

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**Produção de diacetil e acetoína: Desenvolvimento de um
meio de cultivo e avaliação de fatores que alteram o
crescimento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar.
diacetylactis.**

JÚLIO CESAR DE CARVALHO

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA

Orientador: Prof. Dr. Agenor Furigo Jr
Co-Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow

**FLORIANÓPOLIS
1999**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Produção de diacetil e acetoína: Desenvolvimento de um
meio de cultivo e avaliação de fatores que alteram o
crescimento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar.
diacetylactis.**

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

Orientador: Prof. Dr. Agenor Furigo Jr.
Co-Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow

JÚLIO CESAR DE CARVALHO

FLORIANÓPOLIS, 1999

Produção de diacetil e acetoína: Desenvolvimento de um meio de cultivo e avaliação de fatores que alteram o crescimento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*

Por

Júlio Cesar de Carvalho

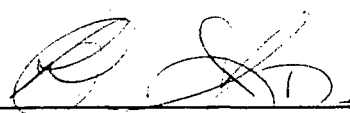
Essa dissertação foi julgada para a obtenção do título de
Mestre em Engenharia Química
Área de Concentração Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos
e aprovada em sua forma final pelo curso de Pós-graduação



Prof. Dr. Agenor Furigo Júnior
Orientador



Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow
Co-orientador



Prof. Dr. Humberto Jorge José
Coordenador do Curso de Pós-graduação em Engenharia Química

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Agenor Furigo Júnior



Profa. Dra. Gláucia M. F. Aragão



Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow



Prof. Dr. Jean Pierre Rosier

Florianópolis (SC), fevereiro de 1999

A minha família: meus pais Sônia e César, que ensinaram-me algum senso crítico e vontade de aprender, e que são um apoio e amizade constante; aos meus irmãos Marco, Dayse e Lucrécia, incentivadores e amigos com quem tem sido um prazer partilhar a vida.

AGRADECIMENTOS

Tive a felicidade de receber, ao longo das atividades do Mestrado, o apoio e a amizade de diversas pessoas. Embora todas tenham meu reconhecimento e gratidão, cito algumas que me ajudaram mais diretamente, e a quem devo especiais agradecimentos:

Ao professor Jorge, que me deu sua confiança, amizade e apoio;

Aos professores Petrus e Gláucia, que contribuíram com suas idéias e incentivo em algumas etapas do trabalho;

Aos professores Adelamar, Regina, Luismar e Ricardo, que em diversas etapas gentilmente cederam do seu tempo e material para a continuidade do trabalho.

Aos colegas do Engebio: Denise, Fábio, Rafael, Rodrigo e Roberta, e em especial às amigas Rita e Márcia, com quem dividi muito do meu tempo de trabalho no Laboratório.

Aos colegas do Mestrado, pela amizade e pela ajuda em algumas etapas – à Fabiane, ao Cláudio, Adriano, Mazzuco, Ogeda e Luizildo, e em especial ao Alexandre, ao Jaime, à Heloisa e à amiga Cíntia, e aos meus amigos Carlos e Edson, pela amizade e convivência enriquecedora que me proporcionaram;

Aos funcionários do departamento, e em especial ao sempre simpático e prestativo Edivilson;

Ao NRRL e à ELEGÊ S.A pela doação de microorganismos e soro de leite, respectivamente e à CAPES pelo apoio financeiro, e às bactérias, que se deixaram pesquisar tão docilmente;

Ao professor Soccol, que foi meu “iniciador” nos processos biotecnológicos;

E, mais especialmente ao professor Agenor – pela amizade, apoio e confiança além da obrigação no seu trabalho como orientador

Foi um prazer conviver com vocês - e será um prazer também no futuro!

RESUMO

O diacetil e a acetoína são substâncias responsáveis por parte do aroma de diversos derivados do leite. São substâncias que podem ser produzidas por diversos microorganismos, entre eles o *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetilactis* (Lld). Esse microorganismo – especificamente a cepa NRRL 2356 – foi escolhido para estudos que levassem ao desenvolvimento de meios de cultura adequados para o processo de produção de diacetil e acetoína. No presente trabalho avaliou-se a influência de alguns fatores sobre o crescimento e produtividade de biomassa de Lld, desenvolveu-se meios de cultura visando a máxima produção de biomassa, e comparou-se meios de cultura em fermentador em termos de produção de biomassa, diacetil e acetoína.

Os fatores estudados inicialmente foram a quantidade de inóculo, a velocidade de transferência de oxigênio e o pH dos meios de cultura. A produção de biomassa foi diretamente proporcional à quantidade de inóculo (para volumes de inóculo menores que 0,8% do volume de meio), inversamente proporcional à velocidade de transferência de oxigênio e diretamente proporcional ao pH (ou seja, inversamente proporcional à acidez do meio).

Experimentos com diferentes meios de cultivo contendo lactose (LAC), extrato de levedura (YEA) e peptona (PEP) foram feitos, seguindo um planejamento experimental evolucionário. Os resultados desse planejamento permitiram elaborar um modelo segundo o qual a máxima produção de biomassa ocorre com 1,3% de LAC, 3,6% de YEA e 8,3% de PEP, dando uma produção teórica de 2,5 g/L de biomassa seca.

Outro planejamento experimental, utilizando soro de leite reconstituído e ultrafiltrado (SORO), extrato de levedura e triptona (TRYP) permitiu elaborar um modelo segundo o qual a máxima produção de biomassa ocorre com de 50% (mL/mL) de SORO com 8,2% de sólidos, 2,85% de YEA e 11% de TRYP.

Foram feitos ainda experimentos em fermentador de bancada de 6L usando meios MRS e SORO + YEA, adicionados ou não de citrato de amônio, dando produtividades maiores para os meios com SORO e produções de biomassa equivalentes para todos os experimentos.

Determinações da concentração de diacetil e de acetoína foram feitas para os experimentos em fermentador; ocorreram interferências entre os reagentes usados na análise e substâncias na amostra. Não foi detectado diacetil, e a acetoína foi encontrada em concentrações de 3,5 a 7 ppm ou mg/L.

ABSTRACT

Diacetyl and acetoin are substances responsible for part of the flavor of several dairy products. These substances may be produced by various microorganisms, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (LlId) among them. This microorganism – specifically the NRRL 2356 strain – has been chosen for studies which could lead to the development of culture media suitable for the diacetyl and acetoin production process. In the present work the influence of some factors over growth and biomass productivity of LlId was evaluated, culture media regarding maximum biomass production were developed, and culture media in fermenter vessels were compared in terms of biomass, acetoin and diacetyl production.

The preliminarily studied factors were the inoculum amount, oxygen transfer velocity and culture media pH. The biomass production was directly proportional to inoculum amount (for volumes smaller than 0,8% of the medium volume), inversely proportional to oxygen transfer velocity and directly proportional to pH (or inversely proportional to medium acidity).

Experiments with different culture media containing lactose (LAC), yeast extract (YEA) and peptone (PEP) were prepared, according to an evolutionary experimental design. The experimental design results led to elaboration of a model according to which maximum biomass production occurs with 1.3% of LAC, 3.6% of YEA e 8.3% of PEP, giving a theoretical production of 2.5 g/L of dry biomass.

Another experimental design, using reconstituted, ultrafiltered skim milk (SORO), yeast extract and tryptone (TRYP) led to elaboration of a model according to which maximum biomass production occurs at 50% (mL/mL) of SORO with 8.2% solids, 2.85% of YEA and 11% of TRYP.

Experiments in a benchscale 6-liter vessel fermenter were made, using MRS and SORO + YEA culture media, supplemented or not with ammonium citrate. The higher productivities were obtained with the culture media with SORO; biomass productions were equivalent for all experiments.

Determinations of diacetyl and acetoin concentration were made for the experiments in the 6-liter fermenter; interference occurred among the reagents used for analysis and substances on the samples. No diacetyl was detected, and acetoin was found in concentrations of 3.5 to 7 ppm (mg/L).

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1 <i>Biotecnologia de aromas.....</i>	6
2.1.1 Aromas	6
2.1.2 Modificações de aromas.....	7
2.1.3 Funções químicas	7
2.1.4 Produção biotecnológica – vantagens	8
2.1.5 Mercado mundial.....	9
2.2 <i>Produção biotecnológica de aditivos aromatizantes.....</i>	9
2.2.1 Bactérias	9
2.2.2 Leveduras	10
2.2.3 Fungos	10
2.2.4 Culturas de células.....	10
2.2.5 Enzimas	11
2.2.6 Métodos analíticos.....	11
2.2.7 Downstreaming	12
2.3 <i>O diacetil e a acetoina.....</i>	12
2.4 <i>Bactérias lácticas</i>	14
2.4.1 Acetoina produzida por bactérias lácticas	19
2.4.2 Diacetil produzido por bactérias lácticas.....	20
2.5 <i>Meios de cultivo e métodos analíticos.....</i>	22
2.5.1 Meios de cultivo	22
2.5.2 Métodos de análise dos metabólitos de interesse	22
2.5.3 Métodos de determinação de biomassa (usando Lld)	23
2.6 <i>Métodos de planejamento experimental.....</i>	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1 <i>Microorganismo</i>	37

3.2 Meios de cultura, esterilização e condições de cultivo	38
3.2.1 Equipamentos	38
3.2.2 Reagentes.....	38
3.2.3 Esterilização	38
3.2.4 Inóculos	39
3.2.5 Cultivos em shaker	39
3.2.6 Cultivo em fermentador.....	39
3.3 Amostragem e análises.....	40
3.3.1 Determinação da concentração celular.....	40
3.3.2 Massa seca.....	41
3.3.3 Medidas de absorvância	41
3.3.4 Determinações de pH	42
3.3.5 Concentração de diacetil e acetoina	42
3.4 Modelos e análises estatísticas.....	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1 Resultados preliminares.....	47
4.1.1 Influência da quantidade de inóculo no crescimento do microorganismo	47
4.1.2 Influência da velocidade de transferência de oxigênio no crescimento do microorganismo.....	49
4.1.3 Influência do pH inicial no crescimento do microorganismo	51
4.2 Planos de experimentos para maximização da produção de biomassa usando lactose, extrato de levedura e peptona	53
4.2.1 Planejamento experimental evolucionário	54
4.2.2 Modelo global.....	73
4.2.3 Planos de experimentos para maximização da produção de biomassa usando soro de leite, extrato de levedura e peptona	76
4.3 Experimentos feitos em fermentador – verificação da produção de biomassa, diacetil e acetoina	83
4.3.1 Experimentos realizados e resultados.....	83
4.3.2 Produção de biomassa nas fermentações.....	84

4.3.3 Fermentações com meio MRS	85
4.3.4 Fermentações com soro de leite	85
4.3.5 Produção de diacetil e acetoína	86
4.3.6 Comentário sobre a determinação de diacetil e acetoína	87
5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES	89
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

NOMENCLATURA

%	Exceto quando explicitado, trata-se de % massa por volume (g/mL)
Abs	absorbância
ATCC	American Type Culture Collection, Rockville, MA – USA
a_w	atividade água
BCCM	Belgian Coordinated Collections of Microorganisms – Brussels, Belgique
CNRZ	Centre National de Recherche Zootechnique (Jouy-en-Josas, France)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland
g	aceleração da gravidade, 10 m/s^2
GRAS	generally recognized as safe
LAC	lactose P.A.
LlId	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>
LMG	Laboratorium voor Microbiologie, Gent Culture Collection, Gent, Belgium
MRS	Iniciais de Man, Rogosa e Sharpe, criadores desse meio de cultivo bastante difundido para <i>Lactobacillus</i>
NCDO	National Collection of Dairy Organisms – o mesmo que NCFB
NCFB	National Collection of Food (Dairy) Organisms - Shinfield, Reading, UK
NRRL	Northern Research Regional Laboratory - ARS Culture Collection, Peoria, IL - USA
PA	para análise
PEP	peptona bacteriológica
PM	massa molar
ppm	partes por milhão [mg/kg] ou [mg/L]
r	coeficiente de regressão
rpm	rotações por minuto
TRYP	triptona (hidrolisado de caseína)
SORO	soro de leite em pó reconstituído e ultrafiltrado
YEA	extrato de levedura

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A produção de aromas por vias biotecnológicas vem sendo objeto de estudo intenso nos últimos anos. Há diversas razões que justificam a escolha dessa via para a produção de aromas; as duas principais são que alguns dos compostos responsáveis por aromas de interesse comercial são complexas, de forma que sua produção por via sintética é impossível ou economicamente inviável, e o fato de os aromas produzidos por via biotecnológica serem considerados naturais, mesmo como aditivos, se forem produzidos por microorganismos GRAS (“generally recognized as safe”, como as leveduras de panificação, bactérias do iogurte, etc.) ou partes deles. O mercado de aromas no mundo está em expansão, e provavelmente a demanda por produtos “naturais” deve continuar nos próximos anos.

Entre diversos aromas sabidamente produzidos por espécies determinadas de microorganismos, o diacetil (butanodiona) e a acetoína (3-hidroxi butanona) apresentam papel importante, em especial o diacetil. Ambos são responsáveis por parte do aroma da manteiga, queijos e outros derivados do leite. As duas substâncias têm características aromáticas semelhantes, mas como o diacetil é bem mais potente que a acetoína, é preferido como aditivo. Tanto o diacetil quanto a acetoína são produzidos por diversos microorganismos, sobretudo leveduras e diversas espécies de bactérias; as de maior interesse industrial e mais largamente estudadas são as bactérias lácticas.

Apesar de serem substâncias estruturalmente simples, a produção por síntese química de diacetil e acetoína não é comum. Diversos pesquisadores vêm trabalhando com essa substância, já que é interessante que determinados derivados de leite desenvolvam quantidades apreciáveis de diacetil, ou que este seja adicionado a esse produtos, para melhorar a qualidade e diminuir o tempo de processamento.

A maior parte das pesquisas tem dois alvos: determinar quais os fatores que afetam a produção de diacetil e acetoína, e determinar quais as vias metabólicas envolvidas na produção desses aromas. Em ambos os casos, o objetivo é alterar esses fatores e vias metabólicas de forma a aumentar a produção dos metabólitos de interesse; um dos objetivos do presente trabalho foi

apreciar o desenvolvimento do microorganismo em várias condições e determinar como alguns fatores afetam seu crescimento, visando a posterior produção de diacetil e acetoína.

Um dos microorganismos mais comumente usado nessas pesquisas é o *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (abreviado como Llld). Embora diversos textos discutam as vias de produção e as quantidades obtidas de diacetil e acetoína por esse microorganismo, faltam na literatura trabalhos que discutam meios de cultivo otimizados para o seu crescimento; esse foi um dos objetivos do presente trabalho, já que para qualquer processo produtivo que envolva o microorganismo, é conveniente saber como produzir muita biomassa em pouco tempo.

Por muito tempo na área da química predominaram tentativas de otimização de misturas e formulações da forma “um de cada vez”, isto é, determinava-se a influência de cada substância em uma mistura, por exemplo, variando as quantidades de uma substância e analisando as propriedades da mistura enquanto os outros componentes da mistura tinham suas quantidades fixas; descoberta a influência de uma substância, passava-se a outra, e assim por diante. Esse método, além de lento, mascara resultados de interação entre os vários componentes de um sistema. O desenvolvimento de métodos estatísticos e o advento e popularização de microcomputadores permitiu um aperfeiçoamento dos métodos experimentais. Hoje é comum a realização de “planejamentos experimentais” onde são feitos testes variando diversas grandezas, criteriosamente mas ao mesmo tempo, de forma que se possa com número comparativamente menor de experimentos chegar a resultados de maior qualidade. Entre esses métodos de planejamento estão os planejamentos 2^n e planos evolucionários, ambos aplicados no presente trabalho como uma ferramenta para a otimização das condições de cultivo de Llld.

Os meios de cultura mais comuns para bactérias lácticas, contém em geral hidrolisados de carne, caseína, suco de tomate ou outras matérias primas que contenham os nutrientes complexos que esses microorganismos exigem para o crescimento. As indústrias agroalimentares são, no entanto, fontes de alguns subprodutos ricos em nutrientes e de baixo custo, que apresentam-se como possíveis substratos para diversos processos fermentativos; esse é o caso do soro de leite, que é produzido em grande quantidade pela indústria de laticínios. Um dos objetivos desse trabalho foi, uma vez determinada uma formulação “sintética” de cultivo de Llld, desenvolver um meio que usasse soro de leite (com aditivos) como substrato e comparar a sua eficiência com o meio sintético.

Um dos aditivos mais comumente utilizados na tentativa de estimular a produção de diacetil e acetoína por microorganismos é o ácido cítrico, que no caso do Lld é absorvido sem controle pela célula e acaba funcionando como uma fonte extra de piruvato, aumentando a produção dos metabólitos de interesse. Para a análise do diacetil e da acetoína produzidos, diversos autores usaram métodos espectrofotométricos baseados na formação de um complexo do diacetil ou acetoína com creatina. No presente trabalho, foram feitos ensaios fermentativos com a adição de ácido cítrico e foi feita a determinação espectrofotométrica de diacetil e acetoína.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo apresenta-se dividido em seis partes. Em primeiro lugar, discorre-se de uma forma geral sobre aromas, conceituando-os; a seguir, discute-se sobre sua produção por vias biotecnológicas. O próximo passo é listar as características do diacetil e da acetoína, os metabólitos que motivaram esse trabalho, e em seguida revisa-se o metabolismo e crescimento de bactérias lácticas; na penúltima parte, discorre-se sobre meios de cultura e métodos analíticos utilizados por diversos autores e por último resume-se os principais conceitos envolvendo métodos de planejamento experimental.

2.1 BIOTECNOLOGIA DE AROMAS

2.1.1 Aromas

Aromas estão entre os mais valiosos constituintes de alimentos, bebidas e cosméticos. No caso específico de alimentos, apesar das ótimas características nutricionais de produtos cárnicos ou lácticos, estes são consumidos sobretudo devido às suas características organolépticas: aroma, sabor e textura.

Enquanto os receptores de sabor na boca podem distinguir quatro formas básicas (salgado, azedo, amargo e doce), além da textura e da influência de substâncias adstringentes ou potencializadoras do sabor (ácido glutâmico, por exemplo), várias centenas ou até milhares de odores diferentes podem ser distinguidos pelo olfato. Essas sensações são produzidas por substâncias químicas voláteis que estimulam receptores no epitélio nasal (Farmer, 1994).

A diferença entre um aroma e uma fragrância é conceitual e refere-se à aplicação: aromas são de uma forma geral usados em alimentos e bebidas, enquanto fragrâncias são usadas em perfumes e cosméticos. Cabe lembrar que, apesar de existirem na língua inglesa equivalentes para aroma (aroma), odor (odor), cheiro (smell) e sabor (taste), agrupa-se as qualidades aroma, sabor e textura na expressão flavo(u)r.

Há muito tempo o homem usa direta ou indiretamente microorganismos para melhorar as características organolépticas e de conservação de alimentos, por exemplo a cerveja, o vinho, o vinagre, queijos, pães, e carne. Em todos os casos, é a atuação de microorganismos específicos que gera uma série de transformações que enriquecem o aroma, o sabor, a textura e as características nutricionais do produto. O desenvolvimento de tais produtos ao longo dos séculos não só é a base da produção biotecnológica de aromas, como também sedimentou a opinião generalizada de que alimentos modificados pela ação de microorganismos são naturais e portanto inócuos. Essa opinião reflete-se na legislação de aromas, que classifica os compostos em naturais (obtidos por qualquer via biotecnológica a partir de matérias-primas naturais), idênticos aos naturais (aromas sintéticos molecularmente idênticos aos naturais) e artificiais (sem equivalente na natureza).

2.1.2 Modificações de aromas

Entre as razões pelas quais altera-se o aroma de um alimento encontram-se: dar características únicas ao produto, tornando-o inconfundível; mascarar outras “notas” do odor presente no alimento; torná-lo aceitável (no caso de uma bala, por exemplo); ou substituir aromas perdidos durante o processamento (no caso de alimentos “light”) (Berger, 1995). Existem quatro formas básicas de se alterar as características organolépticas de um alimento: permitindo que microorganismos (adicionados ou já presentes) atuem sobre o alimento; adicionando substâncias que modifiquem as propriedades desse alimento (lipases, por exemplo); processando o alimento de determinada forma (por exemplo, fritando-o); e, finalmente, pela adição direta de substâncias que causem as características desejadas (por exemplo, água ou leite aromatizado).

2.1.3 Funções químicas

Compostos aromatizantes pertencem a diversas funções orgânicas, mas em geral possuem heteroátomos (O, N, S) e um peso molecular relativamente baixo (40-250). Frequentemente apresentam mais de um grupo funcional, sendo os mais comuns os álcoois, éteres, cetonas, aldeídos, ésteres, isoprenóides, fenóis, outros compostos contendo anéis aromáticos ou anéis com N ou O como heteroátomo. Além das características odoríferas, alguns compostos possuem outras características: antimicrobianos, inibidores específicos do crescimento de espécies competidoras, repelentes de predadores, atratores de insetos, estimulantes de crescimento, etc.

Hoje compreendemos melhor a formação de aromas em alimentos, e a identificação dos compostos responsáveis por determinados odores aliada à necessidade de melhorar a qualidade de produtos alimentícios levou à produção industrial de diversos aromas, desde os relativamente simples álcoois e ésteres até os relativamente complexos, como a vanilina.

2.1.4 Produção biotecnológica – vantagens

Existem diversas motivações para o desenvolvimento de processos fermentativos de produção de aromas. O preço dos produtos biotecnológicos ainda não se justifica para alguns álcoois e cetonas sintetizados com relativa facilidade a partir de hidrocarbonetos; no entanto, o fato de a matéria prima para essa síntese ser não-renovável (petróleo) sugere o desenvolvimento de alternativas de produção (na verdade, esse argumento tem causado um renascimento do interesse em diversos processos que já tiveram aplicação industrial no início do século, como a produção de butanol, isopropanol e acetona a partir de matérias primas vegetais) (Serebrennikov, 1994). Por outro lado, o preço de aromas sintéticos mais complexos (por exemplo a vanilina, cerca de 3 vezes mais cara via sintética do que via extrativa) em geral é maior que os de produtos de fermentação.

A idéia de que produtos naturais são em geral saudáveis e de que aditivos sintéticos são geralmente ruins, extremamente difundida hoje, é outra forte motivação para alternativas fermentativas de produção de aromas. A necessidade de substâncias “naturais”, ou “nature-identical” para adição a produtos favorece grandemente os processos biotecnológicos, mesmo quando se pode obter substâncias quimicamente idênticas por via sintética (Berger, 1995). Além disso, processos biotecnológicos em geral são menos agressivos ao meio ambiente que seus similares sintéticos.

É igualmente importante notar que os processos químicos atuais carecem de estereoseletividade (às vezes essencial para a geração de compostos com características adequadas), enquanto os processos enzimáticos são bastante específicos (Cheetham, 1993).

Finalmente, lembremos que as qualidades aromáticas de produtos sintéticos nem sempre se igualam às de produtos naturais. Como alguns aromas são compostos de uma série de substâncias complexas em dosagens determinadas, as vezes a única forma de produzir um aroma “convicente” é usando fontes naturais ou microorganismos.

2.1.5 Mercado mundial

O consumo de aromas e fragrâncias no mundo é estimado em mais de 9,5 bilhões de dólares, dividindo-se em 39% de aromas, 29% de fragrâncias, 17% de óleos essenciais e extratos naturais e 15% de aromas químicos. A taxa média de crescimento do setor foi de 5,7% entre 1990 e 1995, e um crescimento anual de 3,5 a 4% é projetado até 1999, quando espera-se que o consumo de aromas e fragrâncias exceda 11 bilhões de dólares. Desse total, os EUA e a União Européia são responsáveis por 62% do consumo, e o Japão por 16%. Note-se que essas regiões tem apenas 15% da população mundial (Somogy *et al.*, 1995).

2.2 PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE ADITIVOS AROMATIZANTES.

De uma forma geral, são duas as formas de produzir aromas por vias biotecnológicas: por biotransformações de precursores estruturalmente próximos do aroma desejado (pelo uso de culturas de microorganismos, tecidos ou pela ação de enzimas) e pela síntese de metabólitos primários ou secundários em culturas de microorganismos ou tecidos.

2.2.1 Bactérias

Historicamente, é provável que a primeira substância produzida por via biotecnológica para modificar o aroma e sabor de alimentos tenha sido o ácido acético, produzido quando o vinho é oxidado a vinagre usando espécies do gênero *Acetobacter*. A bioconversão do etanol a ácido acético foi descoberta por acidente há milênios, e o princípio da produção de vinagre e ácido acético continua sendo o mesmo até hoje, ainda que se use uma tecnologia mais sofisticada (Gatfield, 1995). Bactérias são tradicionalmente usadas na produção direta de aromas, sobretudo em produtos lácticos aos quais são adicionadas como culturas "starter". Não é de admirar, portanto, que se tenha isolado diversas cepas de bactérias capazes de produzir aromas específicos úteis como aditivos em produtos lácticos (é o caso do diacetil e da acetoína, que ainda serão abordados no texto). Outras possibilidades envolvem o uso de bactérias como *Pseudomonas*, capazes de oxidar uma grande quantidade de compostos e gerar ésteres característicos do morango, especialmente butirato e hexanoato de etila a partir de leite com adição de etanol (Raymond *et al.*, 1990).

