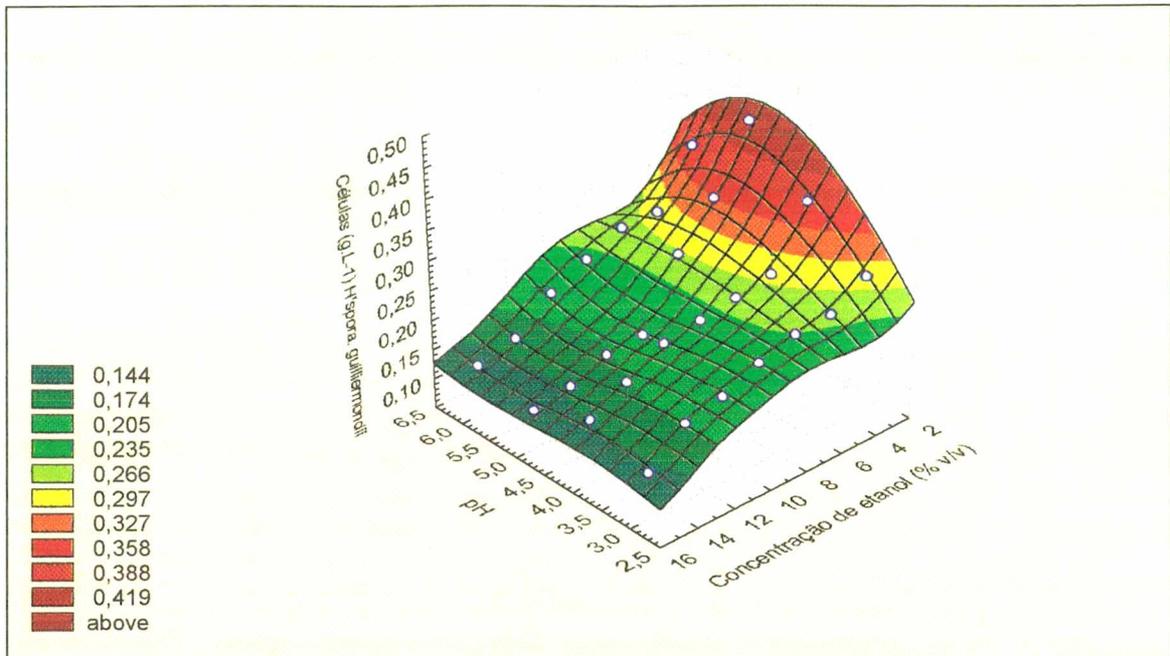
Numa análise multivariada, foi estudado o comportamento fisiológico das leveduras durante quinze dias de experimento quanto à habilidade de tolerar diferentes concentrações de etanol (3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 % v/v), em condições anaeróbicas, variando-se o pH (3,0; 4,0; 5,0; 6,0). O resultado deste estudo indicou o pH inicial de crescimento usado nos experimentos posteriores.

Para este estudo, com base nos resultados encontrados por FLEET *et al.* (1988), fixou-se a temperatura em 10<sup>0</sup>C e variou-se a concentração de etanol (3, 5, 7, 9, 11, 13 e 15 % v/v) e o pH (3,0; 4,0; 5,0 e 6,0).

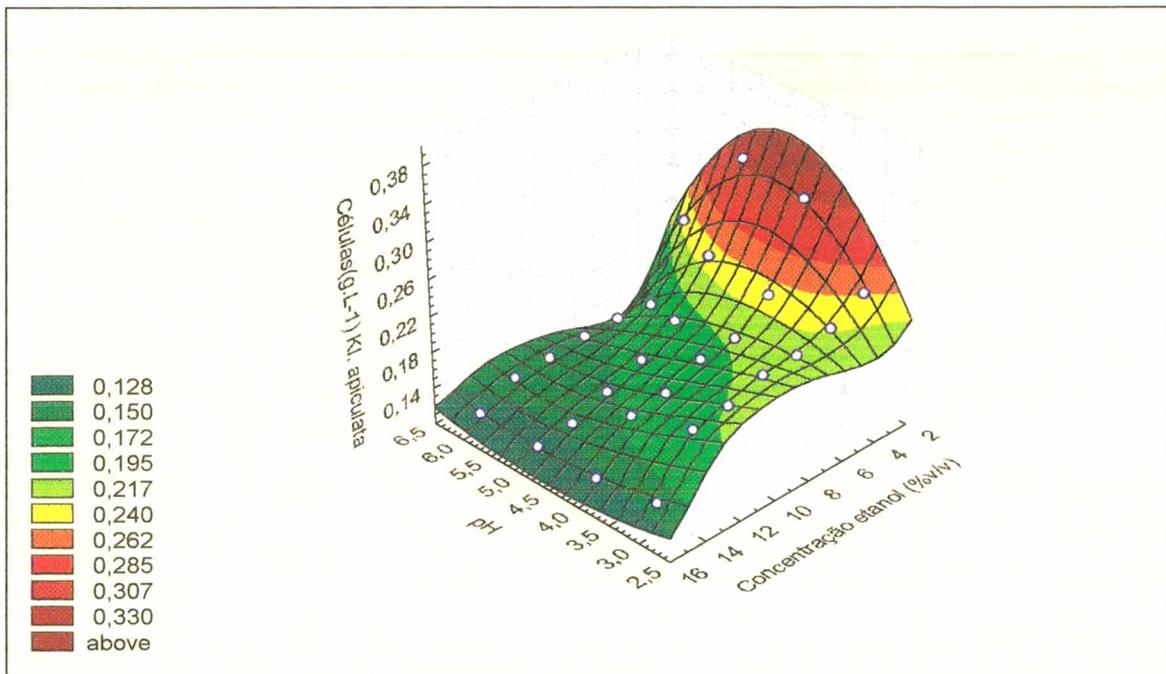
Os resultados encontrados neste estudo estão demonstrados nas Figuras 6 , 7 e 8.



**FIGURA 6 -** Influência do pH e da concentração de etanol sobre o crescimento de *Hansenula anomala* à temperatura de 10<sup>0</sup> C.



**FIGURA 7** - Influência do pH e da concentração de etanol sobre o crescimento de *Hanseniaspora guilliermondii* à temperatura de 10<sup>0</sup> C.



**FIGURA 8** - Influência do pH e da concentração de etanol sobre o crescimento de *Kloeckera apiculata* à temperatura de 10<sup>0</sup> C.

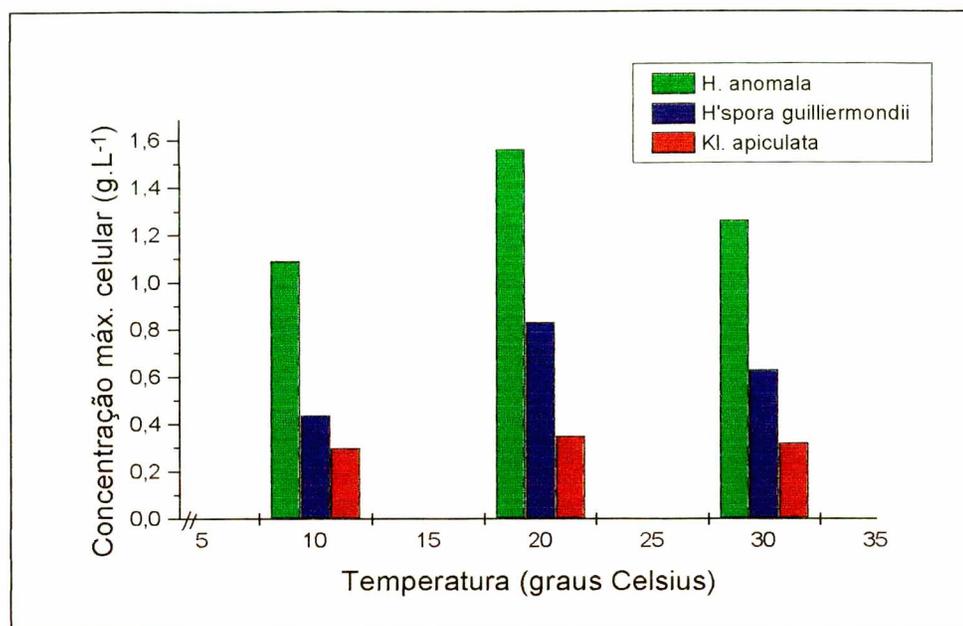
Como demonstram as figuras, o etanol inibiu o crescimento celular das três leveduras, especialmente quando adicionado a altas concentrações. À medida que a concentração deste álcool aumenta, reduz-se o crescimento celular.

As Figuras 6, 7 e 8 mostram que existe uma forte influência do pH sobre o crescimento celular. Esta influência é tão mais acentuada quanto menor for a concentração de etanol no meio. Observa-se uma faixa ótima do pH em torno de 5,0, onde o crescimento é máximo.

Em altas concentrações de etanol, há uma forte inibição do crescimento celular. Nesta região, pouca ou nenhuma influência do pH sobre o crescimento é notada para as três leveduras estudadas.

## **1.2 - Influência da temperatura sobre o crescimento celular**

Com intuito de verificar a influência da temperatura sobre o crescimento celular, realizaram-se experimentos a 10, 20 e 30<sup>0</sup>C, fixando-se, baseado nos resultados obtidos no item 1.1, o pH inicial em 5,0 e a concentração de etanol em 3% (v/v). A concentração inicial de substrato foi mantida constante em 15g.L<sup>-1</sup> de glicose. A Figura 9 apresenta as concentrações celulares máximas obtidas para as três leveduras.



**FIGURA 9 - Influência da temperatura no crescimento das leveduras em meio contendo 3% (v/v) de etanol, pH inicial 5,0 e  $S_i = 15 \text{ g.L}^{-1}$  no período de 5 dias.**

Como demonstra a Figura 9, a melhor temperatura de crescimento para as três leveduras foi de 20°C. *Kloeckera apiculata* teve um menor crescimento nas três temperaturas estudadas em relação às demais leveduras. Provavelmente isto se deva à adaptação às condições estabelecidas. Com efeito, durante o preparo do pré-inóculo (nas mesmas condições de temperatura da fermentação, 10, 20 e 30°C), foi notado um crescimento bem mais lento para esta levedura.

Apesar de se ter observado, pelos resultados apresentados na Figura 9, que a melhor temperatura para o crescimento foi de 20°C, optou-se por adotar 30°C como temperatura de incubação em frascos agitados. A razão desta escolha prende-se principalmente ao fato de

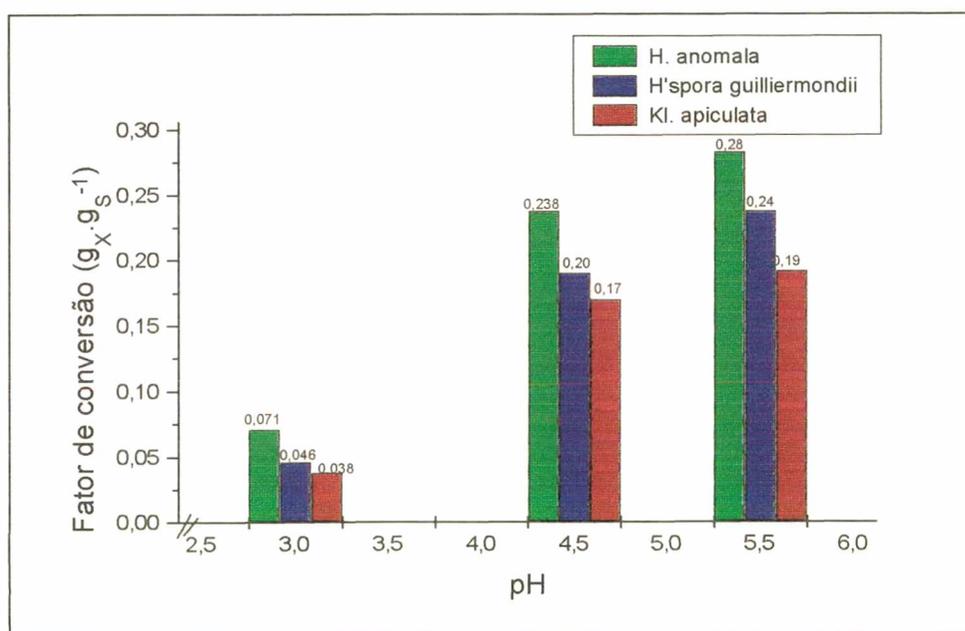
que, segundo AMERINE *et al.* (1979) e BENDA (1981), a melhor produção de acetoina, objetivo principal deste trabalho, ocorre à temperatura de 30<sup>0</sup>C.

## 2 - Ensaio em frascos agitados

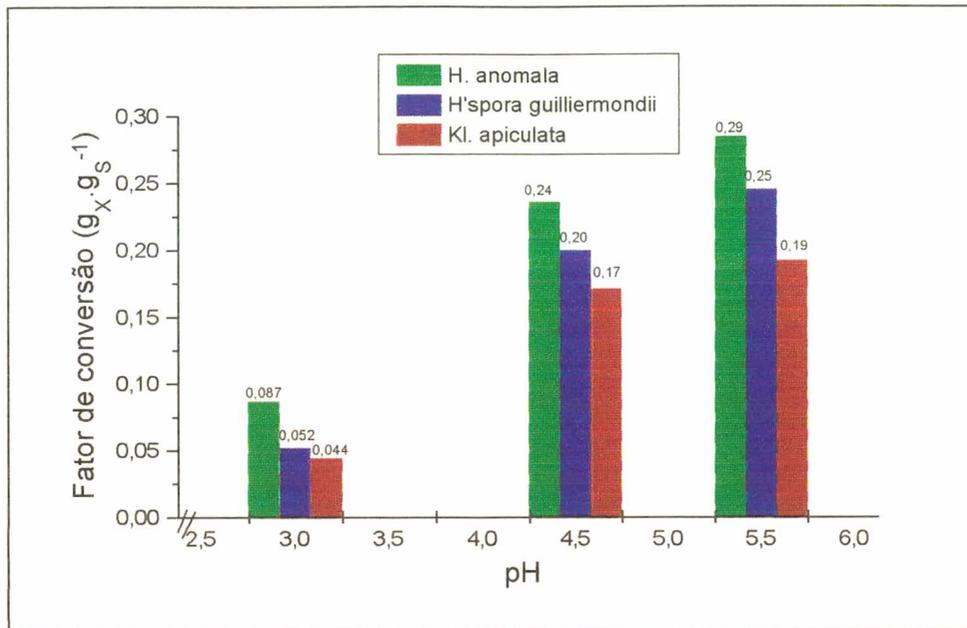
### 2.1 - Influência do pH inicial no crescimento celular

Com o objetivo de investigar a influência do pH inicial sobre o crescimento das três leveduras em estudo, foram realizados ensaios utilizando valores de pH iniciais de 3,0; 4,5; e 5,5 e fazendo variar a concentração inicial de glicose em 15 e 20 g.L<sup>-1</sup>. A temperatura de cada ensaio foi mantida constante à 30<sup>0</sup> C.