2.2.2 Leveduras

Provavelmente os microorganismos mais usados na produção de aromas são as leveduras, devido à grande quantidade de informações acumulada pela pesquisa de cepas para produção de vinhos, e pela identificação de aromas gerados por essas cepas nos produtos fermentados. Espécies dos gêneros *Hansenula*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Geotrichium*, *Saccharomyces* e *Candida*, entre outras, permitem desde a síntese de produtos orgânicos mais simples (álcoois isoamílico, isobutanóico e feniletílico e seus ésteres acéticos, entre outros) (Albertazzi *et al.*, 1994; Pastore *et al.*, 1994), até a biotransformação de ácidos graxos formando lactonas (Gatfield, 1995; Gatfield *et al.*, 1993). Em ambos os casos, esses produtos encontram grande aplicação na indústria de alimentos por serem característicos de frutas. Outra possibilidade na utilização de leveduras é o tratamento térmico de extratos autolisados de leveduras. Extratos de *Saccharomyces cerevisiae* já vêm sendo usados na indústria, mas o tratamento térmico com extrusão do extrato pode gerar diversos compostos pirazínicos, dando aromas de carne e outros alimentos tostados (Izzo e Ho, 1992).

2.2.3 Fungos

Apesar de serem usados há milênios na modificação de cereais e leguminosas através de fermentação sólida (shoyu, miso, koji), ou no desenvolvimento de alguns tipos de queijo (camembert, roquefort, etc.) e serem capazes de produzir uma vasta gama de aromas, os fungos filamentosos ainda são pouco utilizados na produção industrial de aditivos; apresentam, no entanto, grande potencial de aplicação - por exemplo, produção de ésteres tanto sem a adição de precursores (Christien e Rimbault, 1991; Christien *et al.*, 1994) quanto pela ação sobre meios de cultura complexos (resíduos de processamento de produtos agro-industriais, como bagaços de cana, mandioca e maçã). Além disso, representam importantes fontes de lipases, úteis na síntese de ésteres.

2.2.4 Culturas de células

O aroma que melhor imita o original é o que tem a maior quantidade de substâncias que compõe o aroma original, nas concentrações adequadas. Culturas de células da espécie cujo aroma se deseja produzir deveriam ser capazes de produzir aromas extremamente convincentes, já que teriam todo o aparato necessário para produzir as substâncias presentes no padrão natural. No

entanto, nem todas as células de uma planta são responsáveis pela produção do aroma, e culturas de células podem crescer sem produzir qualquer substância de interesse se não forem adicionados precursores e indutores adequados (Hong *et al.*, 1990). Aparentemente, usar culturas de células não se justifica para a produção de ésteres relativamente simples, mas pode ser uma alternativa viável para metabólitos mais complexos como a vanilina e óleos essenciais.

2.2.5 Enzimas

Diversas classes de enzimas podem ser utilizadas na biotransformação de matérias-primas, gerando aromas de interesse industrial. Podem ser enzimas não-isoladas (lipoxigenases e hidroperóxido-liases presentes no bagaço de maçã, por exemplo) (Almosino e Belin, 1991), enzimas isoladas e imobilizadas (Chen e Yang, 1992; Manjón *et al.*, 1991), ou enzimas livres. Provavelmente a classe de enzimas mais utilizada para produção de aromas é a das lipases, capazes de catalisar seletivamente a esterificação/hidrólise de ácidos com álcoois quase sem a presença de água (a presença de água é necessária para a hidratação da enzima, mas em grandes quantidades causa a hidrólise dos ésteres). Lipases de fungos dos gêneros *Mucor*, *Aspergillus* e *Rhizopus* e de leveduras do gênero *Candida* são produzidas industrialmente e têm sido testadas quanto à seletividade e eficiência na produção de ésteres de cadeia curta (Langrand *et al.*, 1990; Manjón *et al.*, 1991; Razafindralambo *et al.*, 1992).

2.2.6 Métodos analíticos

Tanto para a identificação de aromas quanto para o acompanhamento de processos produtivos, a análise dos compostos é indispensável. À parte métodos específicos, variáveis de acordo com a substância, a técnica de mais importância na análise de aromas é a cromatografia gasosa. Uma aplicação importante da cromatografia gasosa aplicada à análise de aromas é a determinação de concentrações e limiares de odor de compostos em misturas por cromatografia olfativa (que alia a análise pelo aparelho à análise sensorial). Outra técnica importante, levando em conta as características às vezes diferentes de enantiômeros, é a resolução de compostos quirais, que utiliza tanto derivados das substâncias a analisar quanto colunas óticamente ativas para a separação de isômeros óticos (RAZAFINDRALAMBO *et al.*, 1992).

2.2.7 Downstreaming

Esse é um nome coletivo para uma grande variedade de tecnologias usadas no isolamento, concentração e purificação de produtos de um processo de fermentação. Diversas razões tornam necessário isolar uma substância de um meio de fermentação. Na maioria dos casos a concentração do produto desejado no meio de fermentação é muito baixa para que o próprio meio seja usado como aditivo; o produto pode não ser suficientemente estável no meio, ou ainda podem existir outras substâncias com características inadequadas para a inclusão em alimentos (Takken *et al.*, 1992). O número de passos necessários para a purificação influencia grandemente o custo de produção e a eficiência de recuperação, de forma que a otimização de cada etapa é importante. Por outro lado, produtos com alto valor agregado permitem a utilização de técnicas mais caras de recuperação. Em geral, aromas são produtos voláteis de baixo peso molecular, de forma que um processo mais ou menos geral de recuperação é a separação das células por centrifugação, decantação ou filtração, eventual extração com solvente e posterior destilação para produtos termoestáveis. Produtos termolábeis podem ser destilados à vácuo ou recuperados por ultrafiltração (separando contaminantes de alto peso molecular) e osmose reversa ou diálise (concentrando o produto). Dependendo da substância (por exemplo, ácidos orgânicos) pode-se usar técnicas cromatográficas.

2.3 O DIACETIL E A ACETOÍNA

O diacetil ou butanodiona ($C_4H_6O_2$) e a acetoína ou 3-hidroxi-butanona ($C_4H_8O_2$) são os responsáveis por parte do aroma em uma vasta gama de produtos lácticos, principalmente queijos (cheddar, cottage) (Antinone *et al.*, 1994); são também os principais componentes do aroma da manteiga e funcionam como “carriers” de outros aromas, com o de vinagre e café (MERCK & Co., 1990). Aparecem ainda em vinhos - especialmente os suaves ou em que a fermentação é interrompida, como o porto (Jay, 1982), em níveis que vão de 2 a 350 ppm para a acetoína e 0 a 2,2 ppm para o diacetil (valores típicos em vinhos não fortificados: 5 a 15 ppm e 0,5 a 1,5 ppm, respectivamente)(Guymon e Crowell, 1961; Ough e Amerine, 1988). Ambas as substâncias têm características aromáticas semelhantes, mas como o diacetil é bem mais potente que a acetoína, é preferido como aditivo (Berger, 1995). A formação de pequenas quantidades de diacetil por oxidação da acetoína pode dar a esta maior importância para o aroma do que o seu odor, por si mesma, poderia indicar (Guymon e Crowell, 1961).

O diacetil é produzido por via sintética a partir da butanona e por via fermentativa através de diversos microorganismos (bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Bacillus*) usando como substrato glicose e outras fontes de carbono. Aparece também como um importante subproduto da produção de furfural a partir de pentosanas (Illovo Sugar, Zambia). A acetoína é produzida a partir do diacetil por redução parcial, por via sintética ou pela ação de microorganismos (MERCK & Co., 1990).

Tanto o diacetil quanto a acetoína são produzidos por diversos microorganismos, sobretudo leveduras e diversas espécies de bactérias. De maior interesse industrial e mais largamente estudadas são as bactérias lácticas, se bem que as leveduras apresentem grande potencial para a produção desses aromas (Romano *et al.*, 1993) e haja estudos em que outros microorganismos produzem traços de diacetil, porém quantidades razoáveis (da ordem de 12g/L) de acetoína (US Pat. 2 529 061, 1946; Serebrennikov, 1994).

Há falta de dados comerciais sobre o volume de produção de diacetil e acetoína pura, bem como sobre o processo produtivo, mas a produção por via fermentativa tem sido objeto de pesquisa freqüente, quase sempre utilizando bactérias lácticas, e tem gerado patentes (US Pat. 2 529 061, 1946; EP 0 430 406 A2, 1990) desde o início do século e mais especialmente nas últimas décadas (US Pat. Office, 1998). A principal utilidade desses aromas é a de servirem como aditivos na produção de queijo ou manteiga ou substitutos para os aromas naturalmente desenvolvidos nesses produtos (por exemplo, destilados de culturas starter, contendo 1000 ppm de diacetil, são largamente usados como aroma de manteiga em margarinas) (Antinone *et al.*, 1994; Pack *et al.*, 1967), se bem que o diacetil apresente também propriedades antimicrobianas (especialmente contra bactérias gram-negativas e fungos) (Jay, 1982).

2.4 BACTÉRIAS LÁCTICAS

São coletivamente classificadas na família Lactobacteriaceae. São encontradas no solo e em qualquer lugar em que haja altas concentrações de carboidratos, produtos da decomposição de proteínas, vitaminas e pouco oxigênio. Muitas bactérias lácticas são encontradas naturalmente no leite, bem como em carne e vegetais, e certas bactérias lácticas são habitantes normais do corpo humano. Em condições ótimas, seu tempo de duplicação é de 30 a 90 min. (Saloff-Coste, 1994)

Apesar desse grupo apresentar morfologias diversas (bastões longos ou curtos, streptococos), seus membros são classificados conjuntamente devido ao seu metabólito principal comum, o ácido láctico. Essas bactérias podem tolerar pH da ordem de 4 por várias semanas, e o grupo é bastante característico fisiologicamente: todos os organismos são gram-positivos, não formam esporos (com a exceção do *Sporolactobacillus inulinus*) e geralmente não apresentam mobilidade (Saloff-Coste, 1994; Stanier *et al.*, 1987).

As bactérias lácticas podem ser divididas de acordo com seus co-produtos metabólicos ou pela sua temperatura ótima de crescimento. Bactérias lácticas homofermentativas têm o ácido láctico como seu principal metabólito (70 a 90%) enquanto bactérias heterofermentativas produzem outros compostos como ácido acético, CO₂ e etanol em conjunto com pelo menos 50% de ácido láctico. Bactérias lácticas mesofílicas crescem melhor a temperaturas na faixa de 25-30°C, enquanto bactérias termofílicas preferem uma faixa de 40-44°C e crescem a uma velocidade maior que as mesofílicas. (Tabela 2.1) (Saloff-Coste, 1994).

As bactérias lácticas pertencem a diversos gêneros, divididos em espécies, subespécies, variedades e cepas. Essa divisão é feita de acordo com diversas propriedades como forma, temperatura ótima de crescimento, capacidade de fermentar diversos açúcares, necessidades nutricionais, presença de determinadas enzimas, e mais recentemente de acordo com informação genética. Houve mudanças recentes: bactérias antes classificadas como *Streptococcus* foram transferidas para o gênero *Lactococcus*. Na verdade, as três subespécies de *Lactococcus lactis* apresentam características muito semelhantes: pelo menos 50% das seqüências do DNA são idênticas, e possuem todas o mesmo teor G+C. Provavelmente as características que diferenciam essas subespécies - inclusive a produção de diacetil - são controladas por plasmídios, e podem

ser transmitidas, perdidas ou readquiridas dependendo da forma de cultivo. (Saloff-Coste, 1994; Bergey's, 1986)

Tabela 2.1 - Algumas características de bactérias lácticas usadas em derivados do leite (colchetes [] indicam traços do produto). De (Saloff-Coste, 1994)

Gênero (Forma)	T ótima	Espécie	Produtos principais de metabolismo	Produtos secundários de metabolismo
<i>Streptococcus</i> (cocos)	40-44°C	<i>S. thermophilus</i>	ácido L(+) láctico	acetaldeído, acetona, acetoína, diacetil [etanol]
<i>Lactobacillus</i> (bastões)	40-44°C	<i>Lb. bulgaricus</i>	ácido D(-) láctico	acetaldeído, acetona, acetoína, diacetil [etanol]
		<i>Lb. helveticus</i>	ácido DL láctico	ácido acético, acetaldeído, diacetil, [etanol]
		<i>Lb. lactis</i>	ácido D(-) láctico	acetaldeído, acetona, diacetil, [etanol]
		<i>Lb. acidophilus</i>	ácido DL láctico	acetaldeído, [etanol]
	25-30°C	<i>Lb. casei</i>	ácido L(+) láctico	ácido acético, [etanol]
		<i>Lb. kefir</i>	ácido DL láctico	ácido acético, acetaldeído, etanol, CO ₂
<i>Lactococcus</i> (cocos)	25-30°C	<i>Lc. lactis</i>	ácido L(+) láctico	acetaldeído, acetona, diacetil, etanol
		<i>Lc. cremoris</i>	ácido L(+) láctico	acetaldeído, acetona, diacetil, [etanol]
		<i>Lc. diacetylactis</i>	ácido L(+) láctico, acetaldeído, diacetil, acetoína, CO ₂	acetona, [etanol]
<i>Pediococcus</i> (cocos)	25-30°C	<i>P. acidilactici</i>	ácido DL láctico	[acetoína, diacetil]
<i>Leuconostoc</i> (ovóides)	25-30°C	<i>Ln. cremoris</i>	ácido D(-) láctico, acetoína, (ácido acético), diacetil, CO ₂	etanol
		<i>Ln. dextranicum</i>		
		<i>Ln. lactis</i>		
<i>Bifidobacterium</i> (bastões ou bífidos)	35-38°C	<i>B. breve</i>	ácido L(+) láctico, ácido acético	ácido fórmico, ácido succínico, acetaldeído, acetona, acetoína, diacetil, [etanol]
		<i>B. bifidum</i>		
		<i>B. longum</i>		
		<i>B. infantis</i>		

As bactérias lácticas são todas dependentes de carboidratos (principalmente lactose e glicose) como fonte de energia para a produção de ATP, e excretam ácido láctico. São fermentadores obrigatórios que não contêm heminas, mas são aerotolerantes. Apesar de poderem fazer oxidações limitadas de uns poucos compostos orgânicos, essas não são acompanhadas pela formação de ATP. Assim, bactérias lácticas são muito pouco afetadas pela presença ou ausência de oxigênio. São também bastante fastidiosos: além dos carboidratos, proteínas do leite, peptídeos, aminoácidos específicos e derivados de ácidos nucleicos são necessários para fornecer

os precursores nitrogenados para síntese de proteínas e outros compostos. Várias vitaminas (lactoflavina, tiamina, ácido pantotênico, etc.), podem ser necessárias para a catálise de diversas reações, mas a necessidade de vitaminas específicas e sais minerais varia de espécie para espécie. Como resultado de sua capacidade de síntese extremamente limitada, as bactérias lácticas são usualmente cultivadas em meios complexos contendo peptona, extrato de levedura e outros digestos de matéria animal ou vegetal, suplementados com uma fonte de açúcar (Saloff-Coste, 1994; Schlegel, 1993; Stanier *et al.*, 1987).

As bactérias lácticas, apesar de anaeróbias, podem formar citocromos durante o crescimento em meios contendo heme (por exemplo, um meio contendo hemácias). A enzima *pseudocatalase* liga-se com o heme fornecido para produzir uma enzima com as propriedades da catalase. Além disso, a maioria das bactérias lácticas acumula grandes quantidades de Mn^{2+} (na faixa de 10 a 25mM). Nessas concentrações, o Mn^{2+} é funcionalmente equivalente à enzima superóxido dismutase (que aparentemente falta em todas as bactérias lácticas exceto *Streptococcus*, e protege a célula dos efeitos nocivos do oxigênio). As poucas bactérias lácticas incapazes de acumular Mn^{2+} são bastante sensíveis ao oxigênio (Stanier *et al.*, 1987). Assim, as Lactobacteriaceae podem ser vistas como deficientes metabólicos que perderam a capacidade de sintetizar uma série de compostos, provavelmente como consequência da sua especialização para o crescimento no leite e outros meios ricos em nutrientes e vitaminas. Por outro lado, possuem uma característica que falta à grande maioria dos outros microorganismos: podem utilizar lactose como substrato, mas apresentam baixo crescimento devido ao seu metabolismo exclusivamente fermentativo (Schlegel, 1993, Stanier *et al.*, 1987).

A via metabólica mais importante de bactérias lácticas começa com o transporte ativo de lactose através da membrana celular. A lactose ou lactose-fosfato é então quebrada em glicose e galactose ou galactose e galactose-fosfato (Figura 2.1). Em bactérias homofermentativas (*Streptococcus termophilus* e a maioria dos lactobacilos e lactococos), a glicose é então fracionada por uma série de reações até piruvato, que é então transformado em lactato pela enzima lactato desidrogenase:

$$C_6H_{12}O_6 \text{ (glicose)} \rightarrow 2 C_3H_6O_3 \text{ (lactato)} + 2ATP.$$

Bactérias lácticas heterofermentativas como leuconostocs não possuem algumas das enzimas necessárias para a via descrita, e usam outra rota (da pentose fosfato) levando a diferentes subprodutos, incluindo acetato, etanol e CO_2 , com rendimento de apenas um ATP (Saloff-Coste, 1994).

Bactérias lácticas não sintetizam diversos aminoácidos essenciais, de forma que a proteólise de peptídeos e proteínas do meio de cultura é necessária para o seu crescimento. Essas bactérias possuem enzimas proteolíticas na parede celular, na membrana celular e no citoplasma, mas apenas 2% da caseína é hidrolisada durante a fermentação do leite.

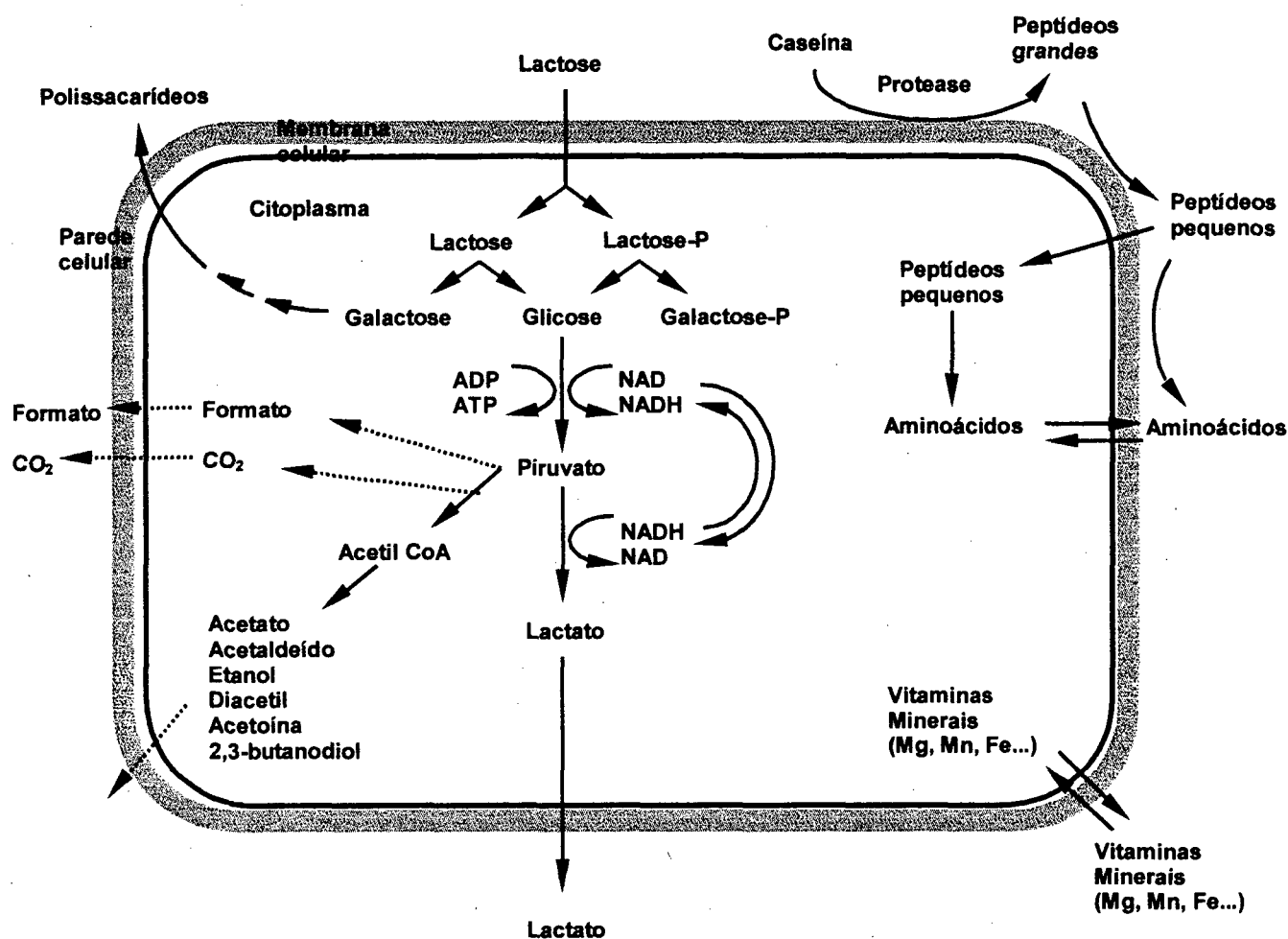


Figura 2.1 - Principais vias metabólicas de bactérias lácticas (Saloff-Coste, 1994)

Diversas bactérias lácticas homofermentativas geram produtos de fermentação diferentes do ácido láctico (normalmente formato, etanol e acetato) sob certas condições. Isso não é uma mudança para a via da pentose fosfato, mas sim uma mudança na forma como o piruvato é metabolizado: menos lactato é produzido, e o resto do piruvato é convertido em acetil-CoA. A base metabólica dessa mudança é que a lactato desidrogenase é ativada pela frutose bifosfato, e a piruvato-formato liase é inibida pela triose fosfato (Figura 2.2) Assim, em condições de excesso de nutriente, a concentração de intermediários do catabolismo de carboidratos é alta, e o

piruvato é transformado quantitativamente em lactato; em condições de limitação de nutriente, parte do piruvato é convertido em etanol e acetato, presumivelmente uma adaptação que permite uso mais eficiente da quantidade limitada de açúcar (ATP é gerado durante a conversão de piruvato a acetato) (Stanier, 1987).

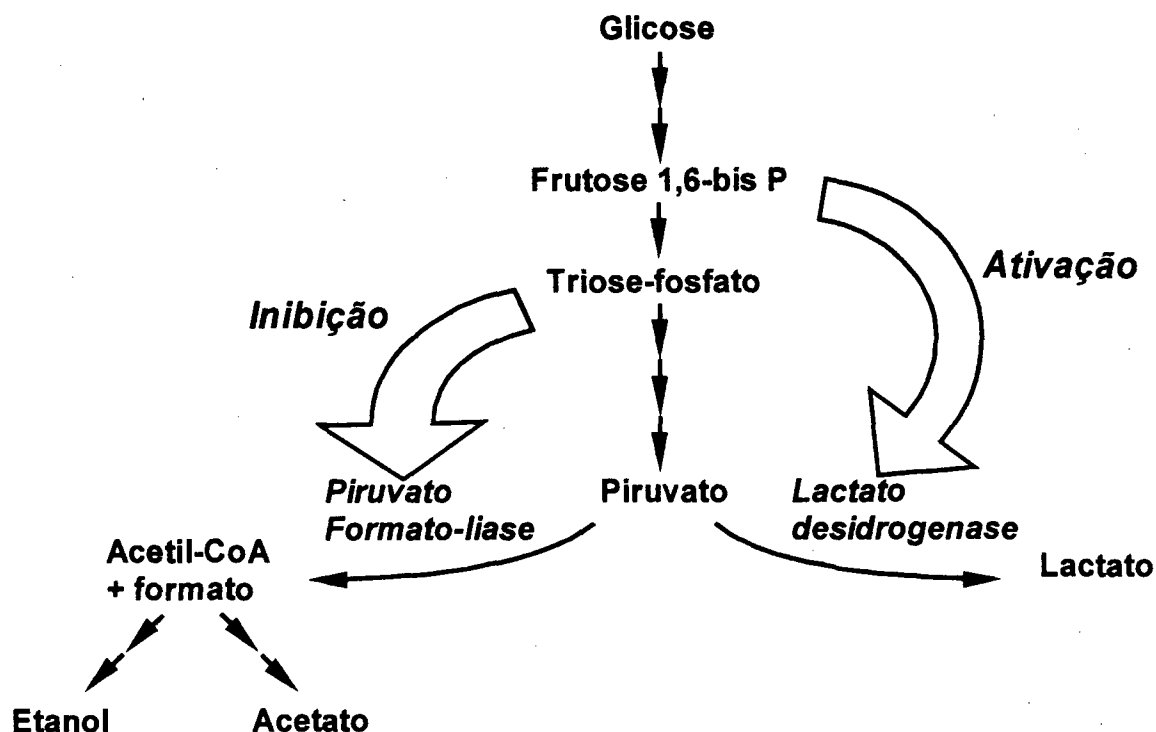


Figura 2.2 - Regulação das vias de decomposição do piruvato (Stanier *et al.*, 1987)

O intenso estudo de bactérias lácticas em indústrias de derivados do leite levou ao isolamento de diversas cepas com características interessantes: um processo de produção sugere o fornecimento de um açúcar como fonte de carbono e com a adição de heme (porfirina, sangue ou tecidos animais) e de cátions metálicos em meio aerado usando a cepa *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* OLS 3022 e produzindo até 8,4g/L de acetoína e 0,33g/L de diacetil (European Pat. Appl., 1990). Outro estudo reforça a necessidade de aeração para o aumento da produção de diacetil na mesma espécie (*L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*) ao demonstrar que a relação entre diacetil e a acetoína é uma função linear e crescente da concentração inicial de oxigênio em queijos (Bassit *et al.*, 1993). Segundo (Monnet *et al.*, 1994), a transformação de α -acetolactato em diacetil segue um mecanismo estritamente químico e depende do nível de aeração do meio (vide Figura 2.3).