As Figuras 10 e 11 apresentam os resultados finais de crescimento celular para as três leveduras nas duas concentrações iniciais de glicose estudadas.



**FIGURA 10** - Influência do pH sobre o fator de conversão de substrato em células para as três leveduras do vinho, à concentração inicial de glicose de 15 g.L<sup>-1</sup>.



**FIGURA 11** - Influência do pH sobre o fator de conversão de substrato em células para as três leveduras do vinho, à concentração inicial de glicose de 20 g.L<sup>-1</sup>.

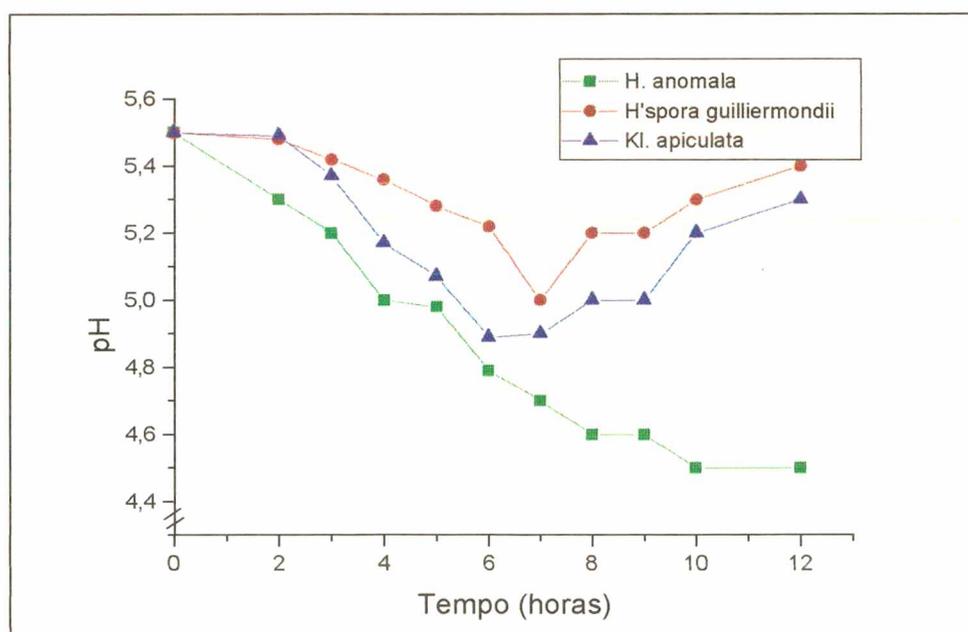
Observa-se, pelos resultados apresentados nestas figuras, que à medida que o pH aumenta (até 5,5 máximo estudado), aumentam também os fatores de conversão de substrato em células para as três cepas analisadas, sendo que a *Hansenula anomala* apresenta o maior fator de conversão ( $Y_{X/S} = 0,29 \text{ g}_X \cdot \text{g}_S^{-1}$ ) em relação às outras duas leveduras, *Hanseniaspora guilliermondii* ( $Y_{X/S} = 0,25 \text{ g}_X \cdot \text{g}_S^{-1}$ ) e *Kloeckera apiculata* ( $Y_{X/S} = 0,19 \text{ g}_X \cdot \text{g}_S^{-1}$ ). Os resultados revelaram que o pH inicial mais indicado ao crescimento, para as duas concentrações iniciais de glicose estudadas, é 5,5.

A influência do pH inicial sobre o fator de conversão é bem mais acentuado que a concentração inicial de glicose. Esta última, na verdade, não apresenta grande diferença quando se passa de 15 para 20 g.L<sup>-1</sup>. Quanto ao pH, por sua vez, as Figuras 10 e 11 permitem

observar que quando se passa de 3,0 para 5,5, ocorrem ganhos no fator de conversão para as três leveduras, e isto, para as duas concentrações iniciais de glicose.

## 2.2 Evolução do pH

Considerando-se que não houve o controle de pH, efetuou-se o monitoramento do pH ao longo do tempo, partindo-se do pH inicial de 5,5. Os resultados estão apresentados na Figura 12, para a concentração de glicose de  $20 \text{ g.L}^{-1}$ .



**FIGURA 12** - Evolução do pH inicial 5,5 em função do tempo em meio contendo  $20 \text{ g.L}^{-1}$  de concentração inicial de glicose para as três leveduras mantidas à temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$ .

Conforme pode-se observar, há uma diminuição no valor do pH de 5,5 para 4,9 e de 5,5 para 5,1 para as leveduras *H'spora guilliermondii* e *Kl. apiculata*, respectivamente. Logo em seguida nota-se uma elevação gradativa até valores de 5,2 para *H'spora*

*guilliermondii* e de 5,4 para *Kl. apiculata*. Esta elevação só ocorre a partir do momento em que o substrato atinge valores desprezíveis. O mesmo comportamento não ocorre com a *H. anomala*. O pH passa de 5,5 para 4,5 no decorrer da fermentação e não se eleva nem mesmo 5 horas após esgotamento total do substrato. Estes resultados aparentemente estão relacionados com o tipo de produto formado. Além do mais, a *H. anomala* tem a capacidade de assimilar outras fontes de carbono, que não seja a glicose, o que não ocorre com as leveduras apiculadas (SMITH, 1984).

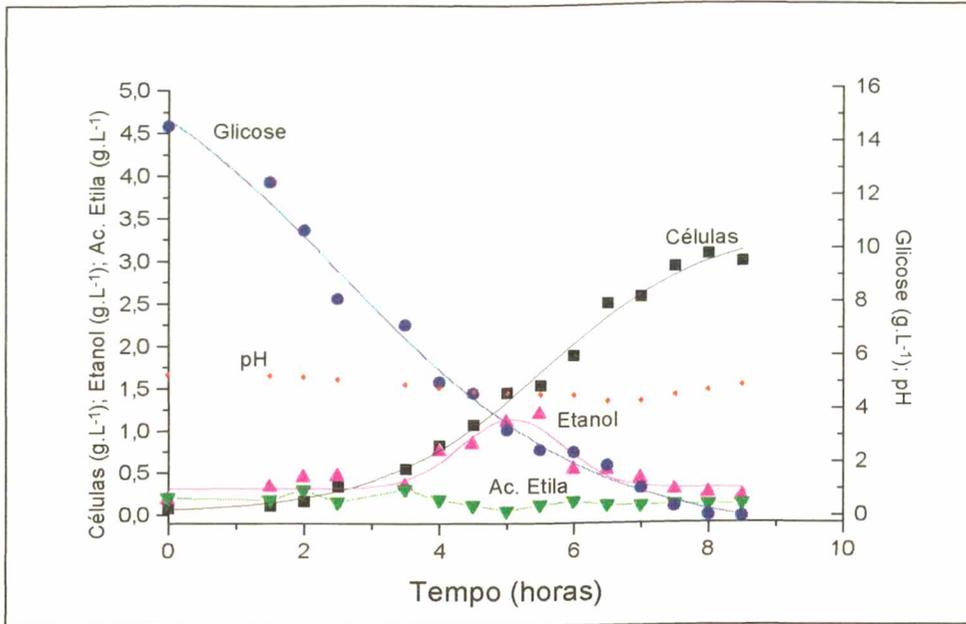
As leveduras apiculadas, além de álcoois superiores, formam acetoína, glicerol, etanol, acetato de etila, ácido succínico e ácido acético. Provavelmente os produtos mais relevantes para o abaixamento do pH sejam o ácido acético e o ácido succínico (CIANI E PICCIOTTI, 1995). Estes produtos são resultantes do metabolismo do piruvato (Anexo 1) e continuam a ser transformados em novos produtos de acordo com a necessidade da célula, razão pela qual ocorre elevação do pH após esgotamento do substrato. Outra hipótese quanto ao aumento do pH é a proteólise dos microrganismos, fenômeno natural que ocorre após esgotamento completo de substrato, principalmente quando estes não utilizam outra fonte de carbono (às vezes etanol resultante do próprio metabolismo celular); como consequência da degradação de proteínas, há formação de amônia e esta pode ser responsável por esta elevação do pH.

### 3 - Ensaio em fermentador

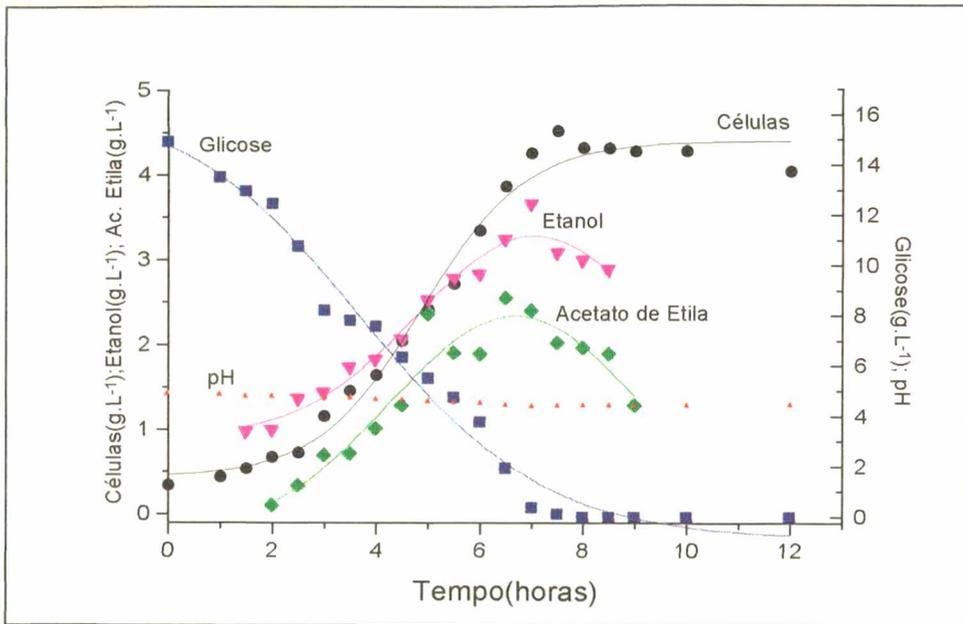
#### 3.1 - Influência da concentração inicial de substrato sobre o crescimento celular.

Foram realizados ensaios em batelada com concentrações iniciais de substrato 15, 20 e 40 g.L<sup>-1</sup>, mantendo-se o mesmo pH inicial, a temperatura e a velocidade de agitação e aeração em 5,5; 30°C e 500 rpm e 1,5 vvm, respectivamente. A velocidade do agitador (500 rpm) foi escolhida por promover uma boa homogeneização do meio e proporcionar uma boa transferência de oxigênio às células. Agitações maiores provocam a formação abundante de espuma no meio de cultivo.

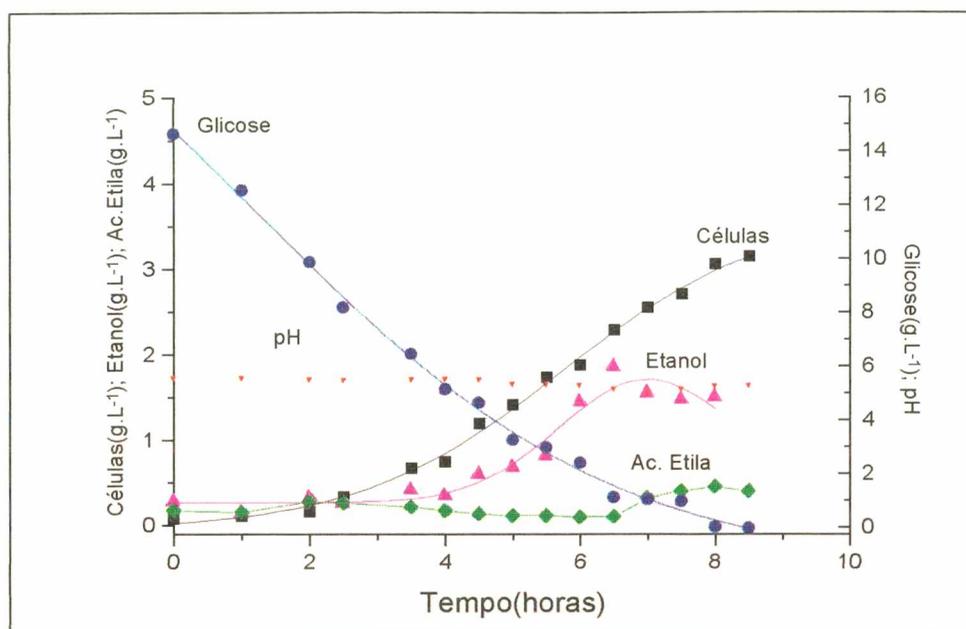
As diferentes concentrações iniciais de glicose foram avaliadas quanto à formação de biomassa e produto (etanol acetato de etila e acetoina) para as leveduras *H'spora guilliermondii*, *H. anomala* e *Kl. apiculata*. Os perfis das curvas de concentrações celulares, acetato de etila e etanol para concentração inicial de glicose de 15 g.L<sup>-1</sup>, nas condições descritas acima, estão representados nas Figuras 13, 14 e 15.



**FIGURA 13** - Cinética de crescimento da levedura *H'spora guilliermondii* em meio YM contendo uma concentração inicial de glicose de 15 g.L<sup>-1</sup> e a 30°C.



**FIGURA 14** - Cinética de crescimento da levedura *H. anomala* em meio YM contendo uma concentração inicial de glicose de 15 g.L<sup>-1</sup> e a 30°C.