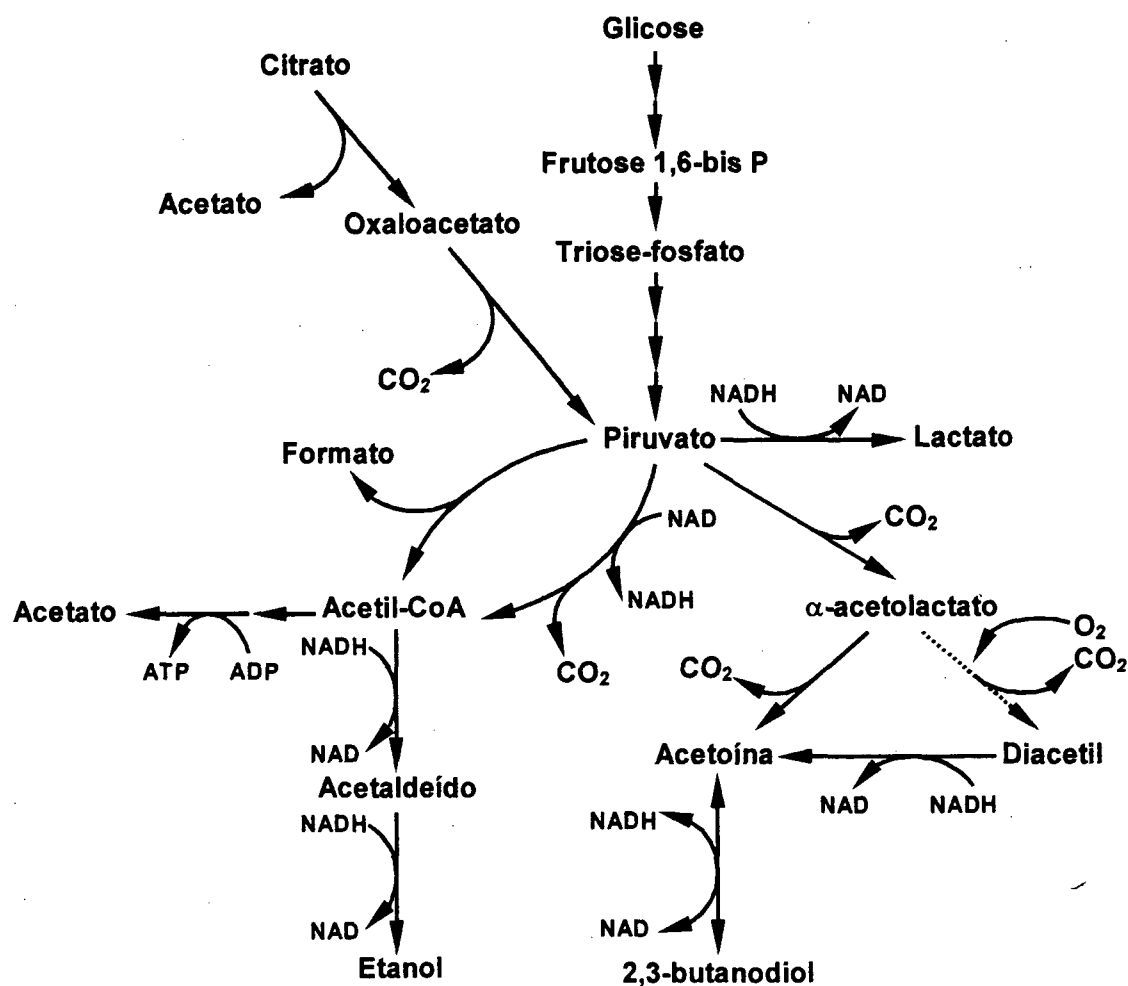


Figura 2.3 - Vias metabólicas na produção de acetoina e diacetil em *Lld* (Ramos et al., 1994)

2.4.1 Acetoína produzida por bactérias lácticas

Na maioria das bactérias a acetoina é formada a partir do piruvato e é portanto um produto do metabolismo de carboidratos. Em geral, pouca ou nenhuma acetoina é produzida a partir de carboidratos sem a presença de uma fonte adicional 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. Duas moléculas de piruvato condensam-se formando o α -acetolactato, que é descarboxilado formando acetoina, posteriormente convertida em butanodiol (Cogan *et al.*, 1981). A taxa de entrada do citrato nas células não é regulada pelo metabolismo - há uma relação linear entre a taxa de consumo de citrato no meio e a quantidade de biomassa - e a produção de acetoina funcionaria como um mecanismo de detoxificação, removendo piruvato desnecessário para a síntese de material celular em algumas espécies como o *S. diacetylactis* (Harvey e Collins, 1963).

2.4.2 Diacetil produzido por bactérias lácticas

O diacetil é formado a partir do α -acetolactato ou a partir do fosfato de hidroxietil-tiamina (TTP)(Schlegel, 1993). Há ainda certa dúvida sobre a rota metabólica correta; alguns autores defendem a existência de uma diacetil-sintase que seria ativada por ferro, cobre ou outros cátions metálicos (Takahashi *et al.*, 1990; Kaneko *et al.*, 1990; Kaneko *et al.*, 1991). Outros não encontraram sustentação nessa hipótese, e sugerem que ocorre a oxidação do α -acetolactato para a formação do diacetil - o que é reforçado pela maior produção de diacetil em sistemas aerados e pela formação de diacetil a partir do α -acetolactato *sem* a presença de microorganismos em sistemas aerados (Bassit *et al.*, 1993; Hugenholtz e Starrenburg, 1992; Monnet *et al.*, 1994; Verhue *et al.*, 1991). O diacetil formado é convertido em acetoína através de uma diacetil-reductase, de forma que a acumulação de diacetil nos meios de fermentação é dificultada. Assim, o diacetil não é produto direto do metabolismo do citrato; Hugenholtz e Starrenburg (1992) confirmam que o diacetil é produzido por descarboxilação oxidativa do α -acetolactato, e Ramos *et al.* (1994) mostra que, se existir uma diacetil sintase, essa é responsável por menos de 10% do diacetil produzido.

O α -acetolactato é um intermediário central na síntese de aminoácidos de cadeia ramificada como a valina e a leucina. Sofre descarboxilação para a acetoína quando em pH ácido, enquanto em pH neutro e na presença de ar sofre descarboxilação oxidativa para diacetil, catalisada por Fe^{3+} ou Hg^{2+} (Park *et al.*, 1995).

A bactéria láctica *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetilactis* (abreviadamente, Llld) é homofermentativa. e capaz de produzir quantidades significantes de diacetil (da ordem de 5 ppm) (Seitz, 1990), motivo pelo qual foi utilizada no presente estudo. Quando cresce em meio contendo carboidratos, adicionado de citrato, as duas fontes de carbono são utilizadas ao mesmo tempo produzindo L(+) lactato, acetato, CO_2 , butanodiol, acetoína e diacetil (Cachon e Diviès, 1993). Quase todo o piruvato adicional vindo do citrato pode tornar-se acetoína e diacetil, especialmente acetoína (Harvey e Collins, 1963). Experimentos com quantidades variáveis de glicose (em formulações quimicamente definidas) mostraram que, em condições de excesso de açúcar, o Llld é homofermentativo, enquanto que com quantidades reduzidas de açúcar parte é metabolizada em formato, acetato, etanol e 2,3 butanodiol (Smith *et al.*, 1992). Quando o citrato é a única fonte de carbono a produção de acetoína é bastante alta (mas o crescimento é lento);

quando o meio contém açúcar e glicose, cerca de 80% do citrato é convertido em lactato (Ramos *et al.*, 1994). Segundo Boumerdassi *et al.* (1997), um aumento na concentração de citrato (em meios aerados) diminui a conversão em diacetil e acetoína mas aumenta a quantidade desses produtos.

Sabe-se que a aeração tem grande influência sobre a produção de diacetil por essa bactéria (produções de quase zero, para meio sem O₂, até 20ppm para meios com O₂ puro) (Bassit *et al.*, 1993). A aeração aumenta a proporção diacetil:acetoína porque uma enzima, a NADH oxidase, aparentemente é capaz de usar o O₂ como acceptor final de elétrons, assim oxidando a NADH₂ e exigindo menos piruvato (que é reduzido a lactato para reoxidar a NADH₂ a NAD). A "sobra" de piruvato não é suficiente para aumentar a produção de acetoína, diacetil ou material celular a partir de piruvato porque a atividade máxima da enzima se verifica para pH \cong 7, mas é suficiente para aumentar a proporção de diacetil em relação à acetoína porque cada redução das etapas diacetil \rightarrow acetoína \rightarrow butanodiol requer NADH₂ como doador de elétrons; facilitar a oxidação da NADH₂ com O₂ "mantém" o diacetil (Bruhn e Collins, 1970); no entanto, estudos enzimáticos com outras bactérias indicam que a diacetil redutase não é adequada, em termos de propriedades cinéticas, para a regulação do equilíbrio NAD/NADH (González *et al.*, 1988).

Uma das possibilidades para o aumento da quantidade de diacetil produzida e mantida no meio de cultura é o resfriamento da cultura enquanto o nível de diacetil está alto; o resfriamento imediato a cerca de 2°C inibe a atividade da diacetil redutase, prevenindo a perda do aroma (Pack *et al.*, 1967); a outra é manter as células em condições de limitação de carbono e pH ácido, situação em que todo o citrato é transformado em acetoína (Cogan *et al.*, 1981).

Kaneko *et al.* (1987, 1990) sugerem a utilização de íons metálicos, especialmente cobre, ferro, cobalto e manganês ao meio de cultura para estimular a produção de diacetil, tendo relatado concentrações de 2 a 9 ppm. Autores do mesmo grupo (Ochi *et al.*, 1991) sugerem que a adição de catalase (pura ou contida em homogenatos de fígado bovino) aumenta grandemente a produção de diacetil, relatando valores da ordem de 30ppm em culturas em batelada; segundo os autores, essa maior produção se deve ao consumo do H₂O₂ no meio.

Estudos indicam que a imobilização de células em altas concentrações, reatores com pervaporação e outras modificações podem ser um caminho promissor para a produção de

diacetil; Ishii *et al.* (1995) obtiveram permeados com até 2000ppm de diacetil; nessas concentrações, o permeado pode ser usado diretamente como aditivo em alimentos.

2.5 MEIOS DE CULTIVO E MÉTODOS ANALÍTICOS

2.5.1 Meios de cultivo

A maioria dos estudos feitos com Llld visou a elucidação das vias metabólicas, usando para tanto meios complexos como o MRS original e modificado (vide materiais e métodos). Para a produção de culturas starter, no entanto, os meios mais usados foram com soro de leite *in natura* ou reconstituído, e mostrou-se que a adição de extrato de levedura até quantidades da ordem de 2,5% podem aumentar bastante o crescimento de bactérias lácticas (Aeschlimann e Stockar, 1990). OH *et al.* (1995) obtiveram grande melhoramento do crescimento de *L. casei* em meio usando glicose, triptona e extrato de levedura e determinando as concentrações ótimas do meio através de planejamento experimental com superfícies de resposta.

2.5.2 Métodos de análise dos metabólitos de interesse

A análise de diacetil, acetoína e acetolactato pode ser feita por métodos cromatográficos, espectrofotométricos ou enzimáticos. Um método enzimático é a redução da acetoína a butanodiol através da desidrogenação de NADH. A mudança de absorbância da NADH é medida espectrofotometricamente. A determinação do diacetil por cromatografia é difícil porque sua concentração é baixa, e o seu pico é facilmente encoberto pelo do etanol na maioria das colunas; a de acetoína é simples e confiável, e a de acetolactato deve ser feita com cuidado por causa da descarboxilação espontânea, sob aquecimento, dessa substância (Ough e Amerine, 1988). Aparentemente, esse foi um dos motivos pelos quais alguns pesquisadores obtiveram produtividades muito altas de diacetil - incubaram amostras por muito tempo a temperaturas altas (30 min., 70°C) (Hugenholtz e Starrenburg, 1992).

Métodos espectrofotométricos: o mais específico é, provavelmente, a conversão do diacetil a dimetilglioxima pela adição de hidrócloro de hidroxilamina; a dimetilglioxima formada pode ser medida de várias formas, sendo a mais comum a conversão no seu derivado de níquel tetravalente (de cor característica vermelha). O método mais sensível (detecta 0,5 ppm contra 20

ppm pelo método da dimetilglioxima) (Mattesich e Cooper, 1989) e comum é o da creatina (solução a 0,5% em água, KOH ou NaOH 2,5M) e α -naftol (solução a 5% em isopropanol, etanol ou KOH 2,5M); os reagentes são misturados, a amostra é adicionada, ocorrendo a formação de um complexo de cor avermelhada. A absorvância é lida a 530 nm contra um branco adequado (Guymon e Crowell, 1961, Renna *et al.*, 1993). Essa é a reação de Voges-Proskauer, e o método tem sido utilizado por vários pesquisadores após as modificações feitas por Westerfeld (Ough e Amerine, 1988).

Esse método tem alguns inconvenientes: a instabilidade dos reagentes (o α -naftol escurece sob ação do oxigênio do ar), a interferência da concentração de acetoína sobre a de diacetil (o método só dá respostas realmente confiáveis para concentrações de diacetil e acetoína da mesma ordem de grandeza), e a dependência do tempo (após a adição dos reagentes, a leitura é feita após alguns minutos para o diacetil e após 1h para a acetoína). Mattesich e Cooper (1989) determinaram que a absorvância máxima da amostra adicionada aos reagentes se dava a 30-35 min. do início da reação, e que a cor se desenvolve muito mais rápido se a amostra for deixada por 1 min em banho-maria, mas é um pouco mais tênue que a cor da amostra deixada por 35 min. Guymon e Crowell (1961) determinaram a absorvância máxima para amostras de diacetil após 3 min. A interferência na leitura da concentração de "diacetil" pela acetoína, presente em grandes quantidades, é responsável pelos valores altos de diacetil produzido reportados em bibliografia (Guymon e Crowell, 1961).

O α -acetolactato pode ser descarboxilado a acetoína pela acidificação e aquecimento de uma amostra; a influência mútua da concentração do diacetil e da acetoína sobre a cor desenvolvida pode ser contornada pela passagem de N_2 através da amostra e o recolhimento do diacetil em água (Park *et al.*, 1995).

2.5.3 Métodos de determinação de biomassa (usando Lld)

Harvey e Collins, (1963) e Petit *et al.* (1989) usaram peso seco e Abs 600nm; (El-gendy *et al.*, 1982 e Smid *et al.*, 1989) usaram peso seco e Abs 660nm; Cachon e Diviès (1993) usaram Abs 575nm; Olivares *et al.* (1993) usaram Abs 560nm; Jensen e Hammer (1993) usaram Abs 450 nm (sem transformar em biomassa); Boumerdassi *et al.* (1997) usaram Abs 575 nm.

2.6 MÉTODOS DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.

O objetivo de um planejamento experimental é, via de regra, a identificação dos valores ótimos de diversas variáveis (também chamadas de fatores) que afetam o processo. A avaliação da influência dessas variáveis é feita pela análise de uma “resposta” do sistema: por exemplo, no caso de uma reação de esterificação em batelada, as variáveis podem ser as concentrações de reagentes, a temperatura, a quantidade de catalisador e o tempo de reação, enquanto que a resposta pode ser a concentração final de éster formado.

A abordagem tradicional para a avaliação do efeito de diversas variáveis (fatores) na resposta de um sistema foi, por muito tempo, a variação de “um de cada vez”. Nessa abordagem é possível retirar alguma informação útil do sistema, mas com um inconvenientes: um número muito grande de experimentos, se quisermos pesquisar uma grande (e completa) faixa de variação das variáveis, *ou* informações incompletas sobre o sistema, se quisermos fazer menos experimentos. Isso ocorre porque freqüentemente há influências de uma variável sobre outra (o que chama-se de “interação”), de forma que a variação de uma variável *a* pode demonstrar um efeito na resposta para um certo valor de uma variável *b*, mas um efeito diferente quando essa variável *b* apresenta um novo valor. Um exemplo pode ajudar a ilustrar os dois métodos:

Deseja-se maximizar a produção de biomassa de um microorganismo cujo meio de cultura é composto por soro de leite reconstituído e extrato de levedura desidratado, dissolvidos em água.

Nesse caso, a “resposta” será a *absorbância corrigida* do meio fermentado (considerada diretamente proporcional à massa seca de microorganismo) e as “variáveis independentes”, “fatores” ou “parâmetros” são a *concentração de soro de leite e a concentração de extrato de levedura*. Pode-se chamar a faixa de variação dos fatores de “domínio experimental”.

O método clássico utilizado para determinar os valores dos fatores que dão a maior resposta é a variação “um de cada vez”. Digamos então que, presumindo que o microorganismo cresceria bem usando a lactose do soro de leite como substrato, tentou-se fixar a quantidade de soro de leite no meio de cultivo em 100% (100% de soro de leite reconstituído, sem a adição de mais água), enquanto a quantidade de extrato de levedura foi testada nos níveis de 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 e 3%. Chamaremos essa série de experimentos de Teste 1, cujos resultados são apresentados a seguir:

Tabela 2.2 - resultados do Teste 1

% de extrato de levedura (g/100 mL de meio)	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3
Absorbância corrigida (x 1000)	0	71	120	154	148	138	100

Os resultados podem indicar que o microorganismo não cresce sem extrato de levedura, mas que uma quantidade muito grande de extrato (3%) é menos eficiente que uma quantidade mais moderada (1,5% a 2%).

Fixando agora a quantidade de extrato de levedura no meio em 1,5% e variando a quantidade de soro de leite de 100% (só soro reconstituído) até 10% (10% de soro reconstituído, 90% de água), obtém-se os seguintes resultados (chamaremos essa série de experimentos de Teste 2):

Tabela 2.3 - resultados do Teste 2

% de soro de leite (mL / 100 mL de meio)	100	72,5	55	32,5	10
Absorbância corrigida (x1000)	154	353	580	860	973

Donde se conclui que o melhor meio de cultura é o que utiliza 10% de soro de leite, 90% de água e 1,5% de extrato de levedura adicional.

O método utilizado nos Testes 1 e 2 permitiu determinar um meio de cultivo que dá uma produtividade muito maior do que a presunção inicial, de um meio de cultivo com 100% de soro de leite. Esse não é necessariamente, no entanto, o melhor valor para as concentrações dentro das faixas estudadas: pouco se sabe sobre o efeito da quantidade de extrato de levedura sobre o crescimento para concentrações baixas e moderadas de soro. O soro de leite contém, por si só, alguns nutrientes; é possível que, para baixas concentrações de soro de leite (em que houve grande crescimento) o próprio extrato de levedura não seja necessário em níveis tão altos. Em suma: sabemos que a concentração de extrato parece ter um efeito positivo sobre a concentração de biomassa, enquanto o soro de leite parece ter um efeito negativo (quanto menor a concentração, tanto maior a produção de biomassa), mas não sabemos qual a interação entre esses efeitos.

Para tentar determinar de uma forma mais completa o comportamento do sistema, realizar-se-á um plano fatorial. Um plano como esse exige que se realize todas as combinações possíveis das variáveis utilizadas, nos níveis estudados; ora, o número de combinações possíveis é igual ao

número de níveis elevado ao número de variáveis. Por exemplo, usando três variáveis em quatro diferentes níveis, há $4^3 = 64$ diferentes combinações ou experimentos. Naturalmente, quanto menos níveis e variáveis, menos experimentos são necessários. Como são feitas todas as combinações, um número muito grande de níveis e de variáveis pode inviabilizar o uso do método; felizmente, dois níveis (alto/baixo, ou presença/ausência) de uma variável são geralmente suficientes para que se avalie o seu efeito na resposta. Dessa forma, planos 2^k , onde k é o número de variáveis, são os mais comuns (BARROS NETO *et al.*, 1996). Ainda assim, um número grande de variáveis pode exigir uma quantidade muito grande de experimentos – se desejarmos verificar o efeito de uma dezena de variáveis na resposta, por exemplo, chegaremos a $2^{10} = 1024$ experimentos! Num caso como esse, deve-se levar em conta que **a)** nem todas as variáveis de interesse apresentam influência significativa na resposta, de forma que é mais sensato avaliar a influência potencial de cada variável na resposta antes de buscar efeitos de interação, e **b)** nem todas as variáveis apresentam efeitos pronunciados de interação com outras variáveis, e a sua influência na resposta pode ser facilmente determinada por uma série modesta de experimentos.

No nosso exemplo temos duas variáveis, então são necessários $2^2 = 4$ experimentos, variando a concentração de extrato de levedura e a de soro de leite em dois níveis. Esses níveis devem ser escolhidos com base em alguns conhecimentos prévios sobre o comportamento do sistema (por exemplo, sabe-se que bactérias exigem um a_w relativamente alto, de forma que concentrações extremamente altas de substrato podem inviabilizar o crescimento do microorganismo e não devem ser usadas).

Por outro lado, os níveis escolhidos devem ser próximos o suficiente para que a resposta do sistema possa ser adequadamente representada por uma função simples no intervalo pesquisado (por exemplo, a função transcendental $f(x) = e^x$ pode ser aproximada, **no intervalo entre 0,1 e 0,8**, para fins experimentais, pela reta $f(x) = 0,875371 + 1,672356 \times x$ com coeficiente de regressão 0,993, ao nível de confiança de 5%. A mesma função pode ser aproximada para uma reta para outros intervalos pequenos – 10 a 11, por exemplo – **mas não para intervalos extensos** – de 1 a 10, por exemplo). Finalmente, a diferença entre os dois níveis não pode ser tão pequena que não cause diferença na resposta, do contrário não se saberá qual a influência da mudança da variável na resposta.

Usaremos os níveis 0 e 1,5% para o extrato de levedura (YEA) e 55 e 100% para o soro de leite (SORO) (Tabela 2.4). O quinto experimento apresentado é chamado de ponto central e atende à necessidade de determinar a validade do modelo proposto para o sistema, como se discute a seguir.

Tabela 2.4 - Planejamento fatorial 2²

Experimento	% YEA (g/mL de meio)	% soro (mL/mL de meio)	YEA	SORO
1	1,5	100	+	+
2	1,5	55	+	-
3	0	100	-	+
4	0	55	-	-
5	0,75	77,5	0	0

É comum usar os níveis na forma **codificada** (através de uma operação de mudança de variável), atribuindo-se o valor +1 ou apenas “+” ao nível mais alto e -1 ou apenas “-” ao nível mais baixo. Dessa forma, o nível intermediário – o ponto central – é a média aritmética entre os valores do nível mais alto e do mais baixo; de forma codificada, é zero. Passar do nível -1 para o +1 implica em aumentar em 2 unidades o valor da variável. Isso terá importância na hora de aplicar os efeitos em um modelo.

Nada impede que se use os valores reais para cálculos, mas como a determinação dos efeitos implica em operações com matrizes, fica mais fácil usar variáveis codificadas – isso ficará claro no texto à frente.