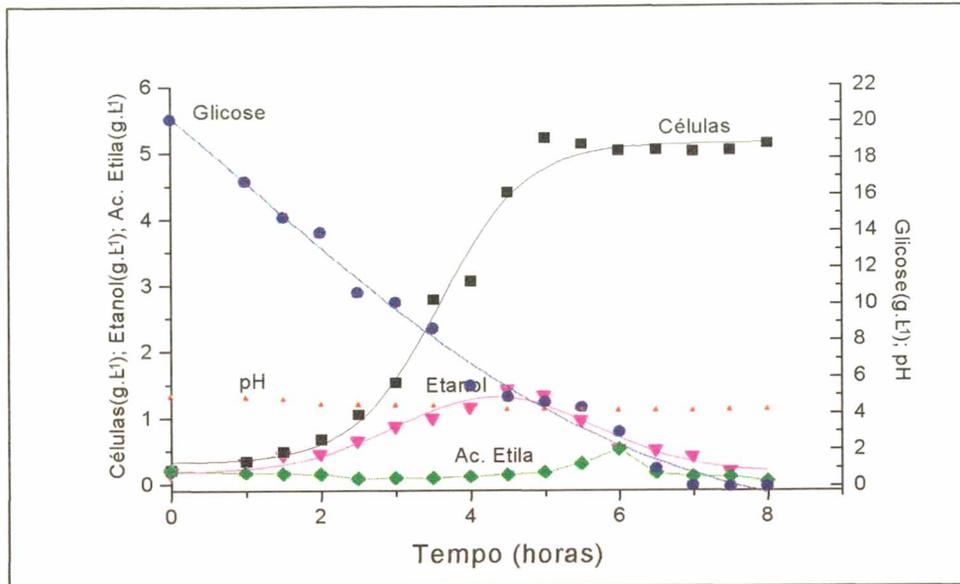


**FIGURA 15 - Cinética de crescimento da levedura *Kl. apiculata* em meio YM contendo uma concentração inicial de glicose de 15 g.L<sup>-1</sup> e a 30°C.**

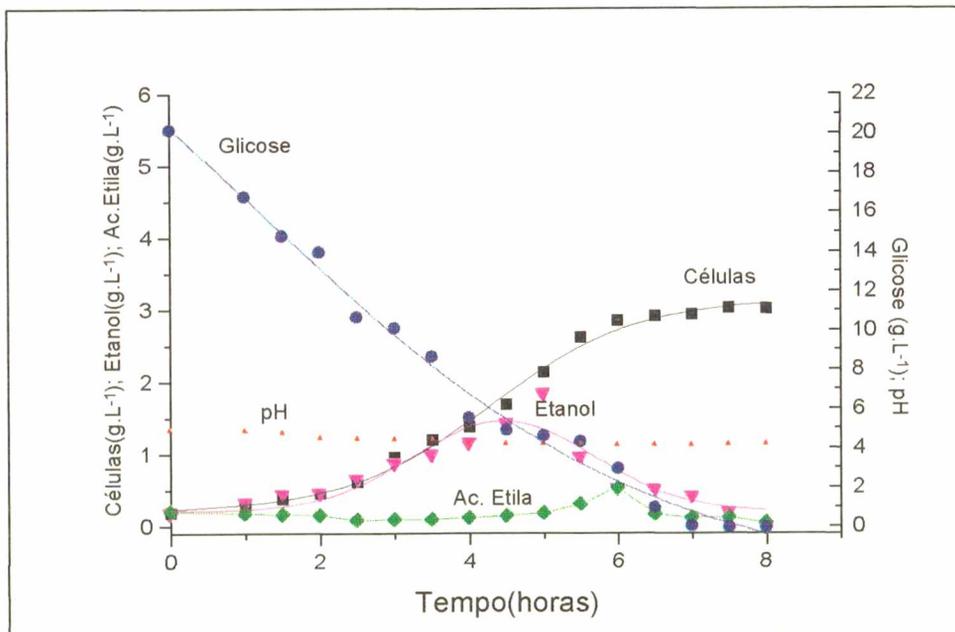
Com base nos resultados apresentados, verifica-se que a curva de crescimento celular das três leveduras é semelhante quanto à formação de biomassa (g.L<sup>-1</sup>), atingindo concentrações máximas ( $X_{max}$ ) em torno de 3 e 4 g.L<sup>-1</sup>. Verifica-se também que a concentração de etanol produzido pela *Hansenula anomala* foi aproximadamente duas vezes maior que aquela produzida pelas outras duas leveduras.

O menor tempo de fermentação (estabelecido quando o substrato foi totalmente consumido) ocorreu com a *H'spora guilliermondii* (aproximadamente 6 horas). *H. anomala* apresentou a maior velocidade específica de crescimento (0,77 h<sup>-1</sup>), coincidindo também com uma menor fase de adaptação (fase lag) que as outras duas leveduras estudadas (tabela 9).

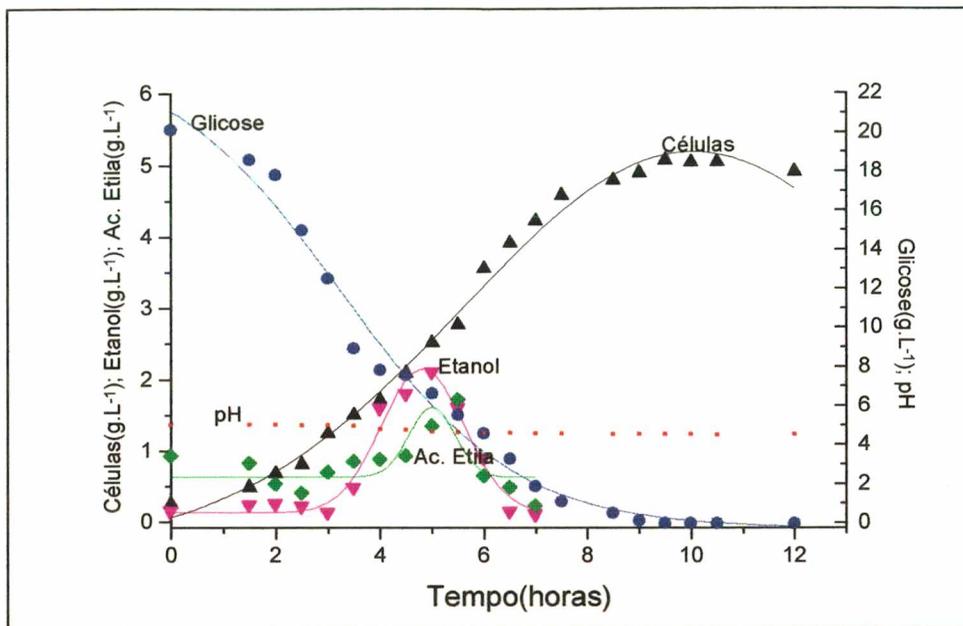
O comportamento cinético destas leveduras numa concentração mais elevada de glicose ( $20 \text{ g.L}^{-1}$ ) está explicitado nas Figuras 16, 17 e 18.



**FIGURA 16** - Cinética de crescimento da levedura *H'spora guilliermondii* em meio YM a  $30^{\circ}\text{C}$  numa concentração inicial de glicose de  $20 \text{ g.L}^{-1}$ .



**FIGURA 17** - Cinética de crescimento da levedura *Kl. apiculata* em meio YM a  $30^{\circ}\text{C}$  numa concentração inicial de glicose de  $20 \text{ g.L}^{-1}$ .



**FIGURA 18** - Cinética de crescimento da levedura *H. anomala* em meio YM a 30°C numa concentração inicial de glicose de 20 g.L<sup>-1</sup>.

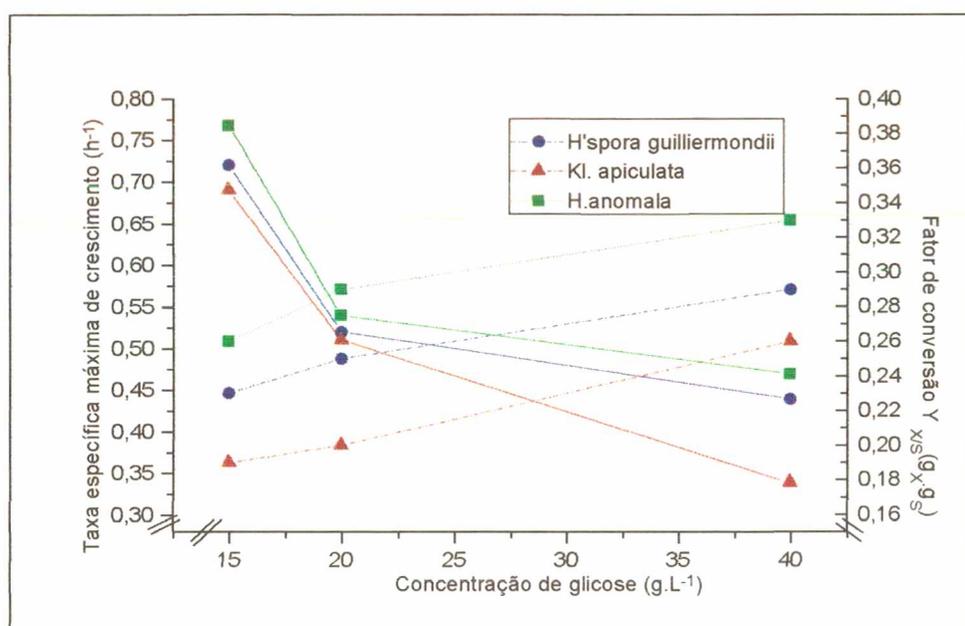
Observa-se que os comportamentos cinéticos são semelhantes para as leveduras apiculadas, o que pode ser explicado pelo fato destas leveduras terem comportamentos fisiológicos semelhantes (MILLER e PHAFF, 1958). *H. anomala* por sua vez, como também observado na concentração inicial de glicose de 15 g.L<sup>-1</sup>, produz maiores concentrações de etanol e acetato de etila que *H'spora guilliermondii* e *Kl. apiculata*.

Nas concentrações de glicose de 15, 20 e 40 g.L<sup>-1</sup>, a 30°C e em pH em torno de 5,5, os valores da velocidade específica máxima ( $\mu_{max}$ ) para *H'spora guilliermondii*, *Kl. apiculata* e *H. anomala* encontram-se resumidos na Tabela 8. As cinéticas de crescimento das três leveduras para concentrações de 40 g.L<sup>-1</sup> de glicose encontram-se no item 3.3.

**TABELA 8-** Resumo dos principais parâmetros cinéticos para as três leveduras, a 30°C, em pH 5,5 e nas concentrações iniciais de glicose de 15, 20 e 40 g.L<sup>-1</sup>.

Concentração inicial de Glicose (g.L <sup>-1</sup> )	15 g.L <sup>-1</sup>		20 g.L <sup>-1</sup>		40 g.L <sup>-1</sup>	
	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	$Y_{X/S}$ (g <sub>X</sub> ·g <sub>S</sub> <sup>-1</sup> )	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	$Y_{X/S}$ (g <sub>X</sub> ·g <sub>S</sub> <sup>-1</sup> )	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	$Y_{X/S}$ (g <sub>X</sub> ·g <sub>S</sub> <sup>-1</sup> )
<i>H. anomala</i>	0,77	0,26	0,54	0,29	0,47	0,33
<i>H'spora guilliermondii</i>	0,72	0,23	0,52	0,25	0,44	0,29
<i>Kl. apiculata</i>	0,69	0,19	0,51	0,20	0,34	0,26

A Figura 19 demonstra a influência da concentração de substrato sobre a velocidade específica máxima de crescimento nas mesmas condições de cultivo (pH 5,5 e a 30°C).



**FIGURA 19** - Velocidade específica máxima de crescimento e fator de conversão substrato em células em função de diferentes concentrações iniciais de glicose.

Conforme pode-se observar, pela Figura 19, as velocidades específicas máximas de crescimento à concentração inicial de 15 g.L<sup>-1</sup>, apresentam valores mais elevados (0,77h<sup>-1</sup>, 0,72h<sup>-1</sup> e 0,69h<sup>-1</sup>) para as leveduras *H. anomala*, *H'spora guilliermondii* e *Kl. apiculata*,

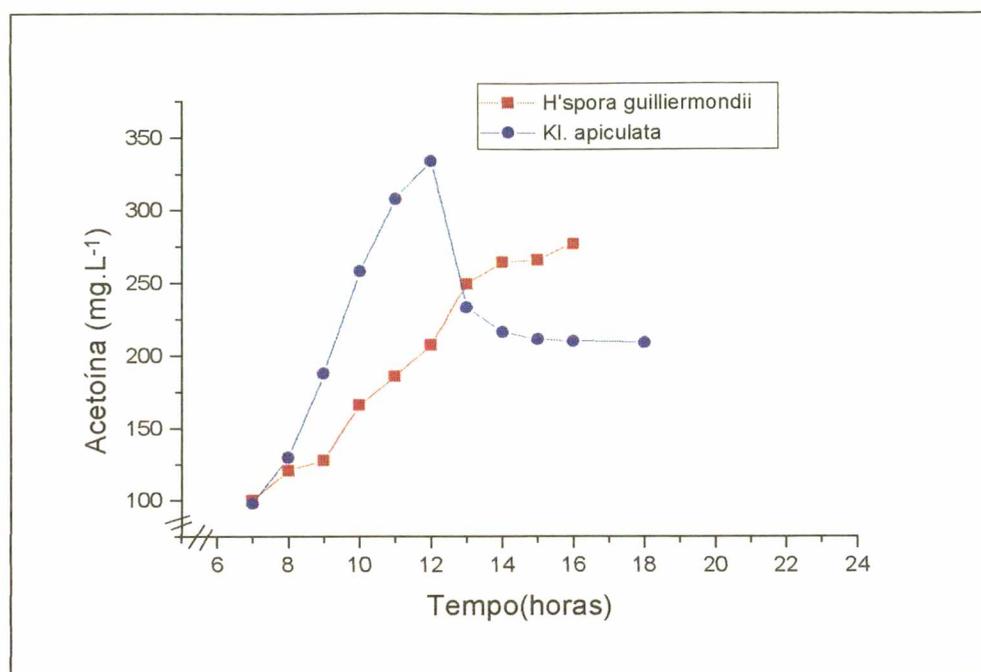
respectivamente, evidenciando um efeito inibidor do crescimento para concentrações maiores de glicose.

Conforme mostra a Figura, o  $Y_{X/S}$  foi influenciado pela concentração inicial de glicose. A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que a concentração de glicose afeta o crescimento destes microrganismos. Observa-se pela Figuras 19 que, embora ocorra uma diminuição das velocidades específicas máximas com o aumento da concentração de glicose, há um aumento do  $Y_{X/S}$  para as três leveduras estudadas.