A codificação de variáveis pode ser feita pelo seguinte procedimento: subtrai-se da variável a codificar o valor médio, e divide-se o resultado pela metade da diferença entre o valor superior e o valor inferior:

$$\text{Variável (codificada)} = \frac{2 \times (\text{variável a codificar} - \text{valor médio})}{(\text{nível alto} - \text{nível baixo})}$$

Usando como exemplo o soro: o nível inferior é 55%, enquanto o superior é 100%. Logo:

$$55\%: 2 \times (55 - (55+100)/2)/(100-55) = 2 \times (55 - 77,5)/45 = -1$$

$$100\%: 2 \times (100 - (55+100)/2)/(100-55) = 2 \times (100 - 77,5)/45 = +1$$

$$77,5\%: 2 \times (77,5 - (55+100)/2)/(100-55) = 2 \times (77,5 - 77,5)/45 = 0$$

Usando essas variáveis codificadas, o planejamento experimental pode ser visto como um quadrado no plano YEA × SORO (Figura 2.4).

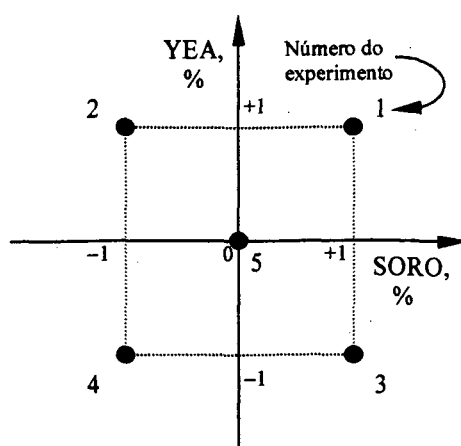


Figura 2.4 - Disposição dos experimentos no plano YEA×SORO (planejamento 2^2 , usando variáveis codificadas)

Com os quatro experimentos do planejamento será possível determinar coeficientes para um modelo matemático da resposta do sistema como função das variáveis, por exemplo:

$$ABS = b_0 + b_1 YEA + b_2 SORO + b_3 YEA \times SORO$$

onde ABS = absorvância do fermentado
 YEA = % de extrato de levedura, em g/100mL de meio
 SORO = % de soro reconstituído, em mL/100mL de meio
 b_0, b_1, b_2, b_3 são coeficientes a determinar

Como os coeficientes serão determinados por mínimos quadrados, teremos resultados mais confiáveis se realizarmos algumas duplicatas de experimentos. Além disso, o modelo acima apresentado **sempre** terá coeficientes b_0 - b_3 que satisfaçam as 4 respostas dos experimentos do plano 2^2 ; para avaliar o ajuste do modelo, é necessário usar um ponto extra com valores diferentes das quatro combinações usadas para os fatores. Normalmente isso é feito adicionando um ponto central (0,0), o que permite verificar o ajuste do modelo proposto. Geralmente esse ponto é usado também para as duplicatas, e um tipo comum de planejamento é 2^k com três repetições em um ponto central. O valor zero para as variáveis no ponto central corresponde à adição de um nível, mas o planejamento não é do tipo 3^k porque não são feitas todas as combinações de níveis.

Analisemos agora os resultados obtidos para o planejamento 2^2 , usando um ponto central (Tabela 2.5):

Tabela 2.5 - Resultados do planejamento 2^2 com ponto central

Experimento	% YEA (g/mL de meio)	% SORO (mL/mL de meio)	YEA	soro	Resposta (absorbância $\times 1000$)
1	1,5	100	+	+	148
2	1,5	55	+	-	590
3	0	100	-	+	0
4	0	55	-	-	254
5	0,75	77,5	0	0	331

Os resultados experimentais obtidos mostram imediatamente que é vantajoso diminuir a quantidade de soro de leite (os resultados em que seu nível é mais baixo deram a maior resposta).

O “efeito principal” de cada variável sobre a resposta é diferença entre a média das respostas com o nível alto e a média com o nível baixo, ou seja:

$$\text{Efeito (YEA)} = (148 + 590)/2 - (0 + 254)/2 = 242$$

$$\text{Efeito (SORO)} = (148 + 0)/2 - (590 + 254)/2 = -348$$

A interpretação desses efeitos é que um incremento de extrato de levedura do nível -1 para o nível +1 implica em um aumento médio de 0,242 unidades de absorbância na resposta; analogamente, um aumento do nível de soro de leite do nível -1 para o nível +1 implica em uma diminuição da resposta em 0,348 unidades de absorbância. A princípio, essa informação já seria suficiente para que pudéssemos planejar uma nova série de experimentos em torno do ponto 2, usando níveis mais baixos de soro (que possui um efeito negativo) e mais altos de extrato de levedura (que possui um efeito positivo). No entanto, ainda não tiramos toda a informação útil do sistema – nem encontramos os parâmetros b_0 - b_3 que satisfazem nosso modelo. Primeiro, calculemos o efeito de **interação** entre YEA e SORO:

$$\text{Efeito (YEA x SORO)} = (148+254)/2 - (590+0)/2 = -94$$

Esse efeito de interação indica que o aumento simultâneo dos níveis de extrato de levedura e de soro de leite, dentro da faixa de concentrações utilizada, provoca uma diminuição no crescimento do microorganismo. Não é sensato analisar o efeito de interação sem verificar os efeitos principais; comparando os três efeitos, verifica-se que a) os efeitos principais são, no nosso

sistema, bem maiores que o efeito de interação, e b) o valor negativo do efeito pode se dever ao valor (também negativo, e bastante pronunciado) do efeito principal do soro.

Enquanto a “visualização” de como obter os efeitos principais (diferença entre a média das respostas com nível alto e nível baixo) é mais ou menos intuitiva, perceber “de onde vem” o cálculo dos efeitos de interação é mais difícil. Pode-se dizer que, para um par de variáveis, o efeito de interação é a diferença entre a média das respostas com níveis das variáveis mais próximos (onde a interação, se houver, será mais importante: com ambos os níveis altos, ++, ou ambos baixos, --) e a média das respostas com níveis contrastantes (onde a interação será menor, +-, e -+).

Como já foi explicado, os valores dos efeitos principais e de interação já são suficientes para permitir o planejamento de um novo conjunto de experimentos. Por exemplo, um efeito de pequena magnitude (em relação a outro) indicaria que, no domínio experimental pesquisado, a variação do parâmetro tem influência desprezível na resposta (mas é de suma importância escolher bem o domínio experimental). Assim, num plano de experimentos seguinte, seria conveniente utilizar o menor nível da variável (seria provavelmente mais econômico).

Pode-se usar os efeitos principais e o de interação para fazer um modelo do comportamento do sistema, escrevendo-se a resposta de um experimento como a média dos experimentos, adicionada do produto de efeito de cada variável pelo seu nível para o dado experimento. É preciso multiplicar os efeitos por $\frac{1}{2}$ porque eles se referem à variação por duas unidades da variável (-1 até +1) e não por unidade:

Resposta de um experimento = (média das respostas) + $\frac{1}{2}$ x [(efeito principal a x nível da variável a) + (efeito principal b x nível da variável b) + (efeito de interação x nível da variável a x nível da variável b)]

No nosso exemplo, a média das respostas dos quatro experimentos é $(148 + 590 + 0 + 254) / 4 = 248$. Assim, temos:

$$ABS(\times 1000) = 248 + \frac{1}{2} \times (242 \times YEA - 348 \times SORO - 94 \times YEA \times SORO)$$

Ou

$$ABS(\times 1000) = 248 + 121 \times YEA - 174 \times SORO - 47 \times YEA \times SORO$$

Se substituirmos qualquer dos pontos na expressão, resultados mostrados na Tabela 2.6.

Tabela 2.6 - Resultados do modelo (usando os efeitos calculados) em comparação com os resultados reais

Exp.	YEA	soro	Resposta calculada	Resposta medida (abs. ×1000)
1	+	+	$248 + \frac{1}{2} \times [242 \times 1 - 348 \times 1 - 94 \times 1 \times 1] = 148$	148
2	+	-	$248 + \frac{1}{2} \times [242 \times 1 - 348 \times (-1) - 94 \times 1 \times (-1)] = 590$	590
3	-	+	$248 + \frac{1}{2} \times [242 \times (-1) - 348 \times 1 - 94 \times (-1) \times 1] = 0$	0
4	-	-	$248 + \frac{1}{2} \times [242 \times (-1) - 348 \times (-1) - 94 \times (-1) \times (-1)] = 254$	254
5	0	0	$248 + \frac{1}{2} \times [242 \times 0 - 348 \times 0 - 94 \times 0 \times 0] = 248$	331

Esse modelo pode ser extrapolado (ou pesquisado para determinar os valores das variáveis que maximizam a produção de biomassa). No entanto, fica claro na Tabela 2.6 que os resultados previstos pelo modelo são iguais aos resultados reais. Será o nosso modelo tão bom que prevê perfeitamente o comportamento do sistema?

Não, e isso se pode indicar pelo valor previsto no experimento 5 (248) comparado com o real (331). O que ocorreu é que o plano com apenas quatro experimentos é saturado, isto é, não há informação extra para determinar os desvios devidos ao erro experimental. Daí a necessidade de usar repetições de experimentos: se calcularmos os efeitos a partir de valores médios de duplicatas de experimentos, o modelo (que, de qualquer forma, ainda se ajustará perfeitamente às quatro médias) refletirá melhor o comportamento do sistema porque dependerá menos de resultados isolados.

Se utilizarmos os pontos centrais para o cálculo da média, o modelo também melhora, pois reflete uma média de uma amostra mais representativa de experimentos. Mais importante ainda, um ponto central traz informação nova ao sistema, mas não traz novas variáveis. Assim, é possível testar a validade do modelo (e, se esse não for válido, esboçar um modelo mais complexo). É o que fazemos ao determinar os parâmetros mais adequados (usando o método dos mínimos quadrados) para o modelo anteriormente sugerido:

$$ABS = b_0 + b_1 YEA + b_2 SORO + b_3 YEA \times SORO$$

Usando os dados dos cinco experimentos, obtemos o seguinte resultado:

$$ABS(\times 1000) = 264,6 + 121 \times YEA - 174 \times SORO - 47 \times YEA \times SORO$$

com as YEA e SORO variando de -1 a +1. Usando os valores reais de porcentagem, o modelo é:

$$ABS(\times 1000) = 581,0 + 377,2 \times YEA - 5,64 \times SORO - 2,79 \times YEA \times SORO$$

Esse resultado mostra os mesmos parâmetros b_1 - b_3 do modelo que usa apenas os 4 pontos, mas com o parâmetro independente b_0 diferente – é uma curva com a mesma forma, porém transladada para satisfazer o valor do ponto central. Foi testado, também usando o método dos mínimos quadrados, um modelo quadrático cujo resultado (usando os valores reais de porcentagens) é:

$$ABS(\times 1000) = 487,8 + 106,5 \times YEA^2 - 0,050 \times SORO^2 - 0,182 \times YEA \times SORO$$

A comparação entre os modelos mostra pouca diferença entre o modelo linear e o modelo quadrático; mais ainda, mostra-se que o modelo linear ajusta-se melhor aos resultados experimentais quando verificamos os valores das respostas dos modelos e a soma dos erros (Tabela 2.7).

Tabela 2.7 – Comparação dos modelos propostos para a resposta em função de YEA e SORO

YEA	SORO	Resposta real	Modelo sem ponto central	Modelo com ponto central	Modelo quadrático
1,5	100	148	148	164,6	200,3
1,5	55	590	590	606,6	561,3
0	100	0	0	16,6	-12,1
0	55	254	254	270,6	336,6
0,75	77,5	331	248	264,6	236,9
Somatório do quadrado dos desvios (em relação à resposta real) →			6889	5511,2	19382,9

Usando o modelo linear, podemos determinar o valor máximo da resposta em função de YEA e SORO (é um cálculo do máximo de uma função):

$$ABS(\times 1000) = 581,0 + 377,2 \times YEA - 5,64 \times SORO - 2,79 \times YEA \times SORO$$

A inspeção da equação indica que a função ABS é sempre crescente para valores crescentes de YEA e decrescentes de SORO. Logo, convém aumentar a quantidade de extrato de levedura e diminuir a concentração de soro ao mínimo, mas não se pode aumentar a concentração de extrato de levedura indefinidamente (como sugere a equação, se extrapolada para além dos limites do plano experimental) bem como não se deve reduzir tanto a concentração de soro a ponto de não haver mais lactose para o crescimento do microorganismo.

As informações obtidas permitem preparar um novo plano experimental. A forma de “avançar” no plano experimental pode ser determinada a partir do planejamento anterior. Nesse caso, diminuiremos a concentração de soro de leite, mas a concentração de extrato de levedura será aumentada. Os valores adotados para o novo plano – com as respectivas respostas – são apresentados na Tabela 2.8:

Tabela 2.8 - Variáveis e respectivas respostas para um novo plano experimental

Experimento	% YEA (g/ mL de meio)	% soro (mL/mL de meio)	YEA	soro	Resposta (abs. ×1000)
1	3	55	+	+	618
2	3	10	+	-	1220
3	1,5	55	-	+	575
4	1,5	10	-	-	973
5	2,25	22,5	0	0	1032

Para esse plano, o modelo quadrático é o que deu o menor erro – se bem que os outros modelos tenham mostrado ajuste apenas um pouco pior. Usando YEA e SORO em porcentagem, o modelo é:

$$\text{ABS}(\times 1000) = 964,2 + 37,86 \times \text{YEA}^2 - 0,095 \times \text{SORO}^2 - 2,34 \times \text{YEA} \times \text{SORO}$$

Nesse caso, o valor máximo da absorvância ocorre para YEA = 3,24% e a concentração de soro de leite = -40% - o que, evidentemente, não é possível (perceba-se que isso é uma extrapolação: acontece que o modelo é uma tentativa de representar o comportamento natural do sistema, e pode haver distorções para limites da faixa de concentração. Por outro lado, a bactéria em estudo efetivamente pode crescer usando quantidades massivas de extrato de levedura em detrimento do soro de leite).

Note-se que, com praticamente o mesmo número de experimentos que usamos no método “clássico”, conseguimos:

- uma produção de biomassa maior (a absorvância corrigida de 1,22 para concentrações de 3% de YEA e 10% de soro, contra 0,973 usando o “teste 1” e o “teste 2” - Tabela 2.2 e Tabela 2.3);
- mais informação sobre o sistema, já que os “pontos experimentais” usados foram mais esparsos no plano experimental.

Agora, pode-se fazer um novo plano – desta vez, pesquisando a região próxima à concentração de 3,24% de YEA e com concentrações pequenas de SORO. Esse seria o passo final do trabalho,

mas com o modelo obtido já é possível discutir meios alternativos. Por exemplo, no que tange ao preço do meio de cultivo, o soro de leite é muito mais barato que o extrato de levedura. Ora, uma expressão que seja o quociente da produção de biomassa pelo preço do meio poderia ser usada para calcular as concentrações do meio que, teoricamente, apresentaria a melhor relação custo / produção.

Variações desse método de planejamento experimental vêm tornando-se cada vez mais populares, em parte devido ao advento, nas últimas décadas, de microcomputadores de baixo custo e bom desempenho. Para uma introdução aos métodos de planejamento experimental, sugere-se a leitura do livro “Planejamento e Otimização de Experimentos”, de Benício de Barros Neto (1996). Para o cálculo de modelos simples, planilhas de cálculo como o Excel são adequadas; existem, no entanto, programas de computador específicos para estatística, como o Statgraph e o Statistica. A vantagem de se utilizar esses programas é que, mesmo com conhecimentos apenas básicos de estatística, é possível apreciar a significância dos resultados através dos níveis de confiabilidade calculados pelo programa.

Na prática, nem todos os parâmetros obtidos para os modelos são estatisticamente significantes. Assim, na seção “Resultados e Discussão”, em geral associa-se a cada parâmetro o nível de significância estatística – o “nível p”.

A significância estatística de um resultado é uma estimativa de até que ponto (no sentido de “representativo da população”) esse resultado é verdadeiro. Mais tecnicamente, o valor do nível p representa um indicador decrescente da confiabilidade de um resultado: quanto mais alto o nível p, menos pode-se confiar que a relação obtida entre variáveis na amostra é um indicador adequado da relação entre as amostras na população.

Especificamente, o nível p representa a **probabilidade de erro** envolvida na **aceitação do nosso resultado observado como válido**, isto é, representativo da população. Por exemplo, o nível p de 0,05 (i.e., 1/20) indica que há uma probabilidade de 5% de que a relação entre as variáveis na nossa amostra seja obra do acaso. Em outras palavras, assumindo que na população não havia relação entre as variáveis, e que repetíssemos experimentos idênticos ao nosso, um em seguida do outro, poderíamos esperar que em cada 20 réplicas, aproximadamente, haveria uma em que a relação entre as variáveis seria igual ou maior que a encontrada em nosso experimento.

Em muitas áreas de pesquisa, o nível p de 0,05 (5%) é usualmente tratado como um limite de nível de erro aceitável; resultados significativos ao nível p de 0,01 (1%) são considerados estatisticamente significativos, e níveis p de 0,005 ou 0,001 são considerados “altamente” significativos. Note-se, no entanto, que essas classificações não representam nada além de convenções arbitrárias que são informalmente baseadas em experiência de pesquisa. (STATSOFT, Inc., 1993)

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MICROORGANISMO

O microorganismo utilizado para os experimentos foi a bactéria *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* (abreviada como Llld) NRRL B-2356, doada pelo NRRL sob a forma de cultura liofilizada. Essa cepa é listada em outros bancos, de acordo com informações fornecidas pela ATCC e BCCM, como

- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lister 1873) Schleifer, Kraus, Dvorak, Kilpper-Bälzt, Collins and Fischer 1986 VL

Ainda segundo o BCCM, essa cepa corresponde às seguintes espécies, citadas na literatura:

- *Streptococcus lactis* (Lister 1873) Löhnis 1909 AL
- *Streptococcus lactis* subsp. *lactis* (Lister 1873) Löhnis 1909
- *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* Garvie and Farrow 1982 VP
- *Lactobacillus xylosus* Kitahara 1938 AL

A listagem com nomes diferentes deve-se à inclusão recente desses streptococos no gênero *Lactococcus* (Saloff-Coste, 1994; BERGEY'S, 1986). Segundo o que pode ser apurado pelas listagens da ATCC, BCCM, NRRL e CNRZ, a cepa NRRL B-2356 é armazenada em outras coleções sob os seguintes códigos: LMG 9441, ATCC 13657, NCFB 1007, Czulak DRC 1, CNRZ 124, CNRZ 483

O Llld é citado em diversas patentes, e a cepa utilizada no presente estudo foi especificamente citada em uma (US Pat 3 048 490) e foi depositada na ATCC e no BCCM pelo NCFB via Unilever. É listada como produtora de diacetil e foi a mais usada nos trabalhos consultados para a revisão bibliográfica, daí ter sido escolhida para o presente trabalho.

A cultura liofilizada foi reativada em meio estéril contendo 2% de lactose, 1% de bacto-peptona e 0,1% de extrato de levedura, e incubada por 24h em shaker a 30-31°C e 100 rpm. O meio cultivado foi mantido sob refrigeração a 4-7°C, com reservas congeladas a -10°C. O microorganismo foi repicado rotineiramente de 4 em 4 meses, exceto pela necessidade de se utilizar uma cultura “reserva” com 11 meses de idade – devido a perdas por problemas de energia - apesar do risco desta não ser idêntica à cultura original.

3.2 MEIOS DE CULTURA, ESTERILIZAÇÃO E CONDIÇÕES DE CULTIVO

3.2.1 Equipamentos

Para o cultivo dos microorganismos foram usados dois equipamentos: um fermentador Bioflo III (New Brunswick Scientific Co.), com volume total de 6L e volume utilizado de 4L de meio, com agitação de 200 rpm e aeração de 1 L/min, com temperatura controlada na faixa de 30°C; o outro equipamento é um agitador recíprocante (shaker) TE 093 (Marconi Ltda.), no qual foram colocados erlenmeyers de 250 e 500 mL, com volumes variáveis de meio de cultivo, dependendo da finalidade do experimento (manutenção da cepa, testes de aeração, tolerância a metais, etc.), com temperatura controlada em 30-31°C e agitação de 100 rpm.

3.2.2 Reagentes

Os reagentes usados na preparação dos meios de cultura, com as respectivas abreviaturas usadas no texto, foram: “LAC” - lactose P.A. (DIFCO), “YEA” - extrato de levedura (OXOYD), “PEP” - peptona bacteriológica (DIFCO), “TRYP” - triptona (hidrolisado de caseína, DIFCO) e “SORO” - soro de leite em pó (ELEGÊ Alimentos S.A.). Para análises foram usados diacetil e acetoina P.A. (Merck) e creatina P.A. (SIGMA). Outros reagentes necessários (ágar, sais minerais, etc., especificados na composição de cada meio) eram de procedências diversas (SIGMA, MERCK, VETEC, REAGEN, etc.), todos de grau P. A.

O soro de leite em pó foi dissolvido em água até a concentração aproximada de 12% em massa e ultrafiltrado em filtro 0.860.A.005 (Reginox Ltda.). O soro ultrafiltrado foi armazenado sob refrigeração a -10°C, e descongelado em geladeira (temperatura da ordem de 5°C) antes do uso. Apresentou teor de sólidos de 8,2% - analisado por gravimetria.

3.2.3 Esterilização

A esterilização dos meios foi feita através de autoclavagem a 121°C por 15 min. para todos os meios de cultura, exceto os que continham soro de leite - que foram pasteurizados por 30 min a 100°C, também em autoclave. A esterilização de soro de leite em temperaturas mais altas geralmente causa a precipitação de caseína (presente em pequena quantidade mesmo após a

ultrafiltração), que não pode ser eliminada esterilmente e, suspensa no meio, dificulta as leituras de absorbância.

3.2.4 Inóculos

As culturas usadas para inoculação foram preparadas em shaker ou em fermentador usando um meio com 2% de lactose, 1% de peptona bacteriológica e 0,1% de extrato de levedura. Foi usado o mesmo método de OH *et al.* (1995). Após 24 h de incubação a 30-31°C, as culturas foram congeladas e mantidas a -10°C, e descongeladas imediatamente antes da inoculação.

3.2.5 Cultivos em shaker

Para os ensaios preliminares e planos de otimização foram usados erlenmeyers de 250 mL contendo 60mL de meio de cultivo, exceto para os experimentos com variação de volume de meio. Esses meios foram preparados pesando-se massas adequadas de reagentes, de forma que a concentração final refletisse a massa de soluto em volume de solução. O pH final de cada meio ficou na faixa de 6,5 a 7,0, exceto para os experimentos com variação de pH inicial. Os meios foram inoculados com 2 mL (planos com soro) ou 5 mL de inóculo (planos com lactose), exceto para experimentos com variação da taxa de inoculação.

3.2.6 Cultivo em fermentador

Foram utilizados o meio MRS (Man *et al.*, 1960), o meio MRS modificado por Cachon e Diviès (1993) e meios contendo lactose, peptonas e extrato de levedura. As composições dos meios de cultivo em fermentador são listadas a seguir (Tabela 3.1). Para cada fermentação foram usados 4L de meio, inoculado com 50mL de inóculo (cerca de 1,2% mL/mL do volume final na fermentação).

Quando houve necessidade de controle ou ajuste do pH, este foi feito pela adição de NaOH 1M (Merck).

Tabela 3.1 – Composição de meios de cultura para fermentações em fermentador de 6L.

Componente	Meio MRS	Meio MRS modificado	Meio com soro de leite
Soro de leite reconstituído e ultrafiltrado (8,2%g/mL)	-	-	100 mL
Casitona	10 g	10 g	-
Extrato de carne	10 g	10 g	
Extrato de levedura	5 g	5 g	20 g
Glicose	20 g	-	
Lactose	-	50 g	
Tween 80	1 g	-	
K ₂ HPO ₄	2 g	2 g	
Na(acetato)	5 g	-	
(NH ₄) ₂ (citrato)	2 g	2 g	2g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g	0,2 g	
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,05 g	0,05 g	
Água destilada	1000 mL	1000 mL	900mL
pH final: ajustado para	6,2-6,5	5,5	6,2-6,5

3.3 AMOSTRAGEM E ANÁLISES

As análises realizadas para cada fermentação foram de biomassa, pH e quantidade de acetoína e diacetil. Nos experimentos em erlenmeyer foram retiradas 1 a 4 amostras de 2 mL, por pipetagem; nos experimentos em fermentador, foram retiradas amostras de 4 a 20 mL através da saída de amostragem. Os intervalos de amostragem foram aumentados ou diminuídos, de acordo com o aspecto da curva de variação de absorbância (que foi determinada ao longo da fermentação). Os intervalos foram de 20 a 30 min na fase lag e 30 a 60 min nas outras fases.

3.3.1 Determinação da concentração celular

A concentração celular foi acompanhada através de medição direta por gravimetria (massa seca) para os experimentos em shaker, e por medição indireta (absorbância a 550 e a 700nm) para os experimentos em fermentador.

3.3.2 Massa seca

Amostras de 50 mL do fermentado de cada experimento eram filtrados através de uma membrana de 0,45 μ m (Millipore) de massa seca conhecida; a membrana com as células retidas era posta a secar a 100-105°C por 12h e pesada novamente; a massa da membrana, subtraída da massa total dá a massa seca de células, donde foi possível calcular a concentração de biomassa (em massa seca) do fermentado. Para os experimentos em erlenmeyer, os filtrados foram guardados sob refrigeração para eventuais análises posteriores.

3.3.3 Medidas de absorvância

Foram feitas usando 2 a 4 mL de fermentado, sempre a 550 nm e em vários casos a 700 nm para efeitos de comparação, usando um espectrofotômetro (CELM E225D) com cubetas de vidro de 1 cm de diâmetro. Amostras com absorvâncias muito altas (acima de 0,800) foram diluídas 1:2 ou 1:3. Para algumas curvas de crescimento não se fez diluição, medindo absorvâncias da ordem de 1,5, com conseqüente aumento da incerteza na medição. Essas absorvâncias foram convertidas em massa seca de células por volume de solução através de equações obtidas por regressão polinomial dos pontos de uma curva de calibração.

A curva de calibração foi feita por diluições sucessivas de uma amostra do fim da fermentação, em água destilada e em meio estéril, para comparação, e se leu a absorvância a 550nm. Sabendo o valor da diluição, poderia se atribuir à absorvância de cada amostra a massa seca equivalente (por exemplo, se a amostra final continha 5 g/L de biomassa seca, uma amostra diluída 1:10 cuja absorvância seja 0,497 possui 0,5 g/L de biomassa seca, e uma amostra de fermentação de absorvância 0,5 deve ter aproximadamente 0,5g/L de sólidos). Nota-se que as curvas para diluição com água e com soro podem ser igualmente utilizadas para a determinação de uma expressão de concentração em função da absorvância (Figura 3.1). A expressão foi calculada, então, usando os dados das diluições com água.

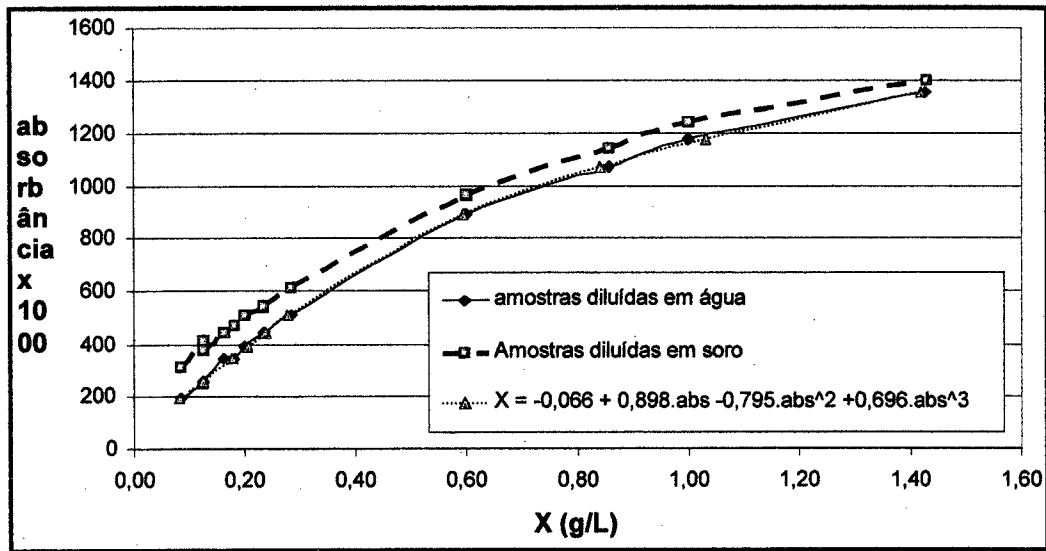


Figura 3.1 – Curva de calibração para a determinação da concentração de células secas (X) através da absorbância

A expressão que se ajusta adequadamente aos pontos experimentais, obtida por mínimos quadrados é $X = -0,066 + 0,898.\text{abs} - 0,795.(\text{abs})^2 + 0,696.(\text{abs})^3$

3.3.4 Determinações de pH

O pH dos meios de cultivo foi determinado usando um pHmetro (DMPH-2, Digimed) para medidas de maior precisão, e indicadores ácido-base do tipo strip-test (CARLO ERBA) para estimativas da acidez ou basicidade.

3.3.5 Concentração de diacetil e acetoína

Para a determinação da concentração de diacetil e acetoína, foi usado o método baseado na reação de Voges-Proskauer, como descrito em (OUGH e AMERINE, 1988) com pequenas modificações:

Soluções necessárias:

Solução de α -naftol: 5g de α -naftol em 100mL de isopropanol. A solução foi descolorizada pela adição de ca. 0,5g de carvão ativo, agitada por 30 minutos e filtrada em filtro de papel. A solução deve ser guardada ao abrigo do ar e da luz.

Solução de creatina - KOH: 0,5g de creatina e 40g de KOH em 100mL de solução aquosa;

Solução estoque de diacetil: 10mg/L de diacetil em água.

Solução estoque de acetoína: 200mg/L de diacetil em água.

Método de análise:

A um tubo de ensaio, adiciona-se 0,4mL da solução de α -naftol e 0,4mL da solução de KOH-creatina; a essas soluções, adiciona-se 2 mL da amostra de fermentação, agita-se e adiciona-se 50 μ L de n-hexano. Para amostras contendo soro de leite, centrifugar após adição dos reagentes por 1 min. a 1000 g. Ler a absorbância a 550 nm após 2 min. da adição dos reagentes e novamente após 1h da adição dos reagentes. É conveniente agitar gentilmente a amostra uma ou duas vezes durante esse intervalo de 1h. O valor lido a 2 min é tomado como a absorbância devida ao diacetil, e o valor lido a 1h é tomado como devido à acetoína. É necessário corrigir os valores de absorbância com um branco (o meio de cultura estéril, por exemplo).

A absorbância a 550 nm é convertida em acetoína e diacetil equivalente através de curvas de calibração obtidas da leitura, pelo mesmo método, da absorbância a 550 nm usando amostras diluídas das soluções estoque.

Para a acetoína, a reação é extremamente dependente do tempo (Figura 3.2), daí a necessidade de esperar algum tempo, tanto para a reação se completar quanto para a quantidade de produto se estabilizar.

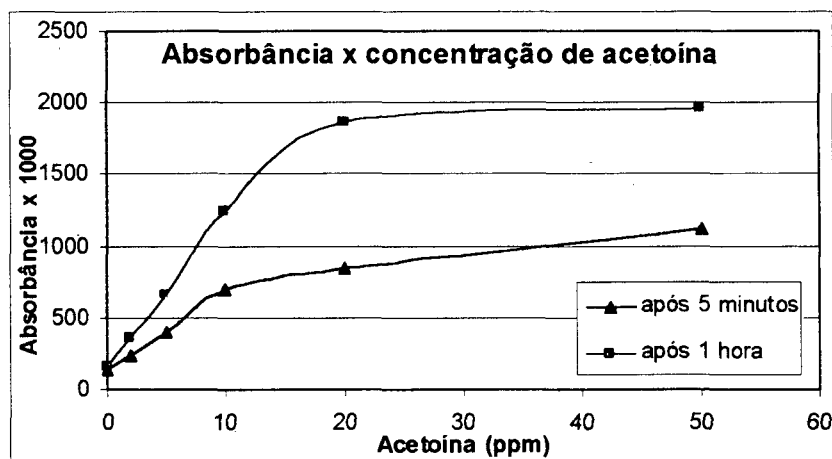


Figura 3.2 – Curva de calibração para determinação da concentração de acetoína através da absorbância. Note-se a diferença entre as leituras após 5min e após 1 hora.

Usando a faixa aproximadamente linear do gráfico, para leituras após 1 hora, a expressão que dá a concentração de acetoína em função da absorvância, a partir dos dados representados no gráfico, é: Acetoína (ppm) = 9,139*abs -1,2836, com R = 0,999. A expressão é válida até concentrações de cerca de 12 ppm de acetoína.

Para o diacetil a reação é bem mais rápida, de forma que a leitura é feita antes (e a estabilização da cor ocorre antes também). Para pequenas concentrações de diacetil, a absorvância da amostra varia linearmente com a variação de concentração (vide Figura 3.3)

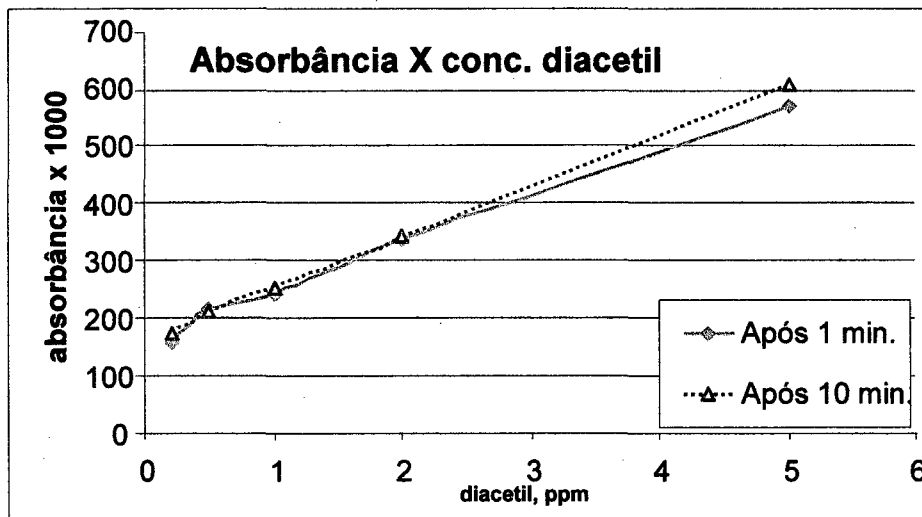


Figura 3.3 - Curva de calibração para determinação da concentração de diacetil através da absorvância.

A expressão que dá a concentração de diacetil em função da absorvância da amostra, a partir dos dados representados no gráfico, é Diacetil(ppm) = 12,01. Abs -1,9305, com R = 0,997.

3.4 MODELOS E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O cálculo dos efeitos e gráficos de superfície de resposta nos planos fatoriais foram feitos usando o módulo de planejamento experimental do programa Statistica (STATISTICA 4.0, Statsoft Inc.) As regressões múltiplas usadas para sugerir modelos representativos das curvas de crescimento e das produções de biomassa x composição do meio foram feitos pelo método dos mínimos quadrados, com o auxílio de equações matriciais como descrito em BARROS NETO *et al.* (1996) usando o programa Excel (MS-EXCEL 97, Microsoft Co.) Para uma visão geral dos métodos de planejamento aplicados neste estudo, ver última parte da revisão bibliográfica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta seção está dividida em 4 partes, seguindo de forma aproximada a abordagem que foi usada para a parte experimental do trabalho de dissertação. Foram feitos experimentos preliminares para avaliar a influência do pH inicial do meio, a aeração e a quantidade de inóculo sobre o crescimento do microorganismo, e ao mesmo tempo familiarizar-se com o aspecto da cultura, a velocidade de crescimento, etc.

Em seguida, foi feito um plano experimental evolucionário - misto de 2^3 com pontos suplementares, para LAC (lactose) + YEA (extrato de levedura) + PEP (peptona). O objetivo foi encontrar uma formulação que desse a produção máxima de biomassa, além de servir como um exercício de planejamento experimental e, com os pontos “suplementares” feitos, permitir a elaboração de um modelo global que fornecesse a provável produção de biomassa em função do meio de cultura.

A terceira parte trata de um plano experimental evolucionário 2^3 para SORO + YEA + PEP, feito para verificar qual a produção que poderia ser obtida, em biomassa, com o uso de soro de leite em lugar da lactose como principal substrato.

A quarta e última parte deste capítulo refere-se a experimentos feitos em fermentador, com o objetivo de comparar alguns meios de cultura com os da bibliografia em termos de produção de biomassa, bem como verificar se seria possível detectar algum diacetil e acetoína - e em que quantidade - por espectrofotometria.

4.1 RESULTADOS PRELIMINARES

Com o objetivo de verificar como a quantidade de inóculo, a velocidade de transferência de oxigênio e o pH inicial dos meios de cultivo poderiam alterar o crescimento do microorganismo, foram feitos 14 experimentos usando erlenmeyers em shaker. O meio de cultivo utilizado foi o mesmo para os 14 frascos: 0,67% de lactose, 0,63% de extrato de levedura e 4,33% de peptona. A temperatura foi sempre de 30 a 33°C, a 100 rpm e a duração dos experimentos foi de 19 horas. O que variou para cada experimento foi o volume de meio de cultivo, o volume de inóculo ou o pH inicial. Os experimentos são discutidos a seguir, agrupados de acordo com o parâmetro em estudo, por exemplo, com quantidade de inóculo variável e volume de meio e pH constantes.

4.1.1 Influência da quantidade de inóculo no crescimento do microorganismo

Dos 14 experimentos, 5 foram feitos com meios de cultivo e pH iguais, mas com volume de inóculo variável. As condições usadas nos experimentos e respectivas respostas, em absorbância do meio fermentado são apresentadas a seguir, na Tabela 4.1. Pode-se visualizar os mesmos resultados de forma gráfica, com a absorbância como função do volume de inóculo, na Figura 4.1.

Tabela 4.1 - Experimentos com diferentes volumes de inóculo, mantidas iguais as outras propriedades: composição e volume de meio de cultura, pH, temperatura e agitação.

Exp.	Volume de meio (mL)	Volume de inóculo (mL)	pH inicial	Absorbância (550nm)(dil. 1:10)	pH final
5	60	5	6,4	336	5,0
6	60	2	6,4	313	4,9
5	60	0,5	6,4	341	4,8
8	60	0,2	6,4	295	4,8
11	60	0,01	6,4	267	5,0

Considerando a absorbância diretamente proporcional ao crescimento celular, observa-se que, nas condições do experimento, para volumes de inóculo da ordem de 0,02% do volume total (0,01 mL de inóculo em 60 mL de meio) a produção de biomassa é menor que para volumes da ordem de 8% do volume total (5mL de inóculo em 60 mL de meio, a relação usada para a maioria dos experimentos em shaker no presente trabalho).

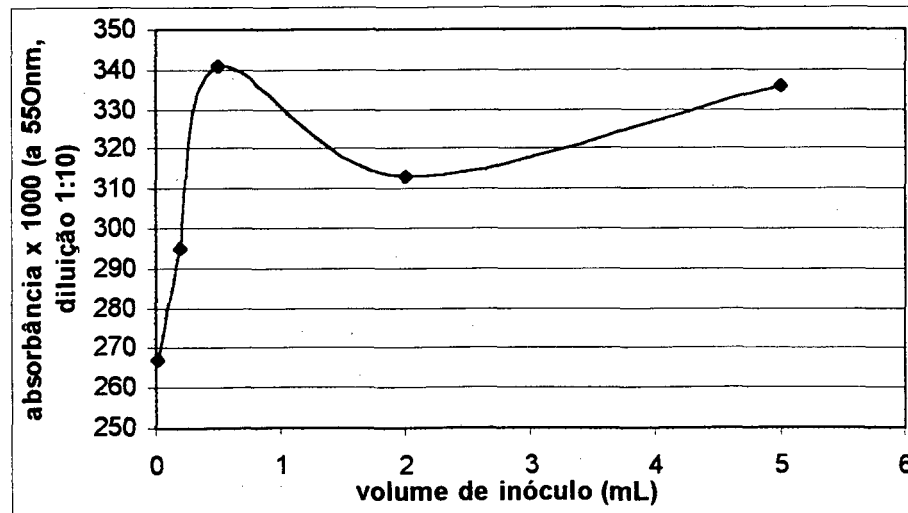


Figura 4.1 - Absorbância de meios de cultura inoculados com diferentes quantidades de inóculo, (mantidas iguais as outras propriedades: composição e volume de meio de cultura, pH, temperatura e agitação).

A análise da Figura 4.1 mostra que há uma tendência ao aumento da produção de biomassa com o aumento da quantidade de inóculo. Verifica-se, no entanto, que o crescimento não apresenta grandes variações a partir de um volume de inóculo de 0,8% do volume total (0,5mL de inóculo em 60mL de meio).

Há fatores que devem ser levados em conta para explicar a tendência de aumento da produção de biomassa com o aumento da quantidade de inóculo. Primeiro, o tempo de fermentação: espera-se que, para quantidades maiores de inóculo, a concentração máxima de células seja atingida mais rapidamente do que para taxas de inoculação menores – como se o meio com mais inóculo “saísse na frente”. Para tempos de fermentação suficientemente longos, em meios de cultura de mesma composição, a concentração final de células deve ser bastante próxima para qualquer quantidade de inóculo.

O segundo fator é a influência da quantidade de inóculo na própria composição do meio: o inóculo foi, nesse experimento, o produto da incubação de outro meio de cultura com as bactérias desejadas. Assim, o inóculo contém não apenas células desejáveis, mas também produtos de fermentação como o ácido láctico, o que poderia interferir no crescimento do microorganismo. No entanto, verifica-se (Figura 4.1) que para volumes de inóculo menores a

formação de biomassa também foi menor, portanto provavelmente a presença de metabólitos da cultura no inóculo não afeta negativamente a produção de biomassa.

4.1.2 Influência da velocidade de transferência de oxigênio no crescimento do microorganismo

Uma tentativa de controle da aeração foi feita usando-se erlenmeyers com diferentes volumes de meio de cultivo. Como a forma dos frascos causa a diminuição da superfície de contato com o ar quando o volume de líquido aumenta, e como a velocidade de transferência de oxigênio para o meio depende da área de contato, espera-se que a relação oxigênio:volume de meio diminua com o aumento de volume nos frascos. As condições e resultados dos experimentos são apresentadas na Tabela 4.2, e a relação entre a absorbância do meio fermentado e o volume total dentro dos frascos pode ser vista de forma gráfica na Figura 4.2.

Tabela 4.2 - Experimentos com diferentes taxas de aeração, mantidas iguais as outras propriedades: composição, volume de inóculo, pH, temperatura e agitação.

Exp.	Volume de Meio (mL)	Volume de inóculo (mL)	pH inicial	Absorbância (550nm)(dil. 1:10)	pH final
1	25	5	6,4	128	4,4
2	50	5	6,4	238	4,5
5	60	5	6,4	336	5,0
3	100	5	6,4	320	4,9
4	150	5	6,4	422	5,0

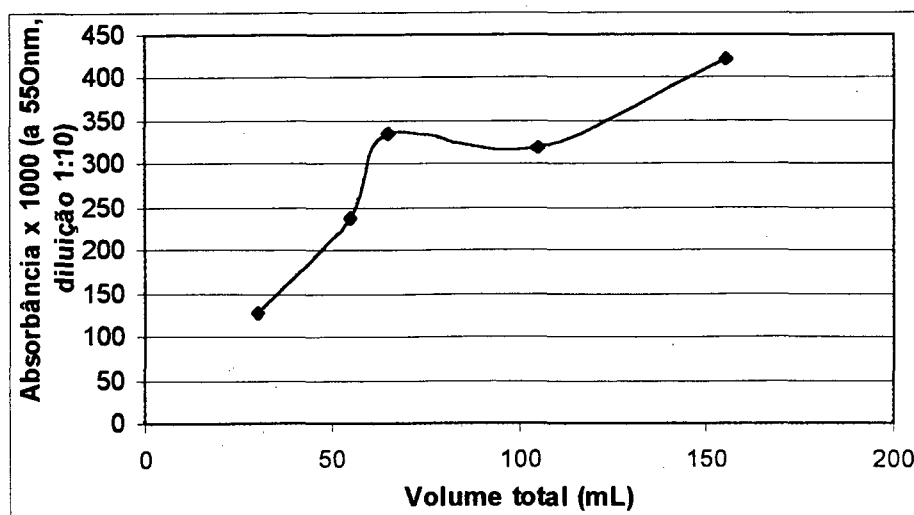


Figura 4.2 - Absorbância em função do volume de meio, para experimentos com diferentes volumes de meios de cultura de mesma composição com mesmo pH, temperatura, agitação e volume de inóculo.

Observe-se que todos os experimentos tiveram o mesmo volume de inóculo, sendo que deveria ter sido mantida a proporção de 5 mL de inóculo para 60mL de meio dos outros experimentos. Como, no entanto, a menor proporção de inóculo foi 5mL para 150 mL de meio, equivalente a 2 mL de inóculo para 60mL de meio, e já verificamos que quantidades de inóculo maiores que 0,5mL de inóculo para 60 mL de meio apresentam menor influência sobre a absorbância final, não ter mantido a proporção correta não deve ter alterado a tendência de variação do crescimento do microorganismo com a variação do volume de meio.

Voltando ao gráfico que relaciona a absorbância dos meios de cultura fermentados com o volume total nos frascos (Figura 4.2), nota-se que quanto maior o volume de líquido dentro dos erlenmeyers, tanto maior é o crescimento do microorganismo. Provavelmente isso se deve à velocidade de transferência de oxigênio para o meio de cultura: quanto maior a área superficial maior a transferência, e quanto menor o volume de meio menor o consumo de oxigênio pela cultura. Portanto, pode-se considerar erlenmeyers com **maior volume** de líquido como **menos aerados** que erlenmeyers do mesmo tamanho, à mesma temperatura e agitação, mas com menor volume de meio.

Dessa forma, pode-se dizer que há uma relação inversamente proporcional entre o crescimento celular e a taxa de aeração: quanto mais oxigênio, menos cresce o microorganismo. Isso não

significa necessariamente que o oxigênio seja diretamente prejudicial ao desenvolvimento (segundo Stanier *et al.*, 1987, a aeração tem pouco efeito sob o crescimento de bactérias lácticas) porque (observe-se na Tabela 4.2) existe uma relação diretamente proporcional entre o pH e o volume de meio. Admitindo que o pH seja inversamente proporcional à concentração de ácidos produzidos (quanto mais ácido, menor o pH) e que a aeração seja inversamente proporcional ao volume de meio, como já discutido, pode-se dizer que existe uma relação de proporção direta entre a aeração e a produção de ácidos: quanto mais ar, mais ácidos são produzidos - e talvez seja a acidez ou os ânions lactato ou acetato, e não o oxigênio, que inibem o crescimento.

4.1.3 Influência do pH inicial no crescimento do microorganismo

Analisando os experimentos apresentados na Tabela 4.3, nos quais variou-se apenas o pH inicial do meio, mantendo o volume de meio e de inóculo constantes, verifica-se de fato que há uma relação diretamente proporcional entre o pH e o crescimento celular, ou seja, uma relação inversa entre a acidez do meio e a produção de biomassa, dentro da faixa de acidez estudada. É possível que a acidez do sistema iniba o crescimento do microorganismo - o que está de acordo com os resultados obtidos por Kaneko *et al.* (1990). O pH foi alterado usando NaOH ou HCl, dependendo do caso.

Tabela 4.3 - Experimentos com diferentes pH's iniciais, mantidas iguais as outras propriedades: composição e volume do meio, volume de inóculo, temperatura e agitação.

Exp.	Volume de meio (mL)	Volume de inóculo (mL)	pH inicial	Absorbância (550nm)(dil. 1:10)	pH final
9	60	5	7,7	433	4,9
10	60	5	7,3	446	5,1
5	60	5	6,4	336	5,0
12	60	5	5,7	336	5,0
13	60	5	5,1	268	5,0
14	60	5	4,8	231	5,0

Os resultados de absorbância como função do pH inicial são mostrados de forma gráfica a seguir, onde fica clara uma tendência ao aumento da produção de biomassa com o aumento do pH inicial (Figura 4.3):

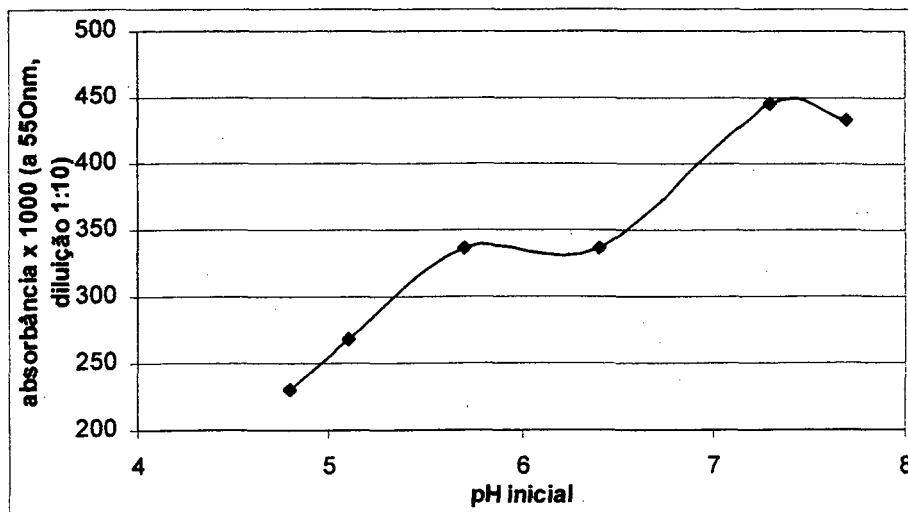


Figura 4.3 - Absorvância em função do pH inicial do meio, para experimentos com diferentes pH's iniciais e mesma composição e volume do meio, volume de inóculo, temperatura e agitação.