### **3.2 - Efeito da concentração inicial de glicose na produção de acetoína**

Para determinar a influência da concentração inicial de glicose sobre a produção de acetoína e/ou diacetil pelas três leveduras, foram realizadas fermentações à 30<sup>0</sup>C, pH inicial de 5,5, velocidade de agitação de 500 rpm e aeração 1,5 vvm, usando-se as seguintes concentrações iniciais de substrato (glicose): 10 g.L<sup>-1</sup>, 15 g.L<sup>-1</sup>, 20 g.L<sup>-1</sup> e 40 g.L<sup>-1</sup>. A identificação e a quantificação dos compostos foram realizados por cromatografia gasosa, conforme descrito em materiais e métodos.

Em nenhum dos testes efetuados foi detectada presença de diacetil. Da mesma forma, a presença de acetoína não foi detectada a níveis significativos em fermentações contendo concentrações iniciais de glicose de 10, 15 e 20 g.L<sup>-1</sup>. Para fermentações contendo concentrações de 40 g.L<sup>-1</sup> de glicose inicial, por outro lado, foram encontrados altos níveis de acetoína conforme é observado na Figura 20.

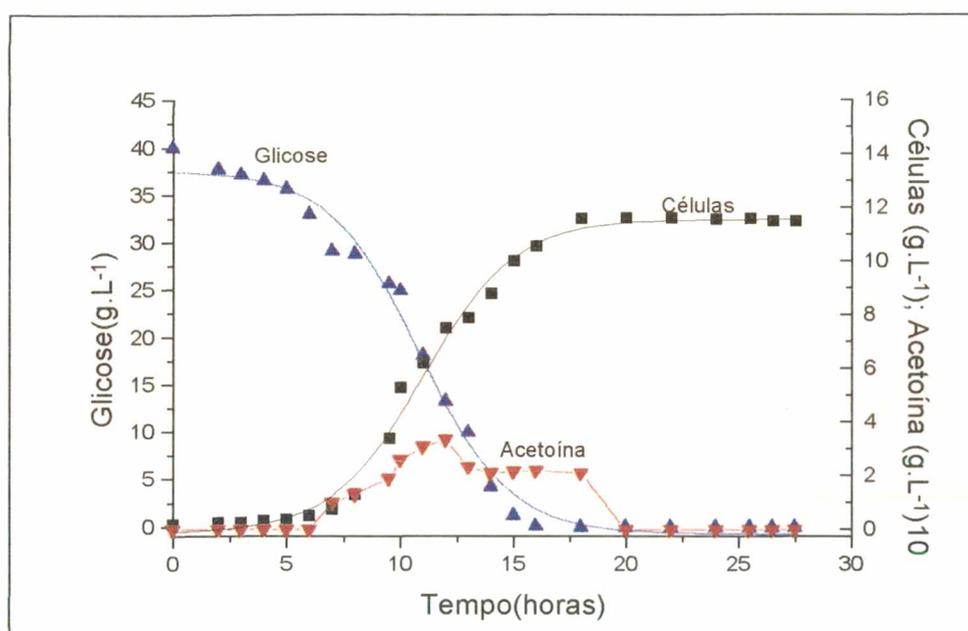


**FIGURA 20** - Evolução da concentração de acetoína em função do tempo para as espécies estudadas à temperatura de 30<sup>o</sup> C e concentração inicial de glicose de 40g.L<sup>-1</sup>. Agitação de 500 rpm e vazão de ar de 1,5 vvm.

A produção de acetoína atingiu valores máximos de 334,0 mg.L<sup>-1</sup> e 277,0 mg.L<sup>-1</sup> após 13 e 17 horas de fermentação para *H'spora guilliermondii* e *Kl. apiculata* respectivamente. Quanto à *H. anomala* nenhuma produção de acetoína foi observada. Sabe-se que algumas leveduras produzem  $\alpha$ -acetolactato, mas não possuem a enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase e não podem formar acetoína a partir do  $\alpha$ -acetolactato por elas produzido (COLLINS, 1972). Provavelmente foi o caso da levedura *H. anomala*.

### 3.3 - Cinéticas de crescimento celular e produção de acetoína a $40 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose inicial

As Figuras 21 e 22 apresentam as cinéticas de crescimento, consumo de substrato e produção de acetoína para as duas leveduras produtoras deste composto, *Hanseniaspora guilliermondii* e *Kloeckera apiculata*.

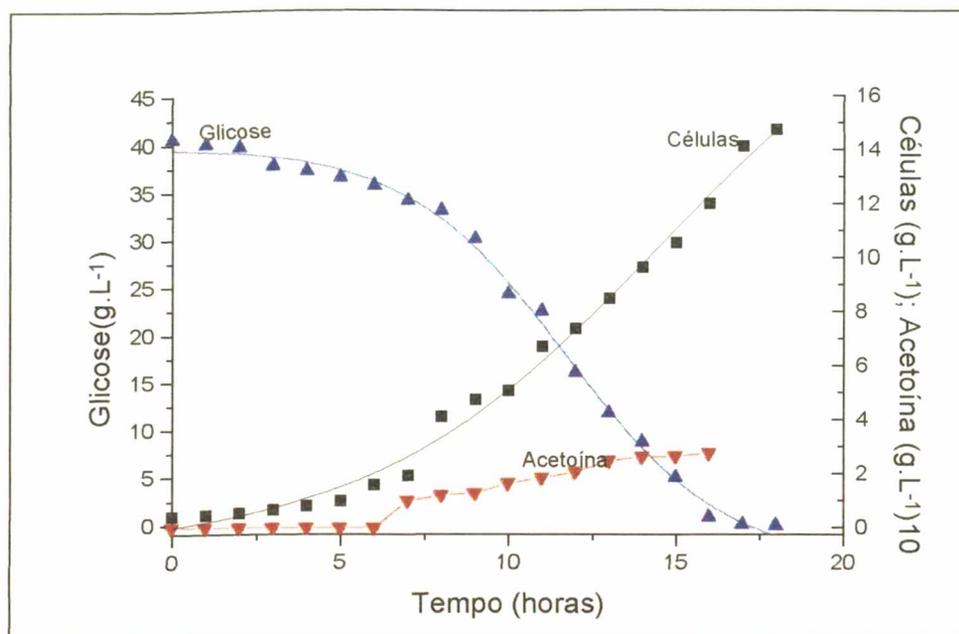


**FIGURA 21** - Cinética de crescimento da *H'spora guilliermondii* em meio YM com  $40 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose inicial a  $30^{\circ}\text{C}$ .

Conforme demonstra a Figura 21, a produção de acetoína começou a ser detectada aproximadamente após 7 horas de fermentação. Neste ponto, a concentração de glicose estava em torno de  $30 \text{ g.L}^{-1}$ . A concentração máxima de acetoína ( $334 \text{ mg.L}^{-1}$ ) foi atingida após 13 horas do início do processo fermentativo. Neste ponto a concentração de glicose observada era de aproximadamente  $12 \text{ g.L}^{-1}$ .

Nestas condições, observou-se para a *H'spora guilliermondii* que a velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{max}$ ) foi igual a  $0,44 \text{ h}^{-1}$ . A produtividade máxima de células foi de  $0,63 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ , e a produtividade máxima em acetoína  $0,028 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ . Valores de  $0,29 \text{ g}_X \cdot \text{g}_S^{-1}$  e  $0,0085 \text{ g}_P \cdot \text{g}_S^{-1}$  foram determinados para o fator de conversão de substrato em células e o fator de conversão de substrato em produto (acetoína), respectivamente. A fase exponencial de crescimento celular termina em torno de 12 horas, quase coincidindo com o tempo de produção máxima de acetoína (Anexo 4). Os resultados dos parâmetros cinéticos estão resumidos na Tabela 10 e o gráfico de determinação da velocidade específica máxima de crescimento encontra-se no Anexo 4.

A Figura 21 mostra ainda, uma possível associação da produção de acetoína com o crescimento celular. De fato, observa-se que a curva de formação de produto, que começa a ocorrer em torno de 7 horas após o início de fermentação, tem dentro de certos limites, uma forma semelhante à da curva de crescimento celular. O mesmo foi observado para *Kl. apiculata* (Figura 22).



**FIGURA 22** - Cinética de crescimento da *Kl. apiculata* em meio YM com 40g.L<sup>-1</sup> de glicose inicial a 30°C.

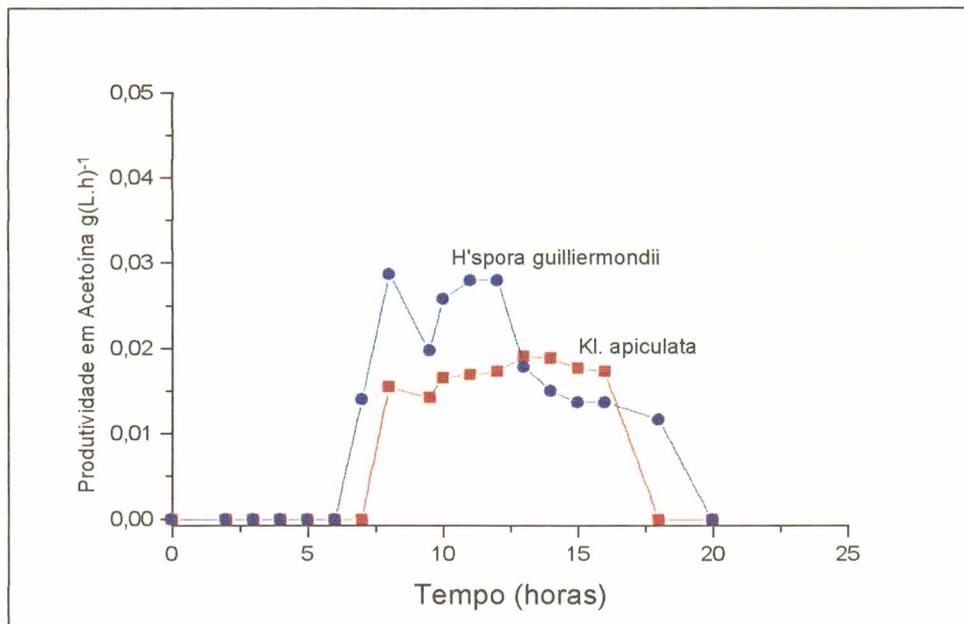
A velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\max}$ ) para *K. apiculata* foi igual a 0,34 h<sup>-1</sup> e a maior concentração de acetoína encontrada foi de 277 mg.L<sup>-1</sup> após 16 horas do início da fermentação. O fator de conversão de substrato em células e substrato em produto foi de 0,26 g<sub>X</sub>.g<sub>S</sub><sup>-1</sup> e 0,0069 g<sub>P</sub>.g<sub>S</sub><sup>-1</sup> respectivamente. Para a produtividade máxima em células e produtividade máxima em acetoína os valores encontrados são: 0,58 g.(L.h)<sup>-1</sup> e 0,017 g.(L.h)<sup>-1</sup> respectivamente.

Nota-se, nestas duas cinéticas de crescimento uma semelhança quanto ao tempo de início de produção de acetoína e a concentração de glicose no momento em que a acetoína começa a ser detectada. Para as duas leveduras, o início da formação de acetoína foi similar, isto é, no tempo igual a 7 horas, e a concentração de glicose de aproximadamente 30 g.L<sup>-1</sup>.

Porém, a velocidade de formação de acetoina e a concentração máxima desta molécula foram diferentes. A *Kl. apiculata* apresentou valores máximos deste produto em 16 horas (aproximadamente) enquanto que *H'spora guilliermondii* mostrou um pico máximo em aproximadamente 12 horas de fermentação.

Estes dados sugerem que sejam realizadas fermentações com concentração inicial de  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose nos trabalhos futuros, para que esta cinética seja melhor avaliada.

A Figura 23 representa a produtividade em acetoina para as duas leveduras.



**FIGURA 23 - Produtividade máxima em acetoina, em função do tempo, para as leveduras *H'spora guilliermondii* e *Kl. apiculata*.**

Conforme demonstra a Figura 23, a levedura *H'spora guilliermondii* apresenta maior produtividade em acetoina que a *Kl. apiculata*, atingindo, respectivamente, valores de  $0,028 \text{ g.(L.h)}^{-1}$  e  $0,017 \text{ g.(L.h)}^{-1}$ .

A Tabela 9 mostra os fatores de conversão, a taxa específica de crescimento máxima, e as produtividades máximas referentes às leveduras *H'spora guilliermondii* e *Kl. apiculata*.

**TABELA 9 - Parâmetros cinéticos para as duas leveduras apiculadas para a concentração de glicose de 40 g.L<sup>-1</sup>, pH 5,5, temperatura 30°C e vazão de ar de 1,5 vvm.**

MICROORGANISMO	Y <sub>X/S</sub> g <sub>x</sub> ·g <sub>s</sub> <sup>-1</sup>	Y <sub>P/S</sub> g <sub>p</sub> ·g <sub>s</sub> <sup>-1</sup>	μ <sub>max</sub> h <sup>-1</sup>	P <sub>X</sub> g·(L.h) <sup>-1</sup>	P <sub>ACET</sub> g·(L.h) <sup>-1</sup>
<i>H'spora guilliermondii</i>	0,29	0,0085	0,44	0,63	0,028
<i>Kl. apiculata</i>	0,26	0,0069	0,34	0,58	0,017

Comparando os parâmetros cinéticos das duas leveduras apiculadas, nota-se que a *H'spora guilliermondii* apresenta valores mais altos em todos os casos. Estes resultados indicam que esta é a levedura de escolha para a produção de acetoína.

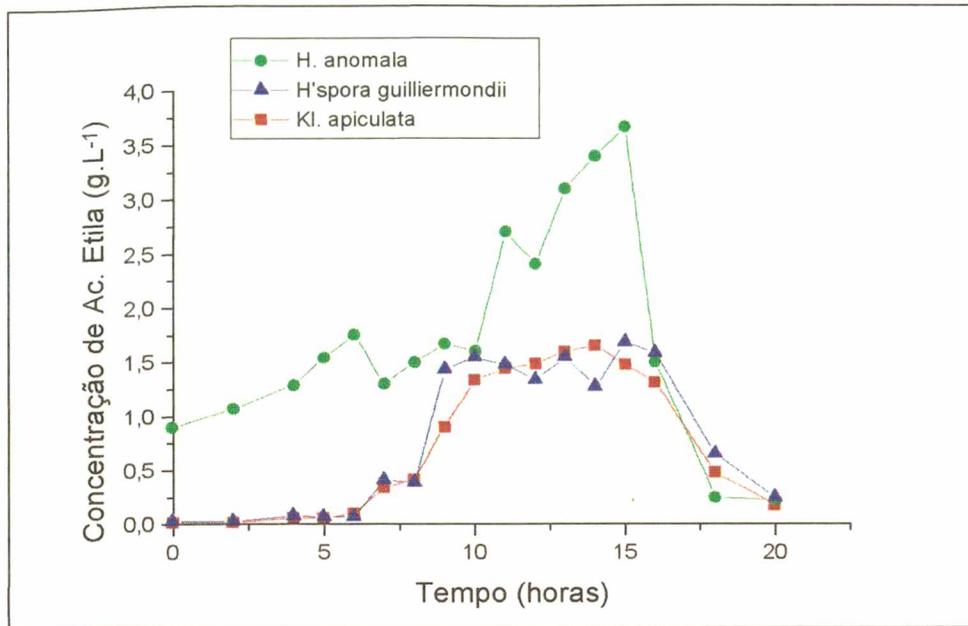
Segundo ROMANO *et al.*(1993), 96 leveduras selvagens foram isoladas do mosto da uva, sendo 48 cepas de *Hanseniaspora guilliermondii* e 48 cepas de *Kloeckera apiculata* produziam cerca de 200 mg.L<sup>-1</sup> de acetoína em mosto de uva, cinco vezes mais que em meio sintético (meio de cultivo proposto por WICKERHAM com 50 g.L<sup>-1</sup> de glicose - Anexo 2). Se compararmos com os resultados obtidos neste estudo (344 e 277 mg.L<sup>-1</sup> de acetoína para *H'spora guilliermondii* e *Kl. apiculata* respectivamente), houve um aumento significativo quanto à produção de acetoína por estas leveduras em meio complexo, usando 40 g.L<sup>-1</sup> de glicose. Talvez tal fato tenha ocorrido devido às condições de cultivo serem muito diferentes. Nos trabalhos destes autores, o pH utilizado foi 2,85, a temperatura de incubação em frascos

Nos trabalhos destes autores, o pH utilizado foi 2,85, a temperatura de incubação em frascos foi de 20<sup>0</sup>C sem agitação por 20 dias. Conforme relatado anteriormente, baixos valores de pH induzem a baixas concentrações celulares. Se a produção de acetoína estiver mesmo relacionada ao crescimento celular, pH abaixo de 3,0 produzirá menor concentração deste produto. Além do mais, relatos bibliográficos (AMERINE *et al.*, 1979), indicam que a temperatura ideal de produção deste aroma foi de 30 - 35<sup>0</sup> C.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a agitação, aeração, temperatura de incubação, pH e concentração inicial de glicose têm grande influência para a produção de acetoína. Como não foi encontrado na literatura resultados do cultivo dessas leveduras em fermentador, sugere-se que novos estudos sejam realizados para que os parâmetros cinéticos aqui apresentados possam ser confrontados.

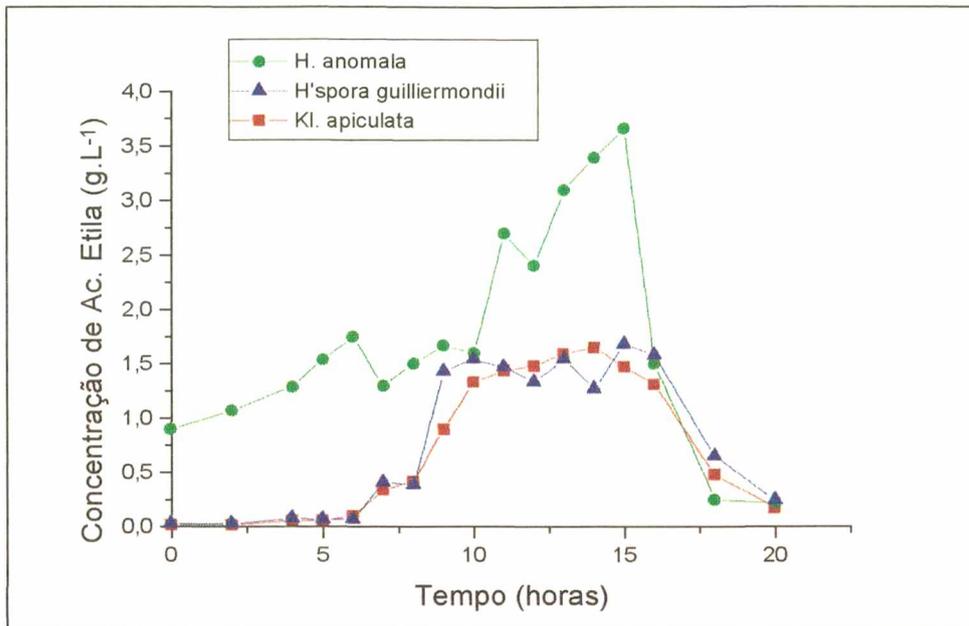
### **3.4 - Produção de etanol e acetato de etila**

A concentração de etanol e teor de acetato de etila produzidos pelas leveduras numa concentração inicial de glicose de 40 g.L<sup>-1</sup> foram avaliados. As Figuras 24 e 25 demonstram as diferentes concentrações destes produtos encontrados .



**Figura 24 - Etanol formado pelas leveduras ( $S_i = 40 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 5,5$ , temperatura de  $30^\circ \text{C}$ ).**

As leveduras *H'spora guilliermondii*, *Kl. apiculata* e *H. anomala* produziram etanol a uma concentração máxima de  $3,6 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $4,3 \text{ g.L}^{-1}$  e  $4,4 \text{ g.L}^{-1}$  respectivamente. O fator de conversão de glicose em etanol nestas condições de cultivo foram  $0,090 \text{ g}_{\text{ETOH}} \cdot \text{g}_S^{-1}$  para *H'spora guilliermondii*,  $0,10 \text{ g}_{\text{ETOH}} \cdot \text{g}_S^{-1}$  para *Kl. apiculata* e  $0,11 \text{ g}_{\text{ETOH}} \cdot \text{g}_S^{-1}$  para *H. anomala*.



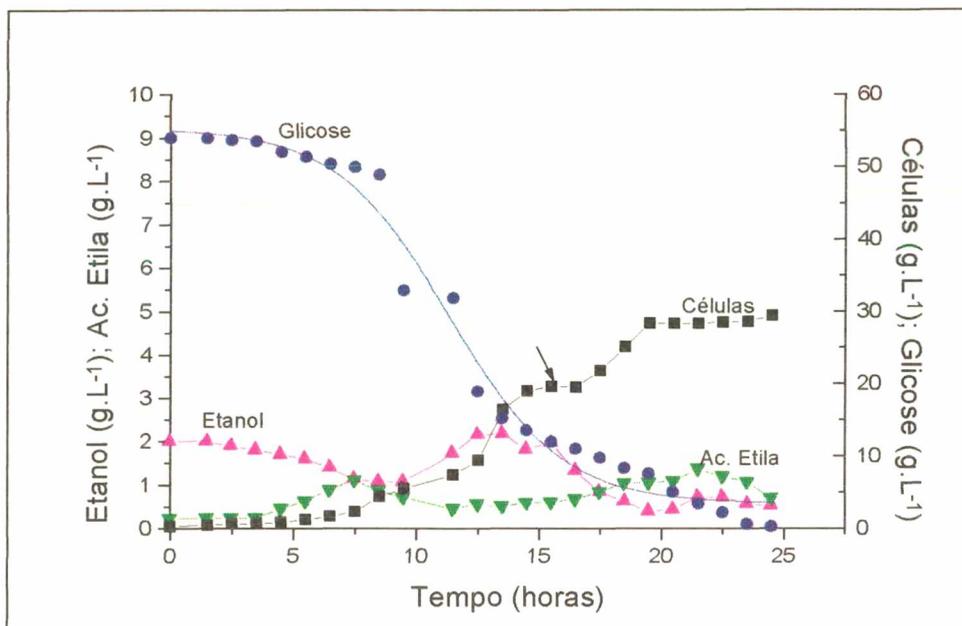
**FIGURA 25 - Produção de acetato de etila (g.L<sup>-1</sup>) pelas três leveduras (S<sub>i</sub>= 40 g.L<sup>-1</sup>, pH= 5,5, temperatura de 30<sup>o</sup> C).**

Concentrações de 1,3 g.L<sup>-1</sup> de acetato de etila foram detectadas quando 40 g.L<sup>-1</sup> de glicose foram completamente consumidos pela *H'spora guilliermondii*. Níveis semelhantes deste produto foram encontrados pela *Kl. apiculata* (1,1 g.L<sup>-1</sup>) nas mesmas condições de cultivo.

*H. anomala* produziu mais acetato de etila que as leveduras apiculadas (3,6 g.L<sup>-1</sup>). QURESHI e TAMHANE (1987) e PASTORE (1994), fazem menção a esta levedura como boa formadora deste produto. Células imobilizadas desta levedura produzem concentrações na ordem de 40 g.L<sup>-1</sup> de acetato de etila em processos fermentativos contínuos.

### 3.5 - Influência da sacarose e glicose na produção de acetoína.

Com a finalidade de estudar uma possível influência da sacarose no crescimento celular e viabilizar um processo industrial de produção de acetoína, foi realizado um experimento tendo como substrato inicial  $50 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose e  $50 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose nas mesmas condições de cultivo das fermentações anteriores (temperatura, velocidade de agitação pH e aeração de  $30^{\circ} \text{ C}$ , 500 rpm e 5,5 e 1,5 vvm, respectivamente). A levedura escolhida foi a que melhor comportamento apresentou quanto à produção de acetoína (*H'spora guilliermondii*). A Figura 26 mostra a cinética de crescimento para estas condições.



**FIGURA 26** - Cinética de crescimento da *H'spora guilliermondii* em batelada à concentração de substrato inicial de  $100 \text{ g.L}^{-1}$  (glicose e sacarose) à temperatura de  $30^{\circ} \text{ C}$ , pH 5,5, 500 rpm de agitação no fermentador e 1,5 vvm de vazão de ar.

A Figura 26 mostra uma diauxia entre aproximadamente 14 e 17 horas de fermentação. Segundo MILLER e PHAFF (1958) e VAN RIJ GRONINGEN (1984), esta levedura não utiliza a sacarose como fonte de carbono. Nota-se também, uma alta concentração celular (aproximadamente  $30 \text{ g.L}^{-1}$ ), tal fato, indica uma maior disponibilidade de substrato, o que nos leva a acreditar que houve uma diauxia entre a glicose (glicose adicionada mais a glicose proveniente da hidrólise da sacarose, ocorrida após autoclavagem) e frutose (fruto da hidrólise da sacarose).

Observa-se pela figura, que a duração da fase de crescimento na segunda curva é menor que a primeira, isto é indicativo que a concentração do segundo açúcar (frutose) é menor que a concentração do primeiro (glicose).

Novos estudos devem ser realizados para determinar se existe a possibilidade da adição de glicose ao meio, induzir a assimilação de sacarose por esta levedura. Pode ser que a glicose seja um indutor para o sistema enzimático da *H'spora guilliermondii*. Não se possuem dados bibliográficos para afirmar esta hipótese, uma vez que no processo de classificação de leveduras não se emprega dois açúcares diferentes ao mesmo tempo e sim um açúcar por vez.

Os resultados encontrados também indicam que houve uma inibição na produção de acetoína, pois não foi detectada a presença deste produto pelas técnicas analíticas utilizadas. Provavelmente esta inibição ocorreu pelo excesso de substrato contido no meio de cultivo, desviando talvez a via metabólica.

## **CAPÍTULO IV - CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**

## CAPÍTULO IV - CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

As principais conclusões que se pode tirar deste trabalho são as seguintes:

- O comportamento cinético das leveduras *H'spora guilliermondii*, *Kl. apiculata* e *H. anomala* é influenciado pelo pH inicial, temperatura, concentração de etanol e concentração inicial de substrato.
- O etanol se comporta como inibidor de crescimento celular.
- O aumento na concentração de substrato reduz o  $\mu_{\max}$  e aumenta  $Y_{X/S}$ .
- O valor de pH ótimo para o crescimento celular se situa em torno de 5,0.
- Em condições anaeróbicas, as leveduras mostraram melhor crescimento a 20<sup>o</sup>C.
- *H. anomala* apresenta, em termos de  $\mu_{\max}$ ,  $Y_{X/S}$  e produção de acetato de etila, maior atividade que as demais estudadas.
- Fermentações conduzidas por *H. anomala* não proporciona acúmulo de acetoína no meio de cultura.
- *H'spora guilliermondii* pode ser considerada a levedura de escolha para produção e acúmulo de acetoína no meio.
- A formação de acetoína apresenta uma fase de demora da ordem de 7 horas e é estimulada com o aumento da concentração de substrato (glicose).
- A produção de acetoína tem se mostrado associado ao crescimento.

Os resultados deste trabalho levaram a uma série de *questionamentos*, que poderão ser abordados na continuidade deste estudo.