Para confirmar a influência negativa da acidez (quando a acidez aumenta, o pH diminui, e verifica-se pela Figura 4.3 que isso está aliado a uma menor produção de biomassa), foram realizados cinco experimentos com incubação por cerca de 13h. O meio utilizado nesses experimentos foi 10% mL/mL de soro reconstituído e ultrafiltrado, 2% de extrato de levedura e NaOH ou HCl, dependendo do caso, para o ajuste do pH. Os experimentos foram conduzidos a 30-31°C e agitação de 100 rpm, e o volume de inóculo foi novamente de 5 mL para frascos de 250mL com volume útil (meio de cultura) de 60mL.

Foram feitas retiradas periódicas de alíquotas de 5 mL de meio, e a absorvância foi medida – os resultados podem ser apreciados pelo gráfico de absorvância dos meios fermentados em função do tempo de fermentação (Figura 4.4), mostrando que em meios com menor acidez (maior pH) há maior produção de biomassa em função de uma maior velocidade de crescimento celular.

Avaliados preliminarmente alguns fatores que alteram o crescimento do microorganismo, o passo seguinte foi determinar uma formulação que desse maior produção de biomassa.

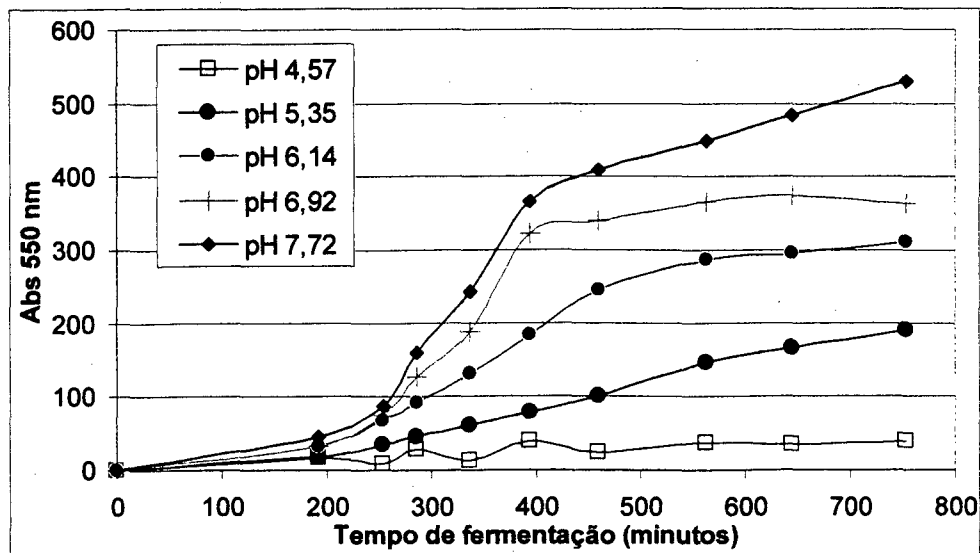


Figura 4.4 - Absorbância de amostras de cinco experimentos com diversos pH's iniciais em função do tempo, mantidas iguais as outras propriedades: composição e volume do meio, volume de inóculo, temperatura e agitação.

4.2 PLANOS DE EXPERIMENTOS PARA MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA USANDO LACTOSE, EXTRATO DE LEVEDURA E PEPTONA

Há várias vantagens em determinar uma formulação de meio de cultivo que seja específica para o microorganismo com que se trabalhou, o *Lactococcus lactis*. A otimização da formulação de um meio de cultivo para essa bactéria permitiria obter concentrações de biomassa maiores em fermentações, permitindo a preparação de inóculos ou de culturas "starter" com altas concentrações celulares. Além disso, o estudo da variação da produção de biomassa com a concentração de nutrientes nos meios de cultura testados daria informações sobre as necessidades nutricionais do microorganismo – dando idéia das exigências caso se procure substratos alternativos - bem como subsídios para o estabelecimento de um procedimento geral de otimização de meios de cultura para bactérias lácticas.

Os nutrientes utilizados para o plano foram lactose (LAC), extrato de levedura (YEA) e bacto-peptona (PEP). A lactose é um açúcar utilizável por bactérias lácticas, enquanto os outros dois nutrientes tem sido extensivamente usados em cultura de microorganismos. Algumas justificativas para o uso desses três nutrientes para o meio de cultura são:

- São nutrientes relativamente baratos, se comparados com aminoácidos e vitaminas requeridos pelas bactérias lácticas e que, se adicionados ao meio de cultura, o enriqueceriam sobremaneira.
- Apesar de o meio de cultura não ser quimicamente definido, a composição dos nutrientes complexos (bacto-peptona e extrato de levedura) para uso laboratorial é garantida dentro de uma faixa de especificação aceitável;
- A utilização de um meio quimicamente definido aumentaria a quantidade de variáveis independentes de tal forma que apenas planejamentos fatoriais fracionários (ou outras técnicas de planejamento) seriam aplicáveis, com grande incremento do número de experimentos.

4.2.1 Planejamento experimental evolucionário

Foram feitos 8 planos de experimentos com mesmas condições de cultivo (16h de fermentação, 5mL de inóculo, temperatura de 30 a 31°C, 100 rpm) mas composições de meio diferentes, de forma que cada um levasse em conta as tendências verificadas pela análise do plano anterior (o que se chama de um “planejamento evolucionário”). Os planos usados foram, na maioria, 2^3 com ponto central em duplicata – dando um total de $2^3 + 2 = 10$ experimentos diferentes - à exceção de experimentos com pontos complementares para o modelo global. Esses pontos complementares não seriam necessários seguindo apenas o planejamento evolucionário, mas serviram para aumentar o “espaço experimental” pesquisado, de forma a complementar o modelo posteriormente elaborado.

Os pontos feitos em duplicata deveriam dar uma idéia da repetibilidade dos experimentos. Alguns foram pontos centrais, outros pontos comuns a dois planos diferentes. Foram encontradas diferenças entre as duplicatas de 0,5 a 47%, com um valor médio de 17% de diferença.

Os planos são apresentados a seguir, com uma análise dos resultados encontrados. Para uma estimativa da “direção” a seguir no plano, foi feita a análise estatística de cada plano usando o programa Statistica 4.3, construindo modelos “lineares” (isto é, sem expoentes de grau superior a 1) com efeitos de segunda ordem (o produto entre duas variáveis, por exemplo PEP.YEA) da forma apresentada a seguir:

$$X = b_0 + b_1.LAC + b_2.YEA + b_3.PEP + b_4.LAC.YEA + b_5.LAC.PEP + b_6.PEP.YEA$$

Onde: X = concentração de biomassa seca [mg/L]
 $b_0 - b_6$ parâmetros do modelo, calculados através de mínimos quadrados;
 LAC = concentração de lactose [% (g/mL) ou codificada]
 YEA = concentração de extrato de levedura [% (g/mL) ou codificada]
 PEP = concentração de bacto-peptona [% (g/mL) ou codificada]

Note-se que as unidades para as variáveis dos modelos apresentados neste trabalho podem ser % (g/ml) ou codificadas, tendo neste caso sua variação limitada de -1 até +1, não importa para que variável. A vantagem de se usar variáveis codificadas é que pode-se fazer uma comparação direta entre as variáveis e seus efeitos (por exemplo nas tabelas que apresentam os efeitos e seus respectivos níveis de confiança, como a Tabela 4.5 e Tabela 4.7), sem que seja necessário se preocupar com a real magnitude dos valores da variável. Naturalmente, os valores dos parâmetros não são iguais para variáveis reais e codificadas.

Sabe-se que esses modelos lineares com efeitos de segunda ordem, fornecidos pelo programa, podem não ser os mais corretos, mas para um plano com 10 experimentos ($10 = 2^3 + 2$ duplicatas do ponto central), não se pode obter um modelo confiável com 3 variáveis independentes e mais complexo que o linear (“quadrático” com efeitos de segunda e terceira ordem, por exemplo). Isso ocorre porque modelos mais complexos possuem **muitos parâmetros** b_n , enquanto os 10 experimentos dão um **sistema de equações com informação insuficiente** para a resolução do modelo.

Análises estatísticas mostraram, no entanto, que para a maioria dos planos a aproximação linear com efeitos de segunda ordem é aceitável para o sistema em estudo. Isso possivelmente se deve ao fato de que, mesmo sendo necessário um modelo de ordem superior para representar adequadamente a variação real da produção de biomassa com a composição do meio, uma região mais limitada dos pontos experimentais pode apresentar uma variação suave da resposta em relação às variáveis.

O primeiro plano (Tabela 4.4) teve concentrações baseadas nos valores médios usados por diversos autores (Harvey e Collins, 1963; Kaneko *et al.*, 1987; Cachon e Diviès, 1993; Bassit *et al.*, 1993 entre outros). A maioria desses meios é uma modificação do meio MRS (Man *et al.*, 1960) ou é baseado em leite desnatado ou soro de leite.

Tabela 4.4 – Composição do meio de cultivo, níveis codificados correspondentes e resposta (produção de biomassa) para o Plano P1

Exp.	% LAC	% YEA	% PEP	níveis codificados			Biomassa (mg/L)
				LAC	YEA	PEP	
1	5	1	5	+	+	+	1128
2	5	1	1	+	+	-	788
3	5	0,1	5	+	-	+	812
4	5	0,1	1	+	-	-	456
5	1	1	5	-	+	+	940
6	1	1	1	-	+	-	722
7	1	0,1	5	-	-	+	584
8	1	0,1	1	-	-	-	352
9	3	0,55	3	0	0	0	814
10	3	0,55	3	0	0	0	791

Os meios com a composição mostrada na Tabela 4.4 foram inoculados com 5mL de inóculo e incubados por 16h a 30°C e 100 rpm, em agitador recíprocante. Os valores de biomassa foram obtidos como descrito em Materiais e Métodos. Os parâmetros otimizados do modelo, obtidos analisando as variáveis e as respectivas repostas (biomassa) são os seguintes (Tabela 4.5):

Tabela 4.5 – Parâmetros do modelo linear com efeitos de segunda ordem para o plano P1, para variáveis codificadas.

Parâmetro	efeitos	Valor do parâmetro	nível de confiança
b ₀	média	738,7	-
b ₁	LAC	73,25	0,003073
b ₂	YEA	171,75	0,000561
b ₃	PEP	143,25	0,000806
b ₄	LAC x YEA	-9,75	0,138844
b ₅	LAC x PEP	30,75	0,017069
b ₆	YEA x PEP	-3,75	0,454094

É importante lembrar que nem todos os parâmetros obtidos realmente influenciam a resposta. O nível de confiança (ou nível “p”), listado na Tabela 4.5, traduz a significância estatística de cada parâmetro. A significância estatística de um resultado é uma estimativa de até que ponto (no sentido de “representativo da população”) esse resultado é verdadeiro. Mais tecnicamente, o valor do nível p representa um indicador decrescente da confiabilidade de um resultado: quanto mais alto o nível p, menos pode-se confiar que a relação obtida entre variáveis da amostra é um

indicador adequado da relação entre as variáveis na população. O valor comumente considerado “bom” para p é de 0,05 ou menos. Para uma discussão mais detalhada sobre planejamento experimental, efeitos, significância, etc. veja a última parte da revisão bibliográfica.

Verifica-se que os três nutrientes, LAC, PEP e YEA tem influência sobre a produção de biomassa (os níveis de confiança menores que 0,05 – portanto mais significativos – estão em **negrito**). Dentro do intervalo do experimento, de 1 a 5%, a lactose tem um efeito positivo sobre o crescimento do microorganismo – o **sinal** do parâmetro é **positivo**. O mesmo se pode dizer do extrato de levedura entre 0,1 e 1% e da peptona entre 1 e 5%, ressaltando que estes dois últimos possuem **influência** ainda **maior**, pois a **magnitude** dos seus efeitos é **maior**. Os efeitos de interação LAC x YEA e YEA x PEP não apresentam influência significativa, tanto pelo seu valor mais modesto quanto pelo nível de confiança, bem acima de 5%. O efeito LAC x PEP não é de grande magnitude, mas mostra que há estimulação do crescimento quando as concentrações de LAC e PEP são simultaneamente aumentadas.

O plano seguinte (Tabela 4.6 - Composição do meio de cultivo, níveis codificados correspondentes e resposta (produção de biomassa) para o Plano P2) foi feito aumentando-se as concentrações de todos os nutrientes, usando como nível (-) o ponto central do plano P1 e fazendo uma duplicata do ponto 4. Como o incremento usado para cada variável foi 1 (codificado, ou seja: 2% para a lactose, 0,45% para o extrato de levedura e 2% para a peptona), segue que o ponto central do plano P2 é uma duplicata do ponto (+,+,+) do plano P1. Essa duplicata e outras feitas nos outros planos permitirão avaliar a magnitude do erro experimental envolvido em planos diferentes.

Tabela 4.6 - Composição do meio de cultivo, níveis codificados correspondentes e resposta (produção de biomassa) para o Plano P2

Exp.	%LAC	%YEA	%PEP	Níveis codificados			Biomassa (mg/L)
				LAC	YEA	PEP	
1	7	1,45	7	+	+	+	1512
2	7	1,45	3	+	+	-	1222
3	7	0,55	7	+	-	+	1392
4	7	0,55	3	+	-	-	996
5	3	1,45	7	-	+	+	1600
6	3	1,45	3	-	+	-	1206
7	3	0,55	7	-	-	+	1476
8	3	0,55	3	-	-	-	956
9	7	0,55	3	+	-	-	1012
10	5	1	5	0	0	0	1338

Calculando-se os efeitos de cada variável sobre a produção de biomassa, obtém-se os dados apresentados na Tabela 4.7. Observa-se que a lactose tem um efeito muito pequeno (e com um nível de confiança regular) sobre o crescimento do microorganismo, entre os níveis 3 e 7%, com as concentrações dos outros nutrientes entre os níveis da Tabela 4.6. Isso não significa que a lactose seja desnecessária, mas que a variação de sua concentração entre 3 e 7% não tem efeito sobre o crescimento - logo, seria prudente utilizar 3% de lactose, usando menos reagente para obter a mesma eficiência. Observa-se também que a suplementação do meio com mais extrato de levedura que no plano P1 estimula o crescimento, mas sobretudo que a adição de peptona aumenta grandemente a produção de biomassa. Ambos os efeitos, além de serem importantes, são estatisticamente representativos.

Tabela 4.7 - Parâmetros do modelo linear com efeitos de segunda ordem para o plano P2, para variáveis codificadas.

parâmetro	efeitos	Valor do parâmetro	nível de confiança
b_0	média	1271	-
b_1	LAC	-13,26	0,069168
b_2	YEA	88,76	0,001717
b_3	PEP	198,76	0,000343
b_4	LAC x YEA	-4,73	0,327459
b_5	LAC x PEP	-29,73	0,014998
b_6	YEA x PEP	-27,76	0,017142

Efeitos de interação negativos (LAC x PEP, YEA x PEP) são pequenos, mas mostram uma tendência que aparecerá também nos planos com maiores concentrações de extrato de levedura e de peptona. Possivelmente esse efeito negativo deve-se ao aumento da concentração de nutrientes e conseqüente aumento da pressão osmótica do meio, mas nos níveis desse experimento o efeito positivo da adição de LAC e PEP supera bastante o efeito negativo de interação.

O próximo plano, pelo que se pode deduzir da Tabela 4.7, deveria ter incrementados os níveis de peptona e de extrato de levedura, e mantido o nível de lactose. Como os pontos experimentais ficariam "ao lado e à frente" do plano P2 no espaço experimental (isto é, uma das arestas do cubo representado pelo plano P2 faria parte do próximo plano), bastaria fazer mais 6 experimentos, mais os pontos centrais, para obter dados para uma nova análise dos efeitos dos nutrientes. Ao invés de se fazer apenas 6 pontos novos ou algumas duplicatas, optou-se por fazer três planos em torno do plano P2 (exigindo apenas 10 novos pontos, mais pontos centrais), o que permitiu "varrer" uma extensa área do espaço experimental usando apenas um dia de fermentação. Dessa forma, o plano 3 foi dividido em três (Tabela 4.8): o plano P3-1, em que os níveis de LAC e PEP são os mesmos do plano P2, mas os níveis de extrato de levedura são incrementados em 0,9% (ou seja, 2 pelos valores codificados); o plano P3-2, em que o nível de LAC é o mesmo do plano P2, mas os níveis de YEA e PEP são aumentados em 0,9% e 4%, respectivamente (pelo planejamento evolucionário, esse devia ser o próximo plano); e o plano P3-3, em que os níveis de LAC e YEA são os mesmos do plano P2 mas os níveis de peptona são incrementados em 4%. A Tabela 4.8 mostra os planos com os pontos novos (o número corresponde ao experimento em shaker) e os pontos complementares copiados do plano P2.

Tabela 4.8 - Composição do meio de cultivo, níveis codificados correspondentes e resposta (produção de biomassa) para os Planos P3-1, P3-2 e P3-3

plano	experimento	%LAC	%YEA	%PEP	níveis codificados (para cada plano)			biomassa (mg/L)
					LAC	YEA	PEP	
plano P3-1	4	7	2,35	7	1	1	1	1574
	2	7	2,35	3	1	1	-1	1336
	p2 ponto 1	7	1,45	7	1	-1	1	1512
	p2 ponto 2	7	1,45	3	1	-1	-1	1222
	3	3	2,35	7	-1	1	1	1844
	1	3	2,35	3	-1	1	-1	1288
	p2 ponto 5	3	1,45	7	-1	-1	1	1600
	p2 ponto 6	3	1,45	3	-1	-1	-1	1206
	11	5	1,9	5	0	0	0	1611
plano P3-2	6	7	2,35	11	1	1	1	1212
	4	7	2,35	7	1	1	-1	1574
	8	7	1,45	11	1	-1	1	1396
	p2 ponto 1	7	1,45	7	1	-1	-1	1512
	5	3	2,35	11	-1	1	1	1932
	3	3	2,35	7	-1	1	-1	1844
	7	3	1,45	11	-1	-1	1	2010
	p2 ponto 5	3	1,45	7	-1	-1	-1	1600
	12	5	1,9	9	0	0	0	1728
	13	5	1,9	9	0	0	0	1698
plano P3-3	8	7	1,45	11	1	1	1	1396
	p2 ponto 1	7	1,45	7	1	1	-1	1512
	10	7	0,55	11	1	-1	1	1416
	p2 ponto 3	7	0,55	7	1	-1	-1	1392
	7	3	1,45	11	-1	1	1	2010
	p2 ponto 5	3	1,45	7	-1	1	-1	1600
	9	3	0,55	11	-1	-1	1	1748
	p2 ponto 7	3	0,55	7	-1	-1	-1	1476
	14	5	1	9	0	0	0	1548

Analisando os resultados de cada um dos planos, obtêm-se os parâmetros apresentados nas tabelas e discutidos a seguir.

Começando pelo plano P3-1, observa-se pelos resultados da Tabela 4.9, que mostra os parâmetros obtidos para cada que o modelo aplicado não representa bem o comportamento do sistema nesse plano: a influência da lactose é, como no plano P2, pequena e negativa - mas desta vez a incerteza do parâmetro é bem maior. O extrato de levedura mostra também influência

positiva, menos importante do que no plano P2 e com nível de incerteza moderado; a peptona mostra, novamente, um grande efeito sobre a produção de biomassa e apresenta o menor nível de incerteza (cerca de 9%).

Tabela 4.9 - Parâmetros do modelo linear com efeitos de segunda ordem para o plano P3-1, para variáveis codificadas.

Parâmetro	efeitos	Valor do parâmetro	nível de confiança
b ₀	média	1466	-
b ₁	LAC	-36,75	0,400561
b ₂	YEA	62,75	0,256536
b ₃	PEP	184,75	0,091540
b ₄	LAC x YEA	-18,75	0,610800
b ₅	LAC x PEP	-52,75	0,298777
b ₆	YEA x PEP	13,75	0,697733

O único efeito de interação que merece alguma atenção, apesar do grau de incerteza alto, é o LAC x PEP. Esse efeito é negativo e mostra, novamente, uma depleção do crescimento da bactéria em concentrações simultaneamente altas de nutrientes. É interessante notar que os baixos níveis de confiança obtidos poderiam ser evitados pelo uso de duplicatas ou triplicatas do ponto central: os valores dos efeitos não mudariam muito, mas o nível de confiança dos efeitos reais seria menor. Isso se pode observar pelos resultados do plano P3-2, que apresenta dois pontos de duplicata.

Tabela 4.10 - Resultados do plano P3-2, para variáveis codificadas.

Parâmetro	efeitos	Valor do parâmetro	nível de confiança
b ₀	média	1651	-
b ₁	LAC	-211,5	0,001634
b ₂	YEA	5,5	0,586302
b ₃	PEP	2,5	0,797722
b ₄	LAC x YEA	-36	0,052139
b ₅	LAC x PEP	-122	0,004885
b ₆	YEA x PEP	-71	0,014222

No plano P3-2 (Tabela 4.10) observa-se três coisas importantes: em primeiro lugar, o efeito de YEA e PEP é muito pequeno, o que indica que entre os níveis desse plano não há vantagem em aumentar a quantidade de peptona ou de extrato de levedura. Como a produção média de biomassa foi mais alta que a dos outros planos, esse efeito pequeno não significa que PEP e YEA

não estimulem o crescimento, mas mostra que pode haver um valor de "saturação" para as concentrações desses nutrientes. Em segundo lugar, observa-se que há uma forte inibição do crescimento quando se aumenta a concentração de lactose, mostrando claramente que se deve escolher o nível mais baixo (ou pesquisar melhor a região do espaço experimental em que a concentração de lactose é menor) para a produção de microorganismos. Em terceiro lugar, os três efeitos de interação mostram que concentrações simultaneamente muito altas de nutrientes são prejudiciais ao crescimento bacteriano.

No plano P3-3 (Tabela 4.11) observa-se novamente o baixo nível de confiança para todos os efeitos, causado pela falta de duplicatas para uma estimativa do erro experimental. Se o único ponto central (e os outros experimentos) refletirem de forma confiável o comportamento típico do sistema, os efeitos abaixo listados podem ser levados em conta; caso contrário, não. Como não se sabe ainda a incerteza dessas medidas, analisa-se cada um dos efeitos comparando-os com o que já se sabe do comportamento do sistema.

Tabela 4.11 - Parâmetros do modelo linear com efeitos de segunda ordem para o plano P3-3, para variáveis codificadas.

parâmetro	Efeitos	Valor do parâmetro	nível de confiança
b_0	Média	1566	-
b_1	LAC	-139,75	0,155154
B_2	YEA	60,75	0,330780
B_3	PEP	73,75	0,280324
B_4	LAC x YEA	-35,75	0,490970
B_5	LAC x PEP	-96,75	0,219521
B_6	YEA x PEP	-0,25	0,995420

Observa-se, inspecionando os resultados da análise do plano P3-3, um comportamento quase previsível: uma menor produção moderada de biomassa, o que se pode explicar pelo menor nível médio de extrato de levedura, que nos outros planos estimulou o crescimento; o efeito negativo de concentrações altas de lactose, e o efeito positivo da adição de extrato de levedura e de peptona. Os efeitos de interação são agora bem menores, mas continuam indicando que pelo menos a concentração de lactose deve ser diminuída para se obter uma produção de biomassa provavelmente maior.

O plano seguinte deveria ficar "abaixo" do plano P3-2, de forma a avaliar as mesmas concentrações de extrato de levedura e de peptona para um nível mais baixo de lactose. De fato isso foi feito (são os planos P7-1 e P7-2), mas antes foi verificado o efeito de um abaixamento da concentração de lactose com **aumento** dos níveis de YEA e PEP. Esse é o plano P4, cujas concentrações e resultados são apresentados a seguir (Tabela 4.12):

Tabela 4.12 - Composição do meio de cultivo, níveis codificados correspondentes e resposta (produção de biomassa) para o Plano P4

Exp.	%LAC	%YEA	%PEP	níveis codificados			Biomassa (mg/L)
				LAC	YEA	PEP	
1	3	2,35	15	+	+	+	788
2	3	2,35	11	+	+	-	1316
3	3	1,9	15	+	-	+	1120
4	3	1,9	11	+	-	-	1440
5	1	2,35	15	-	+	+	1208
6	1	2,35	11	-	+	-	1382
7	1	1,9	15	-	-	+	1250
8	1	1,9	11	-	-	-	1358
9	2	2,13	13	0	0	0	862
10	2	2,13	13	0	0	0	872

A produção média de biomassa do plano P4 foi bem menor que a esperada, mesmo para um ponto em duplicata (o ponto P4(2) = 1316mg/L, que tem a mesma formulação do ponto P3(5) = 1932 mg/L) ou para um ponto médio (o ponto P4(4) = 1440 mg/L, entre os pontos P3(5) = 1932 mg/L e P3(7) = 2010mg/L). Há diversas possibilidades para a origem dessa diferença: por exemplo, um problema de controle de temperatura (cerca de 1,5°C acima do normal nos planos P4 e P5), ou um tempo de incubação menor que o normal, etc. No entanto, a maioria dos fatores que poderiam diminuir o crescimento do microorganismo atuam da mesma forma sobre todos os experimentos desse lote, de forma que existe uma boa chance de a análise dos efeitos ter sentido e a magnitude próximos do valor real. A análise do plano P4 (Tabela 4.13) mostra que é conveniente diminuir as concentrações de todos os nutrientes, especialmente da peptona; na verdade, nessa região o modelo linear com interações de segunda ordem representa muito bem o comportamento do sistema.