- ◆ Os ensaios fermentativos foram realizados em batelada, sugere-se a avaliação do melhor processo fermentativo para produção de acetoína (como batelada alimentada ou contínuo).
- ◆ Novos estudos são necessários em relação ao controle do pH no processo fermentativo, uma vez que a evolução do pH foi espontânea nos ensaios realizados neste trabalho.
- ◆ Outras técnicas de quantificação de acetoína, como sensores *on-line* de compostos voláteis e técnicas colorimétricas, poderiam ser avaliadas e comparadas com as técnicas utilizadas neste estudo.
- ◆ A otimização do meio de cultivo se faz necessário para as leveduras produtoras de acetoína, talvez por técnicas de planejamento experimental, já que duas variáveis foram determinadas neste estudo (pH inicial e concentração inicial de glicose).
- ◆ Sugere-se estudar também o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $K_{La}$ ), na intenção de aumentar a produtividade em acetoína, já que a aeração é um fator fundamental à produção deste composto.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMERINE, M. A.; BERG, H. W.; KUNKEE, R. E.; OUGH, C. S.; SINGLETON, V. L.; WEBB, A. D. **The Technology of Wine Making**. 4<sup>th</sup> ed. Avi Publishing Company, Inc. 1979. 161-239.
- ANONYME (1997): MANUAL DA IFF ESSÊNCIAS E FRAGÂNCIAS LTDA.
- ANTINONE, M.J.; LAWLESS, H.T; LEDFORD, R.A.; JOHNSTON, M; **Diacetyl as a Flavor Component in Full Fat Cottage Cheese**. Journal of Food Science vol. **59**, n<sup>o</sup>1. 1994. 38-42.
- ANTONIONE,C. **Ciò che si sa e ciò che si ignora sul chimismo della fermentazione alcolica**. Riv. Vitic. Enol 1951 **4**: 183-196 apud ROMANO, P.; SUZZI. G. **Origin and Production of Acetoin during Wine Yeast Fermentation - Minireview**. Applied and Environmental Microbiology. 1996. 309-315.
- BASSIT, N.; BOQUIEN, C.; PICQUE, D.; CORRIEU, G.; **Effect of Initial Oxygen Concentration on Diacetyl and Acetoin Production by *Lactococcus lactis ssp. lactis* biovar diacetylactis**. Applied and Environmental Microbiology, June. 1993. **59**: 1893-1897.
- BAUMES, R.; CORDONNIER, R.; NITZ, S.; DRAWERT, F.; **Identification and Determination of Volatile Constituents in Wines from Different Vine Cultivars**. J. Sci. Food. Agric. 1986. **37**: 927-943.
- BENDA, I. Wine and brandy. In **Prescott and Dunn's Industrial Microbiology** ed. Reed, G. 1981. pp. 293-402. AVI: Westport, Connecticut.
- BERGER, R.G. **Aroma Biotechnology** 1 st. Ed. Berlin: Springer-Verlag, 1995, 239p.
- BORZANI, W., LIMA, U.A., AQUARONE, E., **Alimentos e Bebidas Produzidos por Fermentação**. Ed. Edgard Blücher Ltda. Vol. 5 . 1983.
- CALDWELL, D. R.; **Microbial Physiology Metabolism**. Ed. Wm. C. Brown Publishers. 1995. 353p.
- CARIDI, A. TINI, V. BENEVELLI, M.. **Caratteristiche Enologiche di *Hanseniaspora guilliermondii***. Vini d'Italia. 1991. **33**: 51-57.
- CHUANG, L. F., COLLINS, E.B., **Biosynthesis of diacetyl in bacteria and yeast**. J. Bacteriol. 1968. **95**: 2083-2089.

- CIANI, M.; PICCIOTTI, G. **The Growth Kinetics and Fermentation Behaviour of Some Non-Saccharomyces Yeasts Associated With Wine-Making.** *Biotechnology Letters*. 1995. 17: 1247-1250.
- COLLINS, E. B. **Biosynthesis of Flavor Compounds by Microorganisms.** *Journal of Dairy Science*, 1972. 55: 1022-1028.
- CROWELL, E. A.; GUYMON, J.F.; **Influence of Aeration and Suspended Material on Higher Alcohols, Acetoin and Diacetyl during Fermentation.** *Am. J. Enol. Vitic.* 1963. 14: 214-222.
- DEIANA, P.; CECCHI, R.; LODI, E. BERARDI, G. **Some Aspects of Diacetyl and Acetoin Production by *Debaryomyces hansenii*.** *Ital. J. Food Sci.* 1992. 1: 35-42.  
Apud ROMANO, P.; SUZZI, G. **Origin and Production of Acetoin during Wine Yeast Fermentation - Minireview.** *Applied and Environmental Microbiology*. 1996. 309-315.
- DETTWILER, B.; DUNN, I.J.; HEINZLE, E.; PRENOSIL, J.E.; **A Simulation Model for the Continuous Production of Acetoin and Butanediol Using *Bacillus subtilis* with Integrated Pervaporation Separation.** *Biotechnology and Bioengineering*, 1993. vol. 41, p. 791-800.
- DOMERCQ'S, S. **Étude et classification des levures de vin de La Gironde.** *Ann. Technol. Agric.* 6. 1957. 5-58: 139-183 apud GAO,C.; FLEET, G.H. **The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*.** *Journal of Applied Bacteriology*, 1988. 65, 405-409.
- ETIEVANT, C. BLANC, P. GOMA, G. **Les Arômes. Produits chimiques ou naturels?** *INRA Mensuel*, 1991. 58: 28-32 apud FABRE, C. **Nouveaux Procédés de Production D'Arômes Naturels par Bioconversion.** Toulouse: L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUÉES DE TOULOUSE, 1996. 202p. These ( Doctorat spécialité Biologie et Génétique Moléculaires Et Cellulaires - Biotechnologie), 1996.
- FABRE, C. E.; DUVIAU, BLANC, P.J.; GOMA, G.. **Identification of Volatile Flavour Compounds Obtained in Culture of *Kluyveromyces marxianus*.** *Biotechnology Letters*, 1995. 17: 1207-1212.
- FABRE, C. **Nouveaux Procédés de Production D'Arômes Naturels par Bioconversion.** Toulouse: L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUÉES DE TOULOUSE, 1996. 202p. These ( Doctorat spécialité Biologie et Génétique Moléculaires Et Cellulaires - Biotechnologie), 1996.

- FARTAS, J. **Processes during the maturing of wine.** In Technology and Biochemistry of wine, 1988.
- FLEET, G.H., LAFON-LAFOURCADE, S. e RIBÉREAU-GAYON, P. **Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines.** Applied and Environmental Microbiology. 1984. **48**, 1034-1038.
- FRAZIER, W.C., WESTHOFF, D.C. **Food Microbiology.** Third Edition, McGraw-Hill Book Company. 1979.
- GALVAN, L.A., PEREZ, M. DELGADO, CONDE, J. **Diacetyl production with sulfometuron resistant mutants of brewing yeast,** p. 385. Apud ROMANO, P.; SUZZI, G. **Origin and Production of Acetoin during Wine Yeast Fermentation - Minireview.** Applied and Environmental Microbiology. 1987. 309-315.
- GATFIELD, I.L.; HAARMANN & REIMER GMBH, HOLZMINDEN, GERMANY; **Enzymatic and Microbial Generation of Flavors.** 1995. Allured Publishing Corp., Perfumer e Flavorist.
- GAO, C.; FLEET, G.H. **The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*.** Journal of Applied Bacteriology, 1988. **65**. 405-409.
- GAROGLIO, P. G. **La nova enologia.** Firenze, Stiante - Sancasciano, 1959. P. 456.
- GIUGLIANI FILHO, J. **Revisão da metodologia analítica de determinação do extrato seco do vinho.** Bento Gonçalves, EMBRAPA - UEPAE de Bento Gonçalves, 1984.
- GRANATA, L.A.; MORR, C.V.; **Improved Acid, Flavor and Volatile Compound Production in a High Protein and Fiber Soymilk Yogurt-like Product.** Journal of Food Science. 1996. **61**:331-336.
- GROSS, B; ASTHER, M. **Arômes de basidiomycetes: caracteristiques, analyses et productions.** Sci. Alim., 1989. **9**: 427-454.
- GUYMON, J. F.; CROWELL, E. A.. **The formation of Acetoin and Diacetyl during Fermentation, and the Levels found in wines.** Am. J. Enol. Vitic. 1965. **16**: 85-91.
- HANSEN, J. KIELLAND-BRANDT, M. C. **Modification of biochemical pathways in industrial yeasts.** Journal of Biotechnology. 1996. **49**: 1-12.
- HAUKELI, A.; LIE, S. **Production of Diacetyl, 2-Acetolactate and Acetoin by Yeasts during Fermentation.** J. Inst. Brew. 1972. **78**: 229-232.

- HEARD, G.M. e FLEET, G.H. **Occurrence and growth of yeast species during the fermentation of some Australian wines.** Food Technology in Australia. 1986. **38**. 22-25.
- HEARD, G.M e FLEET, G.H. **The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice.** Journal of Applied Bacteriology. 1988. **65**: 23-28.
- HEROLD B.; PFEIFFER, P.; RADLER, F. **Determination of the Three Isomers of 2,3-Butanediol Formed by Yeasts or Lactic Acid Bacteria During Fermentation.** Am. J. Enol. Vitic., 1995. **46**: 134-137.
- JANSEN, N.B.; TSAO, G.T. . **Bioconversion of pentoses to 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*.** Ad. Biochem. Eng. Biotechnology Bioeng. 1983. **27**:85-99.
- JUNI, E.. **Mechanisms of the formation of acetoin by yeast and mammalian tissues.** J. Biol. Chem. 1952. **195**: 727-734. Apud COLLINS, E. B. **Biosynthesis of Flavor Compounds by Micoorganisms.** Journal of Dairy Science, 1972. **55**: 1022-1028.
- JUNI, E. and G. A. HEYM.. **Acetoin condensation reactions of ppyruvic oxidase.** J. Biol. Chem. 1956. **218**:365-378.
- KANEKO, T.; WATANABE, Y.; SUZUKI, H.; **Differences between *Lactobacillus casei sspcasei* 2206 Nd Citrate-Positive *Lactococcus lactis ssplactis* 3022 in the Charateristics of Diacetyl Production.** Applied and Environmental Microbiology, Oct.1991. **57**: p. 3040-3042.
- KRONLOF, J., and M. LINKO, **Production of beer using immobilized yeast encoding  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase.** J. Inst. Brew. 1992. **98**: 479-491.
- KUNKEE, R. E. **Selection and modification of yeast and lactic acid bacteria for wine fermentation.** Food Microbiology. 1984. **1**: 315-332.
- LAFON, M. Ann. Technol. Agric. **4**: 169-221 e 241-92. 1955. apud AMERINE, M. A.; BERG, H. W.; KUNKEE, R. E.; OUGH, C. S.; SINGLETON, V. L.; WEBB, A. D. **The Technology of Wine Making.** 4<sup>th</sup> ed. Avi Publishing Company, Inc. 1979. 161-239.
- LE DUY, A. e ZAJIC, J.E. **A Geometrical Approach for Diferentiation of na Experimental Function at a point: Apllied to Growth and Product Formation.** Biotechnol. Bioeng., 1973. v.25, p. 805-810.
- LEE, F. A. **Basic food chemistry.** Connecticut. The Avi Publishing Company, 1980. **11**: p. 211-219.

- LERCH, K., SCHILLING, B. **Towards applying molecular genetics for natural flavors.** In 12<sup>th</sup>. International Congress of flavours, fragrances and essential oils. Vienna, Áustria, 4-5 Octobre. 1992. pp 157-163 **apud FABRE, C. Nouveaux Procèdes de Production D'Arômes Naturels par Bioconversion.** Toulouse: L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE TOULOUSE, 1996.202p. These ( Doctorat espécialité Biologie et Genetique Moleculaires Et Cellulaires - Biotechnologie) , 1996.
- LEWIS, K.F., and S. WEINHOUSE. **Studies in valine biosynthesis. II  $\alpha$ -acetolactato formation in microorganisms.** J. Am. Chem. Soc. 1958. **80**: 4913 – 4915 .
- LODDER, J. **The yeast - A Taxonomic Study.** North-Holland Publishing Co., Amsterdam. London. 1970.
- MAYER, B. G. **Les matières premières de l'aromatisation.** Pour la Science, 1991. **160**: 30-39 **apud FABRE, C. Nouveaux Procèdes de Production D'Arômes Naturels par Bioconversion.** Toulouse: L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE TOULOUSE, 1996.202p. These ( Doctorat espécialité Biologie et Genetique Moleculaires Et Cellulaires - Biotechnologie) , 1996.
- The MERCK Index 11 th ed. New Jersey: Merck & Co. Inc. 1990.
- MILLER, M. W.; PHAFF, H. J.. **A Comparative Study of the Apiculate yeasts.** Mycopathol. Mycol. Appl. 1958. **10**: 113-141.
- MOLINARI, F., MARINELLI, G., ARAGAZZINI, F.. **Production of flavour esters by *Rhizopus oryzae*.** APPL. Microbiol. Biotechnol. 1995. **43**: 967-973.
- MOLL, N., MOLL, M. **Additifs alimentaires et auxiliares technologiques.** Ed. Masson, Paris, 1990. pp. 83-84. **Apud FABRE, C. Nouveaux Procèdes de Production D'Arômes Naturels par Bioconversion.** Toulouse: L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE TOULOUSE, 1996.202p. These ( Doctorat espécialité Biologie et Genetique Moleculaires Et Cellulaires - Biotechnologie) , 1996.
- MONNET, C.; SCHMITT, P.; DIVIES, C.; **Diacetyl Production in Milk by an  $\alpha$ -Acetolactic Acid Accumulating Strain of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *Diacetyllactis*.** J. Dayre Sci. 1994. **77**:2916-2924.
- OSOL, A. e HOOVER, J.E. 1975. Ed. Remington's Pharmaceutical Sciences. 15. Easton, Penn., Mack.

- OWADES, J.L., L. MARESCA and G. RUBIN. **Nitrogen metabolism during fermentation in the brewing process. II. Mechanism of diacetyl formation.** Proc. Am. Soc. Brew. 1959. P. 22 – 26. **Apud ROMANO, P.; SUZZI, G. Origin and Production of Acetoin during Wine Yeast Fermentation - Minireview.** Applied and Environmental Microbiology. 1996. 309-315.
- PASTORE, G.M., SATO, H.H., YANG, T.S., PARK, Y.K., MIN, D.B. **Production of Fruity Aroma by Newly Isolated Yeast.** Biotech. Letters. 1994. 16: 389-392.
- PEDERSON, C.J., ALBURY, M. N., WILSON, D.C. **The growth of yeasts in grape juice at low temperatures.** App. Microbiol. 1959. 7: 1-16.
- PLETSCH, M. **Compostos naturais biologicamente ativos.** Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. 1998. 4: 12-15.
- PRESCOTT e DUNN'S **Industrial Microbiology.** AVI Publishing Company, INC. Westport, Connecticut, 4<sup>th</sup> ed. 1983.
- QURESHI, N. ; TAMHANE, D. V. **Production of Mead by Immobilized Cells of *Hansenula anomala*.** Appl. Microbiol. Biotechnol. 1987. 27: 27-30.
- RADLER, F. **The yeast metabolism of organic acids.** In Proceedings of the International Symposium , 1991.
- RANKINE, B. **Formation of Higher Alcohols by Wine Yeasts, and Relationship to Taste Thresholds.** J.Sci. Fd Agric., 1967. 18:583-589.
- RENNA, M.C.; NAJIMUDIN, N.; WINIK, L.R.; ZAHLER, S.A.; **Regulation of the *Bacillus subtilis alsS, alsD, and alsR* Genes Involved in Post-Exponential-Phase Production of Acetoin.** Journal of Bacteriology, June 1993. p. 3863-3875.
- RIBÉREAU - GAYON J. e PEYNAUD, E. **Traité d'Oenologie II. Composition, Transformation et Traitements des Vins.** Paris. Dunod. 1966. 1065 pp.
- RIBÉREAU - GAYON J. e PEYNAUD, E; P. RIBÉREAU-GAYON, and P. SUDRAUD. 1975. **Sciences et Techniques du vin. H. Caracteres des Vins. Maturation du raisin.** Levures et Bacteries. Dunod, Paris
- RIZZON, L. A.; ZANUZ, M. C. MANFREDINI, S. **Como Elaborar vinho de Qualidade na Pequena Propriedade.** Bento Gonçalves: EMBRAPA- CNPUV, 1996. Documentos 12 34 p.