Tabela 4.13 - Parâmetros do modelo linear com efeitos de segunda ordem para o plano P4, para variáveis codificadas.

parâmetro	efeitos	Valor do parâmetro	nível de confiança
b_0	média	1160	0,005951
b_1	LAC	-66,75	0,034217
b_2	YEA	-59,25	0,042844
b_3	PEP	-141,25	0,007956
b_4	LAC x YEA	-54,75	0,049638
b_5	LAC x PEP	-70,75	0,030628
b_6	YEA x PEP	-34,25	0,114006

Como se pode notar pela análise da Tabela 4.12, o plano P4 cobriu uma região bastante restrita em comparação com os outros planos, já que a faixa de concentração de lactose foi de 1 a 3%, a de extrato de levedura de 1,9 a 2,35% e a de peptona - esta sim, mais larga - de 11 a 15%.

Uma concentração de 15% de peptona para um meio de cultura cuja produção de biomassa é da ordem de 2 g/L apresenta baixíssimo rendimento, quando se sabe que uma produção de 1,2 g/L pode ser obtida com 3% de peptona (ponto P2(2)). De fato, se for feita uma otimização de um meio de cultura levando em conta o custo do meio (por exemplo, usando como resposta a relação biomassa/custo) provavelmente os "efeitos" serão bem diferentes. Porém, para compreender melhor o comportamento do sistema, foi feito um novo plano (Tabela 4.14) com os mesmos níveis de lactose e peptona do plano 4, mas com uma faixa de concentração de extrato de levedura um pouco maior. Esse plano permitiu verificar se alguns dos resultados do plano 4 seriam replicáveis, bem como comparar os novos experimentos com dois pontos do plano 3.

Tabela 4.14 - Composição do meio de cultivo, níveis codificados correspondentes e resposta (produção de biomassa) para o Plano P5

Experimento	%LAC	%YEA	%PEP	níveis codificados			Biomassa (mg/L)
				LAC	YEA	PEP	
1	3	2,35	15	+	+	+	1276
2	3	2,35	11	+	+	-	1574
3	3	1,45	15	+	-	+	1134
4	3	1,45	11	+	-	-	1318
5	1	2,35	15	-	+	+	1526
6	1	2,35	11	-	+	-	1450
7	1	1,45	15	-	-	+	1358
8	1	1,45	11	-	-	-	1288
9	2	1,9	13	0	0	0	936
10	2	1,9	13	0	0	0	892

Os resultados da análise do plano 5 (Tabela 4.15) indicam que existe, no nível de 1,45 a 2,35% de YEA, um efeito positivo da adição de extrato de levedura, nessa região do espaço experimental. Esse efeito tem um nível de confiança alto e uma magnitude razoável, mostrando que um próximo plano pode ainda usar um nível médio de extrato de levedura mais alto.

Tabela 4.15 - Parâmetros do modelo linear com efeitos de segunda ordem para o plano P5, para variáveis codificadas.

Parâmetro	efeitos	Valor do parâmetro	nível de confiança
b ₀	média	1275	-
b ₁	LAC	-40	0,093247
b ₂	YEA	91	0,020258
b ₃	PEP	-42	0,085659
b ₄	LAC x YEA	8,5	0,584375
b ₅	LAC x PEP	-78,5	0,026944
b ₆	YEA x PEP	-13,5	0,412626

Os efeitos de LAC e PEP no plano 5 são um pouco menores que os de YEA e possuem nível de confiança mais baixo; ainda assim, percebe-se que pode ser vantajoso diminuir um pouco o nível médio de lactose e de peptona. Adicionalmente, o efeito de interação LAC x PEP, negativo e com grande nível de confiança mostra a mesma tendência: diminuir LAC e/ou PEP.

Para o plano seguinte, pesquisou-se a região ao lado do plano P3-2. Na verdade, tanto o plano P4 quanto o P5 indicam que não se deveria usar níveis altos de lactose e os níveis de peptona deveriam ser um pouco diminuídos - portanto, seria lógico fazer um plano experimental **abaixo** do plano P3-2. Esse plano foi feito (é o P7), mas antes verificou-se o efeito de uma concentração mais alta de YEA, com concentração alta de peptona e lactose. Além de dar mais pontos experimentais para a confecção de um modelo global do sistema, o plano P6 (Tabela 4.16) permitiu verificar se alguns dos pontos do plano P3 poderiam ser replicados (note-se que mesmo no plano 5 houve uma diferença de 20% para o ponto P5(1) em relação ao ponto P3(5) e de 45% entre os pontos P5(4) e P3(7). Como os planos 4 e 5 também mostraram desvios razoáveis (de 47, 23, 18 e 5%) para os 4 pontos que possuem em comum, o plano P6 pode pelo menos trazer um pouco mais de informação sobre o erro intrínseco do sistema.

Tabela 4.16 - Composição do meio de cultivo, níveis codificados e produção de biomassa para o Plano P6

Experimento	%LAC	%YEA	%PEP	níveis codificados			Biomassa (mg/L)
				LAC	YEA	PEP	
1	7	2,8	11	+	+	+	1450
2	7	2,8	7	+	+	-	1770
3	7	2,35	11	+	-	+	1544
4	7	2,35	7	+	-	-	1816
5	3	2,8	11	-	+	+	1978
6	3	2,8	7	-	+	-	2078
7	3	2,35	11	-	-	+	2042
8	3	2,35	7	-	-	-	2032
9	5	2,575	9	0	0	0	1522
10	5	2,575	9	0	0	0	1446

Tabela 4.17 - Parâmetros do modelo linear com efeitos de segunda ordem para o plano P6, para variáveis codificadas.

Parâmetro	efeitos	Valor do parâmetro	nível de confiança
b_0	média	1768	-
b_1	LAC	-193,75	0,005561
b_2	YEA	-19,75	0,306537
b_3	PEP	-85,25	0,027767
b_4	LAC x YEA	-15,25	0,403506
b_5	LAC x PEP	-62,75	0,049528
b_6	YEA x PEP	-19,75	0,306537

Pelos resultados da Tabela 4.16, verifica-se desvios médios de 22, 13, 5 e 9% dos 4 pontos em duplicata nos planos P3-2 e P6. Aparentemente, houve vantagem em aumentar o nível médio de YEA mantendo os outros na faixa do plano P3-2: pela análise dos resultados do plano P6 (Tabela 4.17), nota-se que o nível médio de biomassa produzida foi um pouco maior do que o do plano P3-2 (1768mg/L no plano P6 contra 1650mg/L no plano P3-2). Percebe-se também que as tendências de magnitude e probabilidade mais alta continuam apontando para uma diminuição de LAC e PEP, sobretudo de LAC. O efeito negativo de YEA, além de pequeno, é de baixo nível de confiança. Note-se que para os P6(6), P6(7) e P6(8) os valores de biomassa produzida foram muito próximos, o que pode indicar uma região de saturação em que não adianta variar muito a concentração dos nutrientes. Em outras palavras, os pontos P(6) a P(8) podem estar perto da região de produção máxima de biomassa.

O plano seguinte, cujas concentrações de nutrientes e produções de biomassa são apresentadas na Tabela 4.18, deveria ter diminuídos os níveis de lactose e peptona e mantido (dada a incerteza do efeito YEA) o extrato de levedura - portanto, uma região abaixo e ao lado dos planos P3-1 e P6. Como, no entanto, os planos P3-2, P4 e P5 "apontaram" para a região abaixo do plano P3-2, e como a produção obtida no plano P6 nos níveis (-) de lactose foi alta, decidiu-se pesquisar a região abaixo dos planos P3-2 e P6. Esse plano foi dividido em dois cubos, de forma que se pudesse detalhar a variação da produção de biomassa com as concentrações de nutrientes.

Tabela 4.18 - Composição do meio de cultivo, níveis codificados correspondentes e resposta (produção de biomassa) para os Planos P7-1 e P7-2

plano	Experimento	%LAC	%YEA	%PEP	níveis codificados (para cada plano)			biomassa (mg/L)
					LAC	YEA	PEP	
plano P7-1	1	3	2,8	11	+	+	+	1990
	2	3	2,8	7	+	+	-	1940
	3	3	2,35	11	+	-	+	1990
	4	3	2,35	7	+	-	-	1834
	5	1	2,8	11	-	+	+	1946
	6	1	2,8	7	-	+	-	1932
	7	1	2,35	11	-	-	+	1766
	8	1	2,35	7	-	-	-	1822
	9	2	2,67	9	0	0,42	0	2040
	10	2	2,575	9	0	0	0	1976
plano P7-2	p7-1 ponto 3	3	2,35	11	+	+	+	1990
	p7-1 ponto 4	3	2,35	7	+	+	-	1834
	11	3	1,45	11	+	-	+	1836
	12	3	1,45	7	+	-	-	1676
	p7-1 ponto 7	1	2,35	11	-	+	+	1766
	p7-1 ponto 8	1	2,35	7	-	+	-	1822
	13	1	1,45	11	-	-	+	1742
	14	1	1,45	7	-	-	-	1520
	15	2	1,9	9	0	0	0	1870

A simples inspeção dos resultados listados na Tabela 4.18 mostra que o valor médio dos resultados do plano P7-1 foi maior que os do plano P7-2; adicionalmente, mostra que no plano P7-1 os resultados são bastante próximos, indicando uma região de saturação em que os efeitos não devem ter grande magnitude. Fazendo a análise do plano, obtém-se os seguintes efeitos (Tabela 4.19):

Tabela 4.19 - Parâmetros do modelo linear com efeitos de segunda ordem para o plano P7-1, para variáveis codificadas.

Parâmetro	efeitos	Valor do parâmetro	nível de confiança
b_0	média	1911	-
b_1	LAC	36	0,349217
b_2	YEA	49,5	0,266249
b_3	PEP	20,5	0,522459
b_4	LAC x YEA	-23	0,485855
b_5	LAC x PEP	31	0,392916
b_6	YEA x PEP	-4,5	0,871554

Nota-se que, de fato, os efeitos são bem menores que os observados em outros planos. O efeito de maior magnitude e de menor incerteza é o de YEA, mostrando que pode ser ainda vantajoso aumentar a quantidade de extrato de levedura no meio. Como, no entanto, o nível de confiança de todos os efeitos está bem acima de 0,05 (5%, considerado uma faixa de corte comum para regressões e modelos), nenhum deles é muito confiável. Note-se que nesse caso o modelo linear usado não reflete bem o comportamento do sistema - um comportamento esperado quando se chega à região de máximo, em que o sistema normalmente é melhor representado por uma curva.

Os resultados do plano P7-2 (Tabela 4.20) mostram essencialmente os mesmos efeitos do plano P7-1, mas com maior magnitude. A incerteza dos efeitos também é grande, não porque os resultados difiram muito, mas justamente porque a diferença entre eles é provavelmente próxima do erro experimental do sistema. Já mostrou-se que as diferenças entre as duplicatas de todos os planos (P1 a P8) oscilaram entre 0,5 e 47%, com uma média de 17%, o que dá uma idéia do erro experimental envolvido. Ora, as respostas do plano P7-1 estão dentro de uma faixa de 14% de variação e as do plano P7-2 dentro de uma faixa de 27% - portanto, variações próximas do erro experimental global.

Tabela 4.20 - Parâmetros do modelo linear com efeitos de segunda ordem para o plano P7-2, para variáveis codificadas.

Parâmetro	efeitos	Valor do parâmetro	nível de confiança
b ₀	média	1784	-
b ₁	LAC	60,75	0,326818
b ₂	YEA	79,75	0,258243
b ₃	PEP	60,25	0,329074
b ₄	LAC x YEA	-1,75	0,967500
b ₅	LAC x PEP	18,75	0,681130
b ₆	YEA x PEP	-35,25	0,490840

De acordo com os resultados dos plano P7-1 e P7-2 é conveniente aumentar o nível de lactose - mas fazendo isso voltamos aos plano P3-2 e P6, em que o nível de açúcar deveria ser diminuído. Assim, é provável que a quantidade ideal de lactose esteja na região coberta por esses quatro planos. De acordo com o plano P7-2 o nível de peptona e de extrato de levedura pode ser ainda aumentado; para o extrato de levedura, isso equivale a seguir para o plano P4, cujos resultados apontaram "de volta" para o plano P7-2 (e abaixo): diminuir a quantidade de extrato de levedura, peptona e lactose provavelmente por causa de efeitos de interação. Ora, pode-se supor então que

os planos feitos, que apontam uns para os outros, encobrem a região de produção máxima de biomassa.

Para testar essa hipótese, realizou-se um novo plano - desta vez não para gerar uma superfície de resposta, mas para "cercar" a área de maior produção de biomassa e confirmar se na periferia dessa região a produção de biomassa era menor. Esse é o plano P8 (Tabela 4.21). Nesse plano, nota-se que as maiores produções de biomassa ocorrem com o nível médio de lactose (2%), mas também que a média para 1 e 2% é bastante próxima. Percebe-se claramente que, para o mesmo nível de LAC e PEP, um aumento da quantidade de YEA aumenta a produção até atingir eventualmente um máximo (isso ocorre para LAC = 1 e 3%) e diminuir depois; no entanto, quando a concentração de PEP é um pouco mais baixa (11%) a mesma concentração de YEA dá uma produção de biomassa mais alta do que para 13%. Esse efeito é mais importante para concentrações de 5% de lactose, o que pode indicar, novamente, que concentrações simultaneamente altas de nutrientes podem causar inibição do crescimento.

Tabela 4.21 - Composição do meio de cultivo, níveis codificados correspondentes e resposta (produção de biomassa) para o Plano P8

Exp.	%LAC	%YEA	%PEP	Biomassa (mg/L)	média (mg/L)
1	5	1,45	13	1808	1717
2	5	2,35	13	1852	
3	5	2,8	13	1884	
4	5	3,2	13	1106	
5	5	3,2	11	1934	
6	3	1,45	13	2100	2141
7	3	2,35	13	2062	
8	3	2,8	13	2044	
9	3	3,2	13	2248	
10	3	3,2	11	2250	
11	1	1,45	13	1892	2118
12	1	2,35	13	2044	
13	1	2,8	13	2234	
14	1	3,2	13	2182	
15	1	3,2	11	2238	

Note-se que os planos 4 e 5 mostraram uma produção mais baixa de biomassa para níveis próximos do plano P8 em YEA e PEP; no entanto, os pontos dos planos P6, P7-1 e P7-2 mostraram produção próxima de pontos similares de P8. Assim, parece razoável admitir que os

planos P4 e P5 sejam menos representativos do comportamento do sistema do que os outros planos.

Nesse ponto, admite-se que a região pesquisada pelos planos P1 - P8 cobre o espaço experimental em que a produção de biomassa é máxima, para meios de cultivo usando LAC, YEA e PEP, nas condições dos experimentos. Assim, pode-se usar o conjunto dos experimentos para verificar a influência dos nutrientes na produção final de biomassa, por exemplo através de gráficos.

A Figura 4.5 mostra de forma gráfica a influência de YEA, LAC e PEP na produção de biomassa. Como não seria possível a visualização da resposta com as três variáveis em um único gráfico, foram feitos três gráficos contendo agrupados os experimentos nos níveis de 1 a 2, 3% e 5 a 7% de lactose. Isso permitiu "eliminar" uma variável de forma que o gráfico pôde ser feito; verificou-se a variação da produção de biomassa com diferentes níveis de YEA e PEP através de curvas de nível. É importante notar que as curvas de nível foram calculadas por "cortes" em uma função matemática ajustada aos pontos (esse ajuste foi feito com o uso do programa Statistica, mas o programa não fornece a função correspondente ao gráfico), daí haver curvas para concentrações de biomassa da ordem de 2400mg/L - que, na verdade, são extrapolações do sistema. Portanto, deve-se considerar as variações fora da área de pontos experimentais com cuidado.

Tendo a região dos pontos experimentais em mente, pode-se analisar os gráficos e um dos primeiros fatos que se nota é que, pelos dados usados, a máxima produção ocorre com cerca de 12% de peptona e 2% de extrato de levedura quando a concentração de lactose é de 5 a 7% (Figura 4.5 c) mas essa produção não é o máximo possível para o sistema todo: para um nível mais baixo (3% de lactose, Figura 4.5 b) percebe-se que a produção máxima ocorre com níveis de peptona de 8 a 12% e níveis crescentes de extrato de levedura de 2,5 a 3%. Extrapolando esses resultados, pode ser que se consiga produções ainda maiores de biomassa, para LAC = 3% usando cerca de 8% de peptona e mais de 3% de extrato de levedura. As curvas de nível da Figura 4.5 b mostram que pode haver uma curva de nível fechada - no caso, um pico - para YEA acima de 3,5%. Os experimentos dos planos mostraram, no entanto, que se pode esperar uma diminuição da produção de biomassa com concentrações muito altas de nutrientes; assim, pode ser que experimentos adicionais com altas concentrações de extrato de levedura mostrassem

curvas de nível um pouco diferentes, talvez com uma área de máxima produção abaixo de 3,55% de YEA.

Na Figura 4.5 a, analise-se o gráfico com níveis de lactose de 1 a 2%. Os planos P1 a P7 feitos com níveis altos de lactose mostraram sempre que a maior produção deveria ser obtida com níveis mais baixos de lactose; isso fica mais uma vez claro quando se nota que nesse gráfico a região de produção máxima aparece com níveis de YEA e PEP menores que para 3% de lactose. Atendo-se à região em que há pontos experimentais, nota-se que a produção máxima ocorre para níveis de 7 a 11% de peptona e cerca de 2,7 a 3,3% de extrato de levedura.

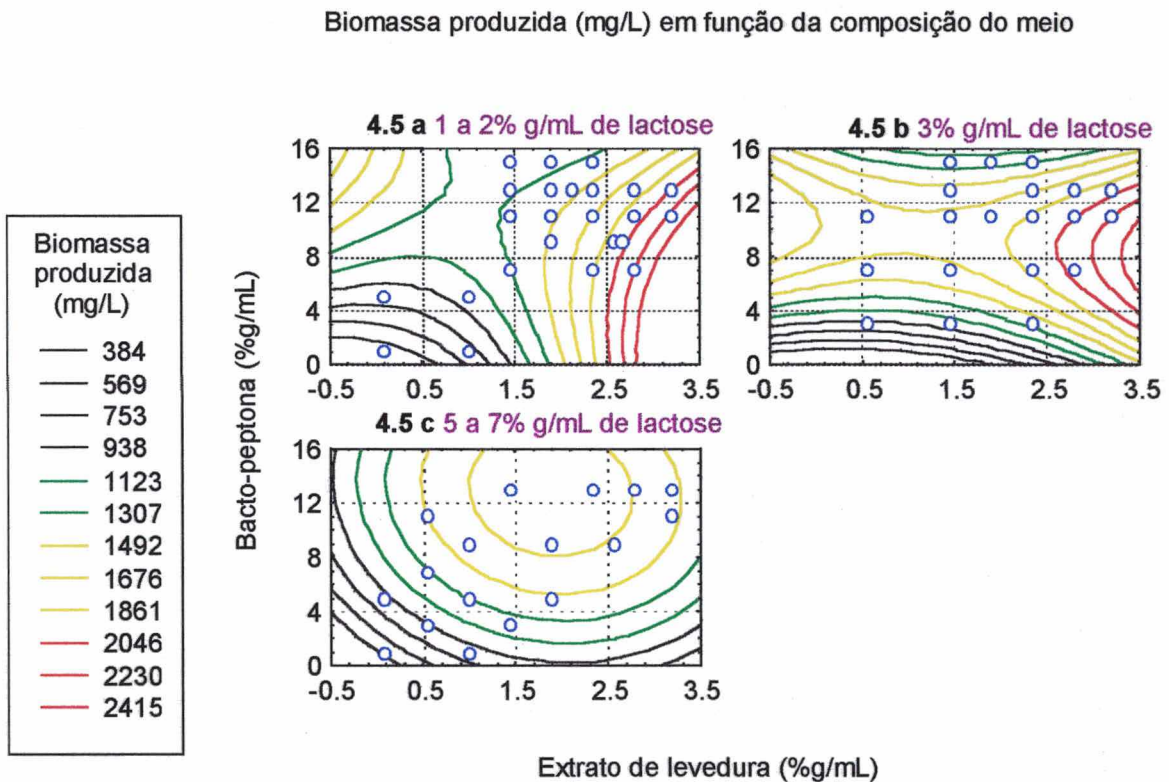


Figura 4.5 a, b, c – Produção de biomassa para concentrações de 1 a 2, 3 e 5 a 7% de LAC, e concentrações variáveis de YEA e PEP. Os pontos representam experimentos realizados.

A extrapolação dos pontos experimentais mostra que talvez se possa obter produções de biomassa comparáveis às obtidas usando os três nutrientes apenas com 1 a 2% de lactose e níveis altos de extrato de levedura; alguns pontos experimentais com 0 a 4% de peptona e 1,5 a 4% de YEA poderiam mostrar o comportamento do sistema nessa região.

4.2.2 Modelo global

Os planos experimentais foram feitos de forma evolucionária, mas não a melhor: se a idéia era encontrar a produção máxima com o mínimo de experimentos, dever-se-ia adotar o procedimento usado nos planos S1-S4 (mais à frente, no texto); se a idéia era pesquisar o comportamento do sistema em uma região extensa do espaço experimental, poderia ser feita a mesma quantidade de experimentos, mas com uma distribuição mais uniforme. Ainda assim, é importante lembrar que os planos P1-P8 chegaram a apontar "uns para os outros" em tendências de crescimento da produtividade com a variação da composição do meio; isto é, os planos parecem ter consistentemente "cercado" a região de máxima produção, ou pelo menos um máximo local. Disso conclui-se que há formas mais eficientes de maximizar a produção em relação ao meio de fermentação, mas isso não tira a validade dos resultados aqui obtidos.