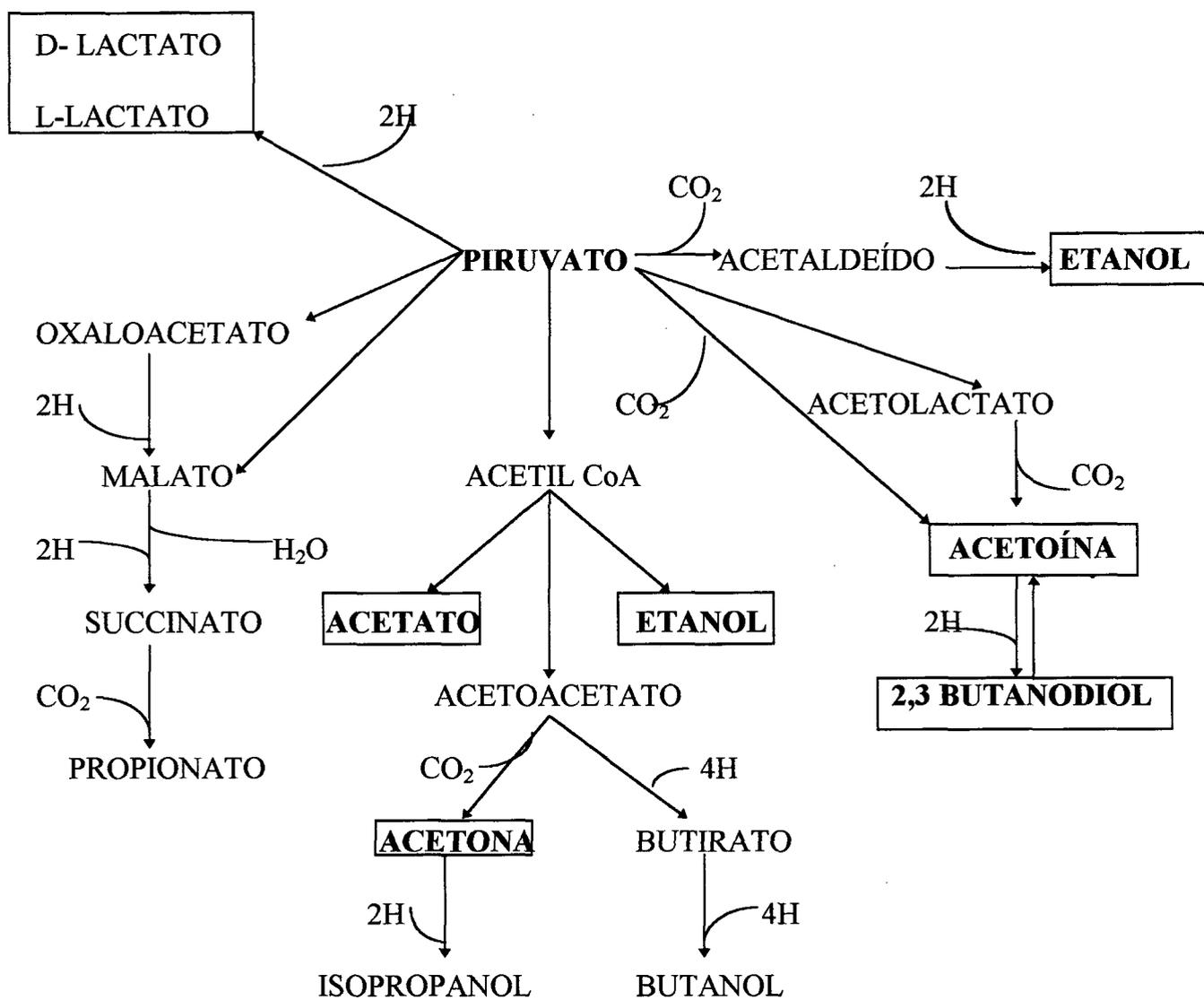
- ROMANO, P.; SUZZI, G.; ZIRONI, R.; COMI, G.. **Higher Alcohol and Acetic Acid Production by Apiculate wine yeasts.** Journal of Applied Bacteriology. 1992. **73**: 126- 130.
- ROMANO, P.; SUZZI, G.; (A) **Acetoin production in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts.** Microbiology Letters 1993. 23-26.
- ROMANO, P.; SUZZI, G.; ZIRONI, R.; COMI, G., **Biometric Study of Acetoin Production in *Hanseniaspora guilliermondii*, *Kloeckera apiculata*.** Applied and Environmental Microbiology, june 1993. p. 1838-1841.
- ROMANO, P.; SUZZI, G.; (B) **Higher alcohol and acetoin production by *Zygosaccharomyces* wine yeasts.** Journal of Applied Bacteriology. 1993. **75**: 541-545.
- ROMANO, P.; SUZZI, G.; BRANDOLINI, V. MENZIANI, E.; DOMIZIO, P. **Determination of 2,3- butanediol in high and low acetoin producers of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts by automated multiple development (AMD).** Letters in Applied Microbiology. 1996. **22**: 299-302.
- ROMANO, P.; SUZZI, G. **Origin and Production of Acetoin during Wine Yeast Fermentation - Minireview.** Applied and Environmental Microbiology. 1996. 309-315.
- ROMANO, P.; SUZZI, G.; COMI, G.; ZIRONI, R.; MAIFRENI, M. **Glycerol and other fermentation products of apiculate wine yeasts.** Journal of Applied Microbiology. 1997. **82**: 615-618.
- ROMICK, T.L.; FLEMING, H. P. **Acetoin production as na indicator of growth and metabolic inhibition of *Listeria monocytogenes*.** Journal of Applied Microbiology. 1998. **84**: 18-24.
- RONKAINEN, P., BRUMMER, and H. SUOMALAINEN. **Diacetyl and formic acid as decomposition products of 2-acetolactic acid.** Acta Chem. Scand. 1970. **24**: 3404-3406.
- ROSET, M.; MARGULIS, H.; BORGES, F.. **Sur quelques levures dites "sauvages" et les substances volatiles qu'elles produisent dans un jus de raisin.** Industr. Alim. Agr. 1971. 647-653.
- SILVA, G. A. SILVA, M. A. A. A. **Boletim de Pesquisa.** EMBRAPA n<sup>o</sup> 0101-7764 Junho, 1984.

- SILVA, G. A. **The occurrence of killer, sensitive, and neutral yeasts in Brazilian Riesling Italic grape must and the effect of neutral strains on killing behaviour.** Appl. Microbiol. Biotecnol. 1996. 46: 112-121.
- SIMÃO, A. M; **Aditivos para alimentos sob o aspecto toxicológico.** São Paulo: Nobel, 1985.
- SMITH, M. T. **Systematic Discussion of the Species.** In The Yeast. A taxonomic study. Elsevier Science Publisher B. V. Amsterdam. 1984. **Edited by** N. J. W. KREGER-VAN RIJ GRONINGEN, The Netherlands
- SUOMALAINEN, H. **Yeast and its Effect on the Flavour of Alcoholic Beverages.** Journal of the Institute of Brewing. 1971. 77: 164-177.
- TAKAHASHI, M.; OCHI, H.; KANEKO, T.; SUZUKI, H.; TANAKA, H., **“Diacetyl Production by Immobilized Citrate-positive *Lactococcus lactis* ssplactis 3022 in the Fibrous Ca-Alginate Gel”.** Biotechnology Letters. 1990. vol 12 n° 8 569-574.
- TOURSEL, P. **Arômes: Condamnés à innover...Process,** 1996. 1112, 34-37 **apud** FABRE, C. **Nouveaux Procèdes de Production D'Arômes Naturels par Bioconversion.** Toulouse: L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE TOULOUSE, 1996. 202p. These ( Doctorat espécialité Biologie et Genetique Moleculaires Et Cellulaires - Biotechnologie) , 1996.
- TRAVASSOS, L. R; ROITMAN, I.; AZEVEDO, J. L. **Tratado de Microbiologia.** São Paulo. Manole Ltda. 186 p. 1988.
- VAN RIJ GRONINGEN, N. J. W. K. **Systematic Discussion of the Species.** In The Yeast. A taxonomic study. Elsevier Science Publisher B. V. Amsterdam. 1984. The Netherlands.
- VITOLO, M. **Enzimologia Industrial para Alimentos.** Boletim de Biotecnologia. 1994.
- WAINWRIGHT, T. **Diacetyl - a Rewiew. I. Analytical and biochemical consid Rations II. Brewing experience.** J. Inst. Brew. 1973. 79: 451-470.
- WICKERHAM, L. J. In: U.S. Department of Agriculture, Technical Bulletin n° 1029. 1951 **apud** ROMANO, P.; SUZZI, G.; **Higher alcohol and acetoin production by *Zygosaccharomyces* wine yeasts.** Journal of Applied Bacteriology. 1993. 75: 541-545.

**ANEXOS**

# ANEXO 1

## PRODUTOS FORMADOS A PARTIR DO PIRUVATO



## ANEXO 2

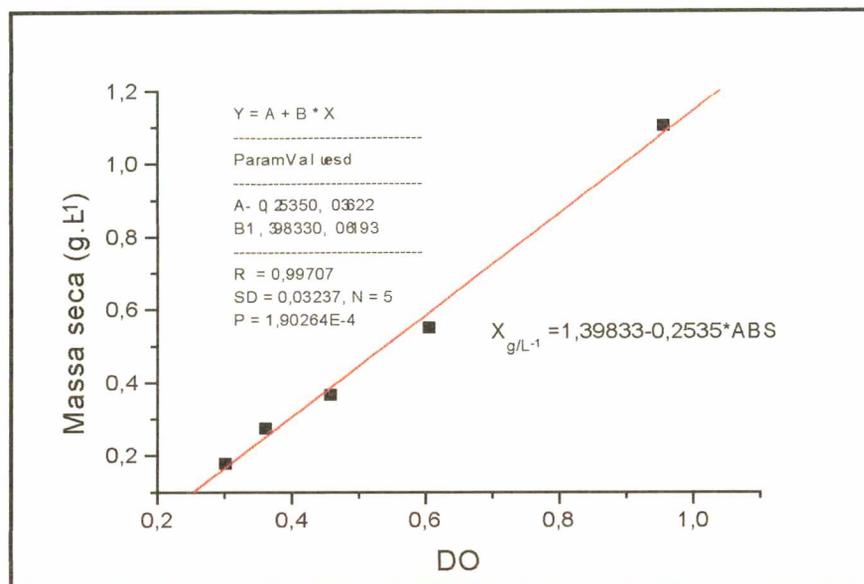
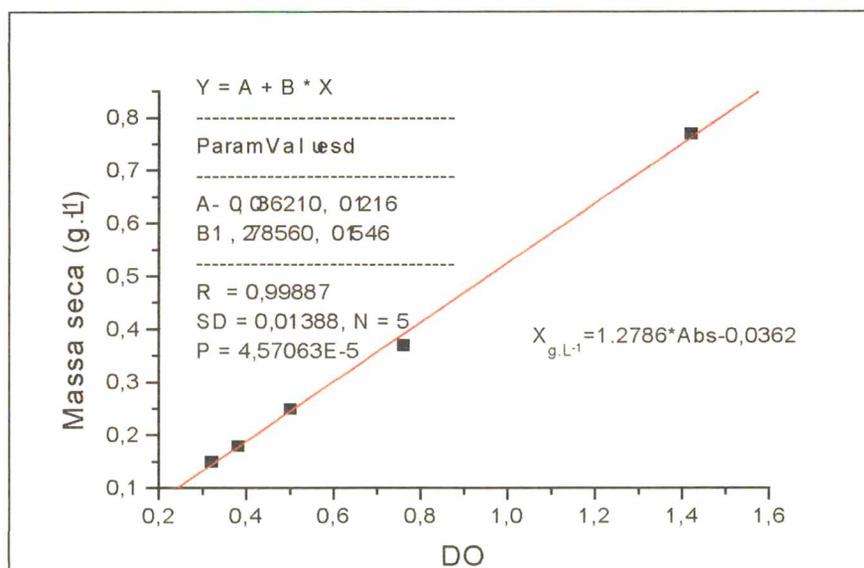
## MEIO DE CULTURA segundo WICKERHAM 1951

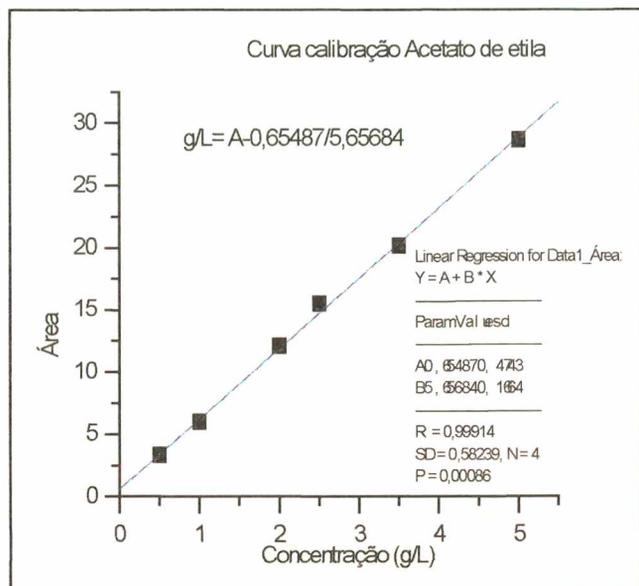
glicose	50 g/L	biotina	10 µg/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 g/L	ác. Fólico	02 µg/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,85 g/L	niacina	400 µg/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,15 g/L	ác. Paraaminobenzóico	200 µg/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 g/L	riboflavina	200 µg/L
NaCl	0,1 g/L	tiamina	400 µg/L
CaCl <sub>2</sub>	0,1 g/L	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	500 µg/L
Inositol	0,01 g/L	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	40 µg/L
		KI	100 µg/L
		FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	200 µg/L
		MnSO <sub>4</sub>	400 µg/L
		ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	400 µg/L
		Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	200 µg/L

pH = 5,5

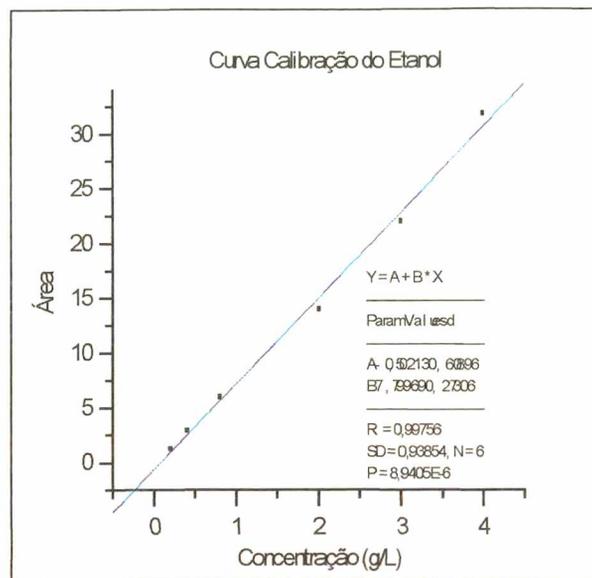
## ANEXO 3

## CURVAS DE CALIBRAÇÃO

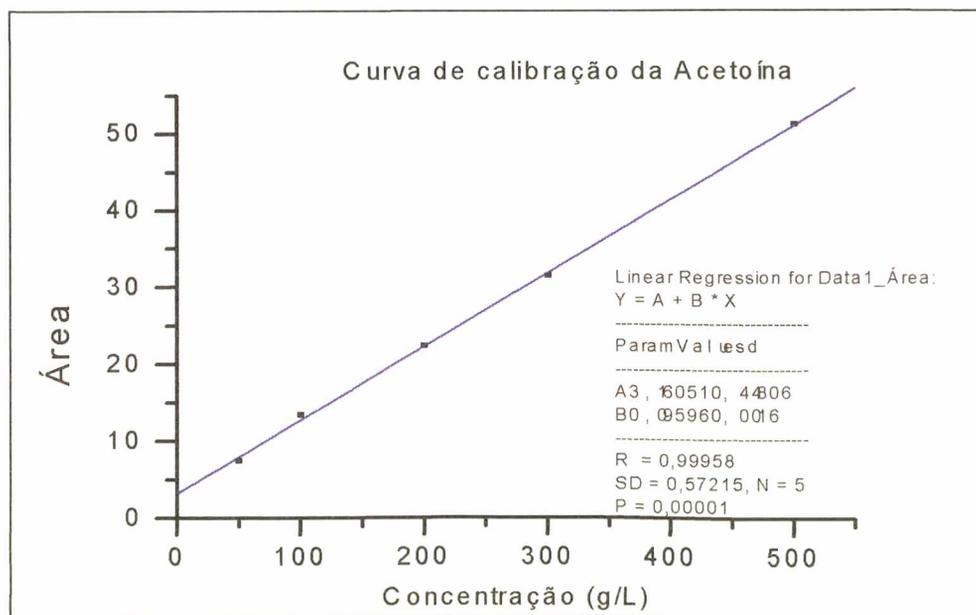
FIGURA 27 - Curva de calibração para *Hansenula anomala*.FIGURA 28 - Curva de calibração para *Kloeckera apiculata*.



**FIGURA 29 - Curva de calibração do Acetato de etila.**



**FIGURA 30 - Curva de calibração do etanol.**



**FIGURA 31 - Curva de calibração da Acetoina.**

ANEXO 4

VELOCIDADES ESPECÍFICAS MÁXIMAS DE CRESCIMENTO

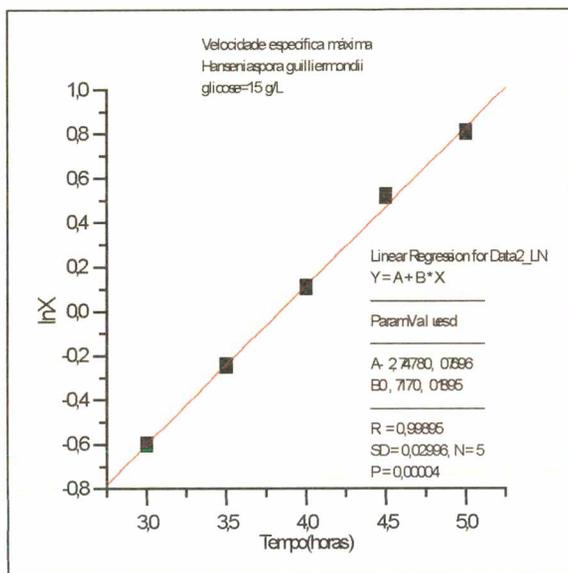


FIGURA 32 - Velocidade específica máxima para *Hanseniaspora guilliermondii*. Glicose = 15 g/L;  $\mu_{max} = 0,72$ .

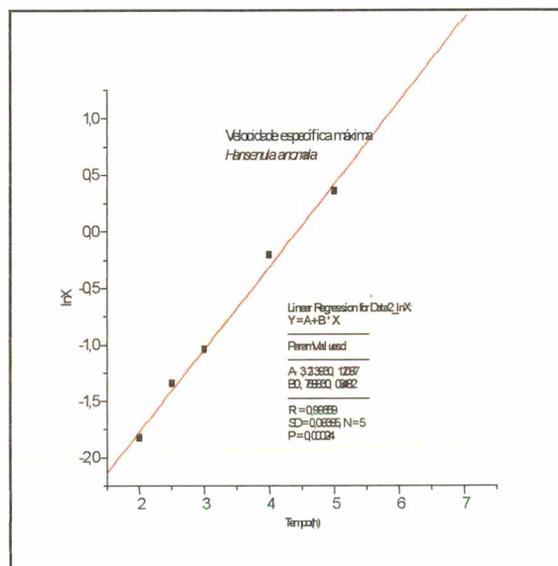


FIGURA 33 - Velocidade específica máxima para *Hansenula anomala*. Glicose = 15 g/L;  $\mu_{max}=0,77$ .

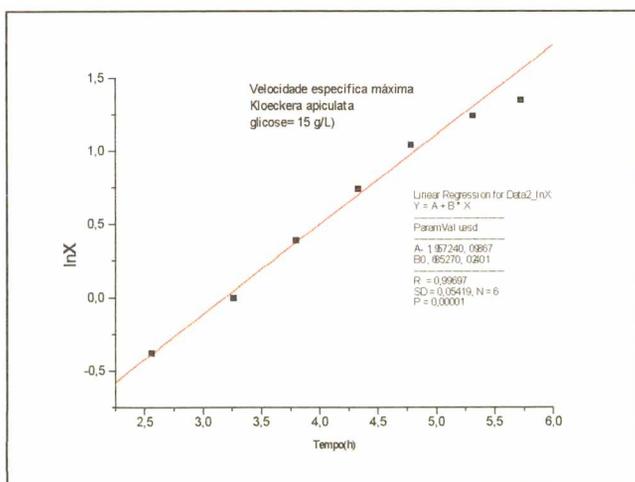


FIGURA 34 - Velocidade específica máxima para *Kloeckera apiculata*. Glicose=15g/L;

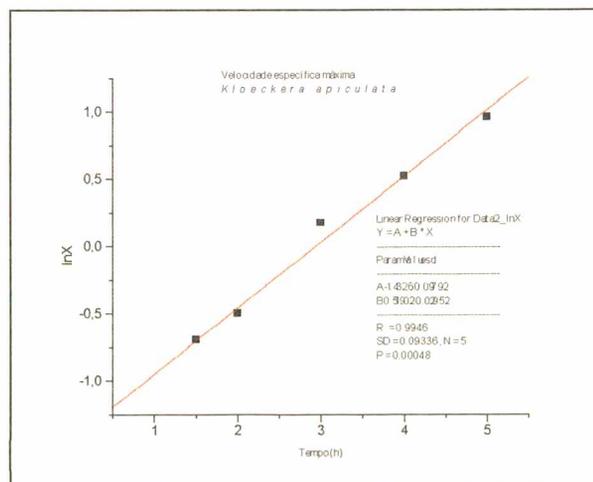
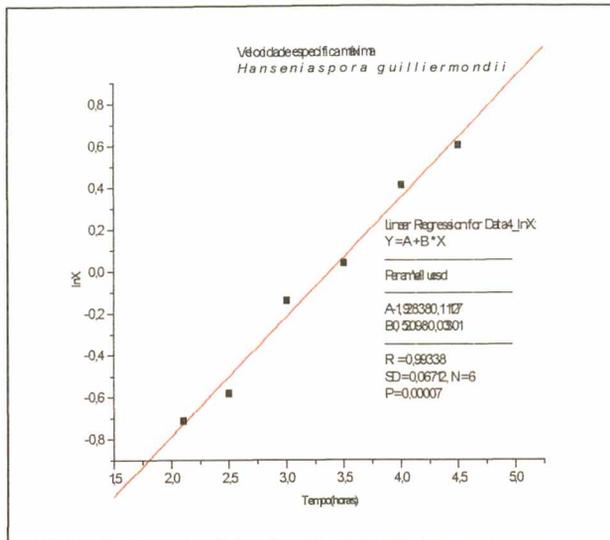
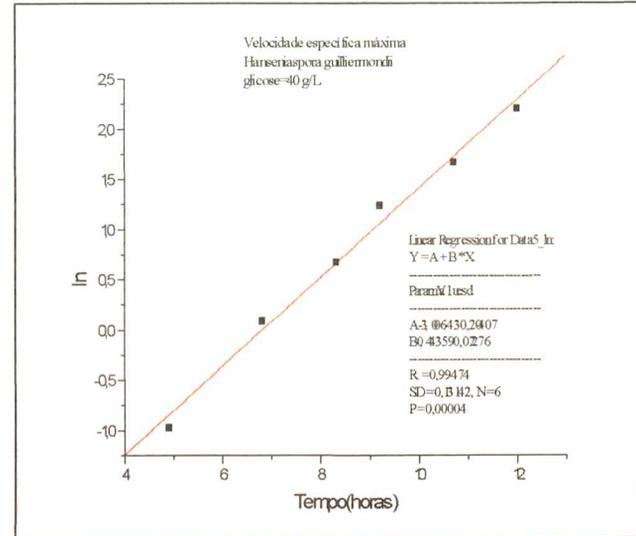


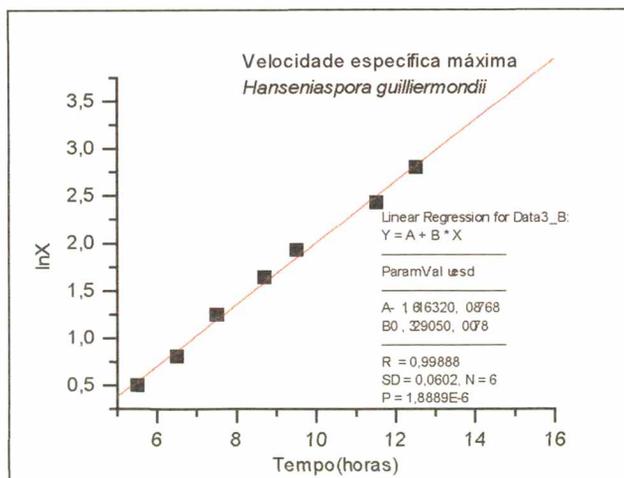
FIGURA 35 - Velocidade específica máxima para *Kloeckera apiculata*.



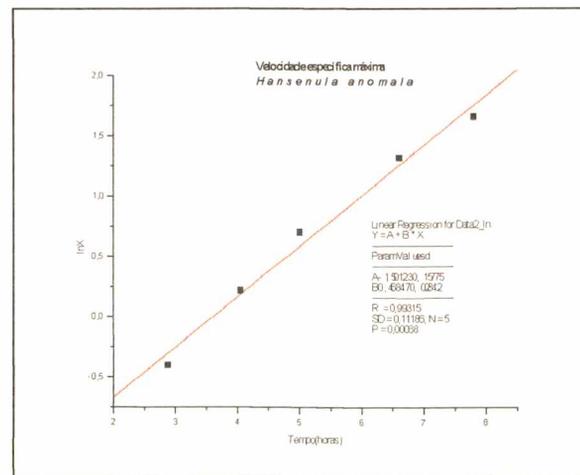
**FIGURA 36** - Velocidade específica máxima para *Hanseniaspora guilliermondii*. Glicose=20 g/L;  $\mu_{max}=0,52$ .



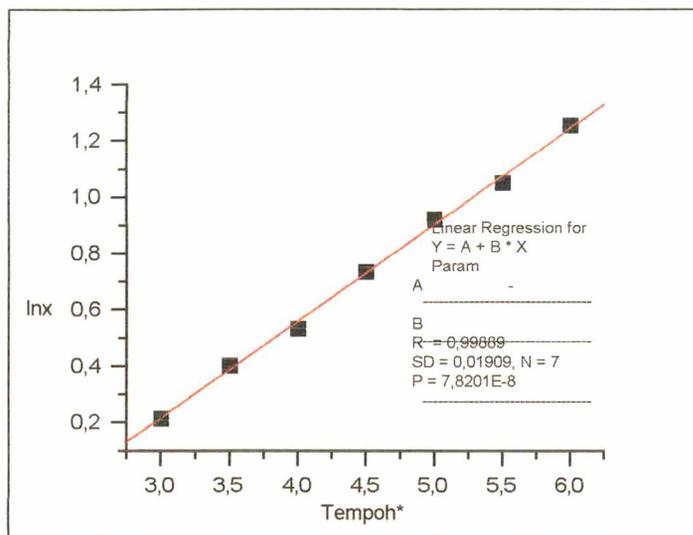
**FIGURA 37** - Velocidade específica máxima para *Hanseniaspora guilliermondii*. Glicose=40 g/L;  $\mu_{max}=0,44$ .



**FIGURA 38** - Velocidade específica máxima para *Hanseniaspora guilliermondii*. Substrato=100 g/L;  $\mu_{max}=0,33$ .



**FIGURA 39** - Velocidade específica máxima para *Hansenula anomala*. Glicose=40 g/L;  $\mu_{max}=0,47$ .



**FIGURA 40 - Velocidade específica máxima para *Kloeckera apiculata*. Glicose=40 g/L;  $\mu_{max}=0,34$ .**