Há 98 pontos experimentais dos planos P1 a P8, dos quais 26 são duplicatas de algum outro ponto. Agrupando todos os resultados e fazendo uma regressão múltipla (por mínimos quadrados), obtém-se diversos modelos que podem se adaptar melhor a uma ou outra região do espaço experimental. Foram experimentados modelos lineares com interações entre as variáveis independentes, modelos quadráticos, modelos cúbicos e modelos sem um ou outro parâmetro. Na Figura 4.6 a, tem-se o gráfico da resposta do modelo quadrático em relação à resposta real (a linha diagonal indica o conjunto dos pontos $x = y$, i.e., a região em que a resposta é igual ao modelo. Na Figura 4.7 a, um gráfico semelhante é apresentado para o modelo cúbico. Em ambos os casos o modelo não representa muito bem a realidade. Quando, no entanto, os mesmos parâmetros são calculados para o modelo quadrático e o cúbico sem os pontos dos planos P4 e P5 (Figuras 4.6 b e 4.7 b), o modelo é expressivamente melhor. Isso já era de se esperar por dois motivos: o primeiro é que, tendo de "satisfazer" um conjunto mais restrito de pontos, o modelo funciona melhor; além disso, os planos P4 e P5 mostraram grande diferença em comparação com os outros planos, e podem realmente ter tido um comportamento fora do esperado - o que justificaria sua retirada na montagem do modelo; a informação que esses planos não foram capazes de fornecer confiavelmente foi dada pelo plano 8.

a) usando todos os pontos dos planos P1 a P8

b) excluindo os planos P4 e P5

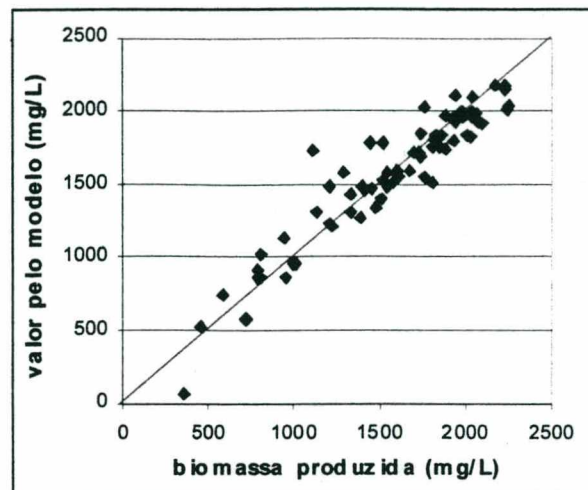
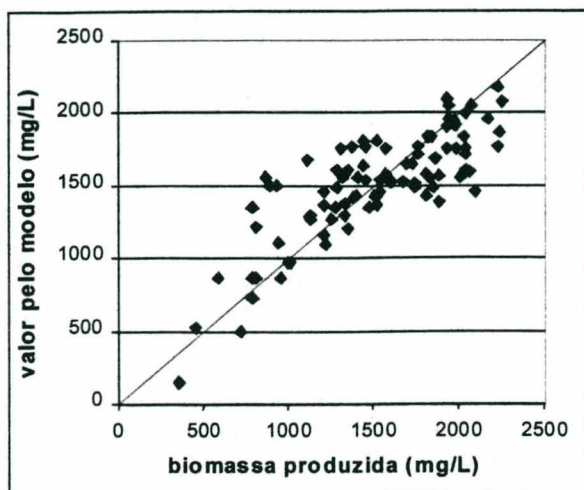


Figura 4.6 a, b - Ajuste do modelo quadrático aos resultados experimentais, com e sem a inclusão dos resultados dos planos P4 e P5

a) usando todos os pontos dos planos P1 a P8

b) excluindo os planos P4 e P5

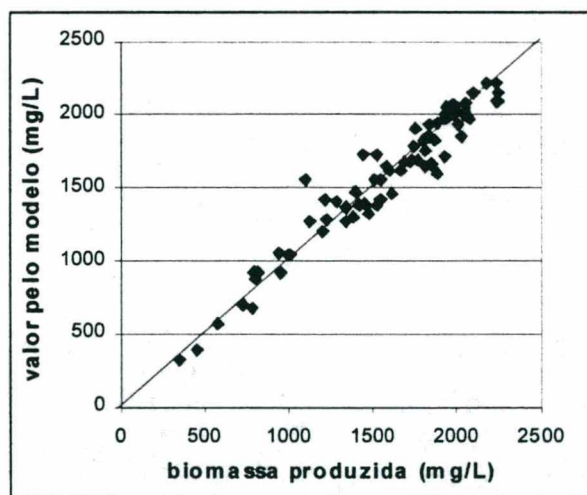
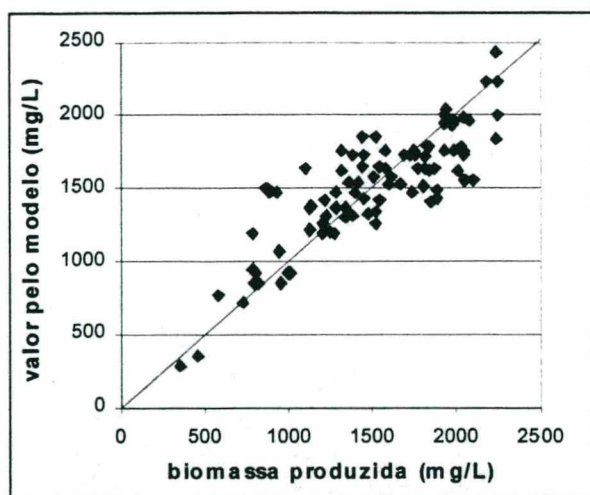


Figura 4.7 a, b - Ajuste do modelo cúbico aos resultados experimentais, com e sem a inclusão dos resultados dos planos P4 e P5

O modelo cúbico (o de melhor ajuste), sem os pontos dos planos P4 e P5 é:

$$\begin{aligned} \text{biomassa} = & -59,9 + 344,7.LAC + 575.YEA + 38,58.PEP - 59,3.LAC.YEA + 50,4.LAC.PEP \\ & + 63,4.YEA.PEP - 105,2.LAC^2 - 160,2.YEA^2 - 6,68.PEP^2 + 7,36.LAC^2.YEA \\ & 4,09.LAC^2.PEP - 12,95.YEA^2.LAC + 1,46.YEA^2.PEP - 1,86.PEP^2 - 6,18.PEP^2.YEA \\ & + 9,14.LAC^3 + 33,3.YEA^3 + 0,858.PEP^3 \end{aligned}$$

onde: biomassa é a concentração de células, em mg/L
 LAC é a porcentagem de lactose no meio, %g/mL
 YEA é a porcentagem de extrato de levedura no meio, %g/mL
 PEP é a porcentagem de peptona no meio, %g/mL

Conclui-se que, por esse modelo, a composição do meio que dá a maior produção de biomassa, dentro da região próxima aos pontos experimentais (a região em que se pode confiar mais no modelo) é LAC = 1,3%, YEA=3,6% e PEP = 8,3%, para uma produção de biomassa da ordem de 2513mg/L

4.2.3 PLANOS DE EXPERIMENTOS PARA MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA USANDO SORO DE LEITE, EXTRATO DE LEVEDURA E PEPTONA

Conhecido um pouco melhor o comportamento do microorganismo em meios de cultura de diversas composições, o passo seguinte foi usar soro de leite como um dos nutrientes para o meio, suprimindo a lactose pura. Ora, o soro de leite contém a lactose necessária à geração de energia pelo microorganismo, e adicionalmente possui diversos sais minerais, vitaminas e proteínas. Supõe-se que uma formulação que use soro de leite seja mais barata que uma que use lactose, porque o soro de leite é mais barato e também porque possui proteínas que, se aproveitadas parcialmente pelo microorganismo, podem permitir a diminuição da quantidade de peptona utilizada.

Para que se pudesse quantificar a concentração de biomassa no meio de cultura por espectrofotometria, usou-se soro de leite reconstituído e ultrafiltrado, com 8,2% de sólidos. Para chegar a uma formulação em que a produção de biomassa fosse grande, fez-se dois planos preliminares apenas com soro de leite e extrato de levedura, e mais dois planos fatoriais com soro (SORO), extrato de levedura (YEA) e triptona (TRYP) (hidrolisado de caseína). Esses experimentos são os planos S1-S4.

Nos planos S1 e S2 usou-se apenas soro de leite e extrato de levedura (Tabela 4.22). Os dois planos possuem, na verdade, formulações idênticas para experimentos de mesmo número, mas no plano S1 os meios de cultura foram esterilizados a 121°C por 15 min., enquanto no plano S2 os meios foram pasteurizados a 100°C por 30 min. Essa diferença na forma de esterilização do meio foi feita na tentativa de evitar a precipitação de proteínas nas formulações com maior teor de soro (que ocorreu em experimentos do plano S1 e em menor grau no plano S2). No experimento aqui descrito, não seria possível determinar a biomassa por filtração porque as proteínas precipitadas no meio seriam também retidas na filtração; assim, a estimativa da concentração de microorganismos nos fermentados foi feita por absorvância, "descontando" do fermentado a absorvância do meio estéril (como feito por Smid *et al.*, 1989). Experimentos anteriores mostram que há uma proporção direta (e linear para absorvâncias moderadas) entre a concentração de biomassa e a absorvância; Jensen e Hammer (1993) chegaram a analisar meios de cultura apenas com a absorvância do fermentado como resultado. Ainda assim, os presentes resultados devem ser vistos com cuidado e só servem como estimativas porque além da

contribuição inicial à absorbância pelas proteínas coaguladas no meio, pode ocorrer tanto a solubilização parcial dos precipitados (devido à liberação de proteases pela cultura) como a precipitação de outras proteínas pelo abaixamento do pH, decorrente da produção de ácido láctico - levando a resultados diferentes do valor real.

Tabela 4.22 - Composição do meio de cultivo e respostas (produção de biomassa) para o Planos S1 e S2

experimento	% SORO (V/V)	% YEA (g/mL)	1000 x Abs corrigida a 550nm	
			Plano S1	Plano S2
1	100	3	106	216
2	100	0	0	0
3	10	3	1238	1213
4	10	0	329	220
5	55	1,5	608	717
6	55	1,5	584	787
7	55	3	621	827
8	55	0	260	286
9	100	1,5	154	381
10	10	1,5	957	999
11	77,5	2,25	342	449
12	77,5	0,75	337	506
13	32,5	2,25	1106	1137
14	32,5	0,75	810	969
média →			532	622

Observa-se que a média dos valores obtidos no plano S1 é cerca de 20% menor que a do plano S2; talvez seja um efeito da maior disponibilidade de nutrientes devido a uma menor degradação pelo calor; talvez seja apenas influência de erros experimentais. As produções de biomassa, considerando-as proporcionais às absorbâncias finais dos fermentados, são maiores para altas concentrações de extrato de levedura e baixas concentrações de soro de leite. A escolha do nível mínimo de 10% mL/mL de soro diluído em água (o que dá $0,1 \times 8,2 = 0,82\%$ de sólidos) e máximo de 100% mL/mL foi arbitrária, esperando que cobrisse adequadamente a região de produção máxima; a escolha do nível mínimo de 0 (para verificar se haveria bom crescimento somente em soro de leite) e máximo de 3% de YEA foi feita com base nos planos P1-P7, que mostravam produções máximas de biomassa com concentrações de YEA da ordem de 3%. O gráfico da Figura 4.8 mostra as médias dos pontos experimentais de S1 e S2 (em azul) e as curvas de nível de biomassa como função das concentrações de YEA e SORO, para a expressão a seguir:

$$ABS = 351 + 615 \times YEA + 1,24 \times SORO - 97,5 \times YEA^2 - 2,98 \times YEA \times SORO - 0,047 \times SORO^2,$$

onde: ABS é a absorvância a 550 nm

YEA é a percentagem g/mL de extrato de levedura no meio

SORO é a percentagem mL/mL de soro a 8,2% g/mL no meio

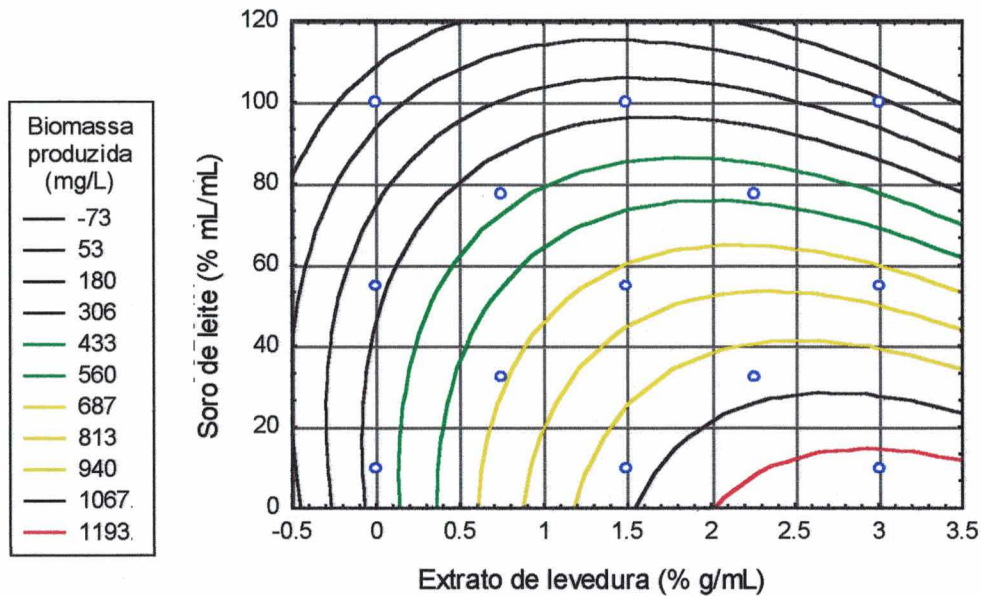


Figura 4.8 – Produção de biomassa como função da concentração de SORO e de YEA, com base nos planos S1 e S2. Os pontos representam experimentos realizados.

A expressão foi calculada através de mínimos quadrados; novamente é importante lembrar que dados extrapolados para fora da área de experimentos não são necessariamente confiáveis - isso fica bem claro para a região com 0% mL/mL de soro e "menos" de 0% de extrato de levedura, em que não só não há dados, como também não poderia haver produção de biomassa. Pesquisando a variação da função ABS com YEA e SORO dentro do domínio do experimento, o valor máximo ocorre para SORO = 10% mL/mL e YEA = 3%; extrapolando a função, o valor máximo de YEA é de 3,2%. Nessa região de produção máxima, pode-se observar pela Figura 4.8, não vale a pena aumentar muito a concentração de YEA porque o respectivo aumento de produção é pequeno, até que a produção começa a decrescer. Em outras palavras, para meios contendo apenas soro de leite e extrato de levedura, pode ser mais vantajoso trabalhar com cerca de 10% mL/mL de soro e 2% de YEA, obtendo cerca de 90% da máxima produção que o sistema pode dar, mas a um custo mais baixo.

Os resultados obtidos nos planos P1-P8 e nos planos S1 e S2 permitiram dar uma estimativa inicial mais consistente para um novo planejamento experimental, desta vez para maximizar a produção de biomassa com soro de leite em lugar da lactose, triptona em lugar de peptona e extrato de levedura. O plano S3 tem suas formulações de meios e resultados de produção listados a seguir (Tabela 4.23):

Tabela 4.23 - Composição do meio de cultivo, níveis codificados correspondentes e resposta (produção de biomassa) para o Plano S3

Exp.	%soro (V/V)	%YEA (g/mL)	%TRYP (g/mL)	nível (SORO)	nível (YEA)	Nível (TRYP)	Biomassa (mg/L)
1	50	3,25	12	+	+	+	3466
2	50	3,25	10	+	+	-	3372
3	50	2,35	12	+	-	+	3312
4	50	2,35	10	+	-	-	3218
5	10	3,25	12	-	+	+	2880
6	10	3,25	10	-	+	-	2932
7	10	2,35	12	-	-	+	2712
8	10	2,35	10	-	-	-	2732
9	30	3,025	11	0	0	0	3460
10	30	3,025	11	0	0	0	3390

Como se pode ver pela Tabela 4.23, houve produções de biomassa bastante grandes - expressivamente maiores que as obtidas nos planos P1-P8. Na preparação das formulações as concentrações de YEA nos pontos centrais foi de 2,85 %, de forma que a análise de superfície de resposta foi feita com o ponto central deslocado. Os parâmetros calculados para o plano S3 usando o modelo linear são apresentados na Tabela 4.24. Para os níveis de nutrientes usados nesse plano, fica claro que uma quantidade maior de soro tem um grande efeito sobre a produção de biomassa; a concentração de extrato de levedura também tem uma grande influência positiva, enquanto a variação da concentração de triptona não afeta significativamente a produção. Isso não significa que a triptona não seja importante, mas mostra que nos níveis de 10 a 12% ela pode ter atingido um patamar de saturação.

Tabela 4.24 – Parâmetros do modelo linear com efeitos de segunda ordem para o plano S3, para variáveis codificadas.

Parâmetro	Efeitos	Valor do parâmetro	nível de confiança
b ₀	Média	3147,2	-
b ₁	SORO	528,0	0,009645
b ₂	YEA	169,0	0,030113
b ₃	PEP	29,0	0,171357
b ₄	SORO x YEA	-15,0	0,311917
b ₅	SORO x PEP	65,0	0,077961
b ₆	YEA x PEP	-8,0	0,500000

Com o intuito de extrapolar o comportamento observado no sistema (ao invés apenas de aumentar a quantidade de lactose para o próximo plano) determinou-se um modelo quadrático incompleto – isto é, no qual alguns dos parâmetros de influência negligenciável foram desprezados.

Testando vários modelos por mínimos quadrados, e utilizando os pontos “centrais” do plano S3, obteve-se como um dos melhores modelos o seguinte:

$$\text{biomassa} = -13329 - 2007 \cdot \text{YEA}^2 + 11425 \cdot \text{YEA} + 13,2 \cdot \text{SORO} + 14,5 \cdot \text{TRYP}$$

onde: biomassa é a concentração de células, em mg/L

SORO é a porcentagem de soro reconstituído no meio, %mL/mL

YEA é a porcentagem de extrato de levedura no meio, %g/mL

TRYP é a porcentagem de triptona no meio, %g/mL

O máximo para esse modelo, aplicando concentrações de nutrientes dentro das faixas usados no plano S3, é 50% mL/mL de soro reconstituído, 2,85% de extrato de levedura e 12% de triptona.

Como o efeito da variação de triptona é pouco significativo nos níveis estudados, pode-se analisar a variação da biomassa produzida com a variação da concentração de soro e de extrato de levedura, de acordo com o modelo, e usando a concentração de triptona fixa em 11%. A produção de biomassa como função da concentração de SORO e YEA nessas condições é ilustrada de forma gráfica na Figura 4.9.

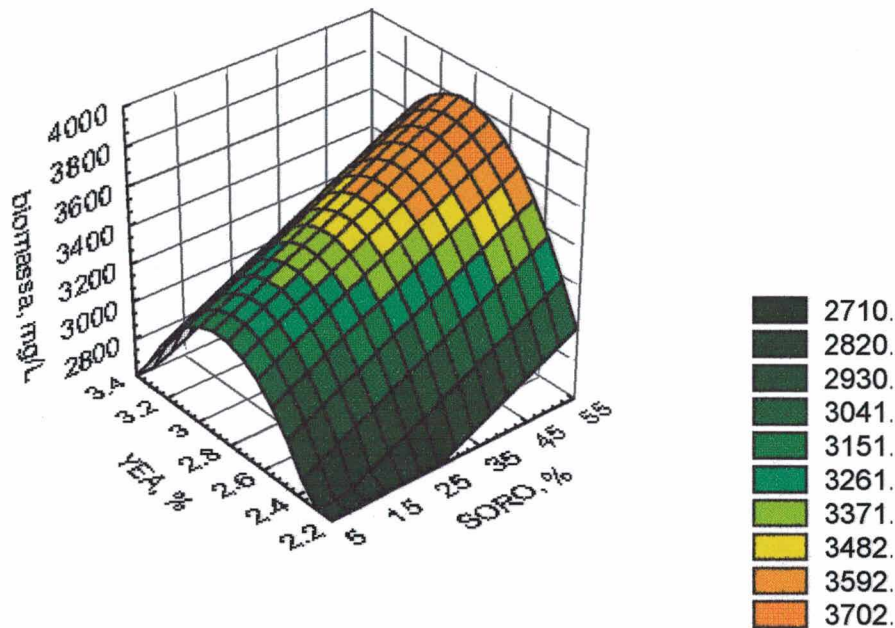


Figura 4.9 – Produção de biomassa (mg/L) como função de YEA (%) e SORO (% mL/mL), para concentração de triptona de 11%, de acordo com o modelo do plano S3

Observa-se que para qualquer valor da concentração de soro dentro dos intervalos estudados (aliás, pela análise da função, para qualquer valor numérico da variável SORO) a concentração de extrato de levedura que maximiza a produção de biomassa é 2,85%. Assim, um próximo plano deveria seguir essa “trajetória” de máxima produção, com YEA = 2,85%, TRYP = 11% e concentrações crescentes de soro de leite de forma a encontrar a região em que a produção de biomassa é máxima. A esse plano deu-se o nome de S4 (Tabela 4.25)

Tabela 4.25 - Plano S4 - Produção de biomassa para diferentes concentrações de soro de leite. Todos os experimentos tem YEA = 2,85% e PEP = 11%.

Experimento	Soro (% mL/mL)	Biomassa (mg/L)
1	10	2700
2	30	3302
3	50	3518
4	60	3150
5	70	3248
6	80	2990
7	90	3200
8	100	3620

O gráfico do plano S3 (Figura 4.9) indica que há um máximo na produção de biomassa próximo à região em que a concentração de soro é de 55% mL/mL, ou acima desse valor. De acordo com os valores da Tabela 4.25, para os primeiros pontos o comportamento do sistema é próximo do esperado – a quantidade de biomassa produzida aumenta com a quantidade de soro utilizado. Após a concentração de 55% mL/mL, há um decréscimo da produção para a faixa de 3200 a 3300 mg/L. O último experimento deu um resultado inesperadamente alto, como se pode observar pelo gráfico (Figura 4.10).

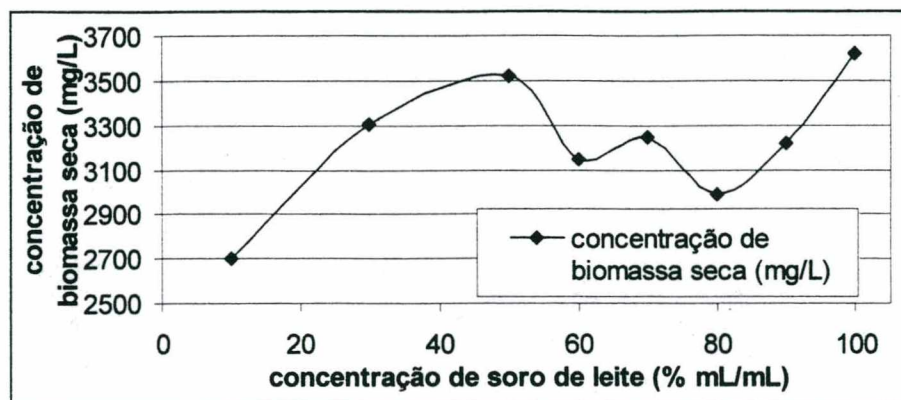


Figura 4.10 - Variação da biomassa seca produzida com a concentração de soro de leite no meio

As informações que podem ser aproveitadas desse gráfico mostram que a quantidade de biomassa produzida é de fato diretamente proporcional à concentração de soro de leite – até a faixa de 50% mL/mL de soro. Após esse valor, há o patamar dos experimentos 4-7 (que diferem entre si em no máximo 8%), que indica que a concentração de biomassa pode ser máxima para cerca de 50% mL/mL de soro de leite no meio, enquanto YEA = 2,85% e TRYYP = 11%. Esse parece ser o máximo do sistema.

Uma possível explicação para o alto resultado do plano 8, afora o erro experimental, é que a alta concentração de soro de leite pode ter causado uma maior precipitação de proteínas durante a fermentação, o que teria compensado a menor produção de biomassa. Se for esse o caso, todos os experimentos podem ter em maior ou menor grau a interferência de proteínas – de forma que algum outro método teria de ser usado se quiséssemos quantificar a biomassa produzida – talvez através de contagem de microorganismos na forma de UFC (unidades formadoras de colônia) em placas de Petri. De qualquer forma, o valor alto do experimento 8 não pode ser negligenciado, e

seria oportuno repetir esse e alguns dos outros pontos do gráfico, de forma a confirmar qual o comportamento real do sistema.

4.3 EXPERIMENTOS FEITOS EM FERMENTADOR – VERIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA, DIACETIL E ACETOÍNA

Nesta última parte do trabalho foram realizados experimentos em fermentador, com o objetivo de comparar a produção de biomassa com a referenciada em bibliografia, bem como verificar e comparar com a bibliografia qual a produção de acetoína e diacetil pelo microorganismo.

4.3.1 Experimentos realizados e resultados

Grande parte dos meios de cultura sintéticos citados por diversos autores que trabalharam com *Llhd* baseiam-se no meio MRS (Man *et al.*, 1960), desenvolvido para bactérias lácticas. Na presente etapa, são apresentados os resultados de cinco fermentações: primeiro, uma fermentação com meio MRS; depois, uma fermentação com o meio MRS adicionado de 2g/L de citrato de amônio – meio semelhante ao usado por Cachon e Diviès (1993₂); em seguida uma fermentação usando o soro de leite e extrato de levedura como substrato. O quarto e quinto experimentos são ainda fermentações usando soro de leite, mas com a adição de citrato de amônio.

Para acompanhar as fermentações, foram feitas estimativas da concentração do microorganismo e da concentração de diacetil e de acetoína. Essas estimativas foram feitas através da medição da absorbância de amostras retiradas ao longo da fermentação, e convertidas em valores de biomassa, diacetil ou acetoína com o auxílio de curvas de calibração.

As condições comuns a todos os experimentos foram o volume de meio de cultura utilizado (4L), o volume e a procedência do inóculo (50mL de uma cultura recente congelada, mantida em freezer), a temperatura do experimento (30°C), a agitação (200 rpm) e a aeração (1L/min). O pH foi monitorado em todos os experimentos, e controlado nos experimentos 1, 2 e 5 ao nível de pH = 5,5 para tentar garantir uma maior produção de diacetil (Cachon *et al.*, 1993). A Tabela 4.26 mostra de forma compacta as características de cada fermentação quanto ao pH e, ainda, a produção de biomassa em cada um dos experimentos.

Tabela 4.26 - Meios e condições de cultivo para os experimentos realizados em fermentador

Experimento	Meio de Cultura	pH inicial	pH controlado	pH final	Concentração final de biomassa seca (mg/L)
1	MRS	6,5	Ao atingir 5,5	5,5	2065
2	MRS modificado	5,5	Sempre em 5,5	5,5	2006
3	Soro sem citrato	7,0	Não	5,0	1902
4	Soro	6,0	Não	5,2	1894
5	Soro	7,0	Ao atingir 5,5	5,6	2047

4.3.2 Produção de biomassa nas fermentações

Pela análise dessa tabela, percebe-se que as produções de biomassa foram todas bastante próximas, mas que as produções com pH controlado a aproximadamente 5,5 foram maiores que as com pH variando livremente. Os resultados da determinação de massa seca ao longo das cinco fermentações são apresentados graficamente a seguir, de forma que se pode compará-los diretamente (Figura 4.11).

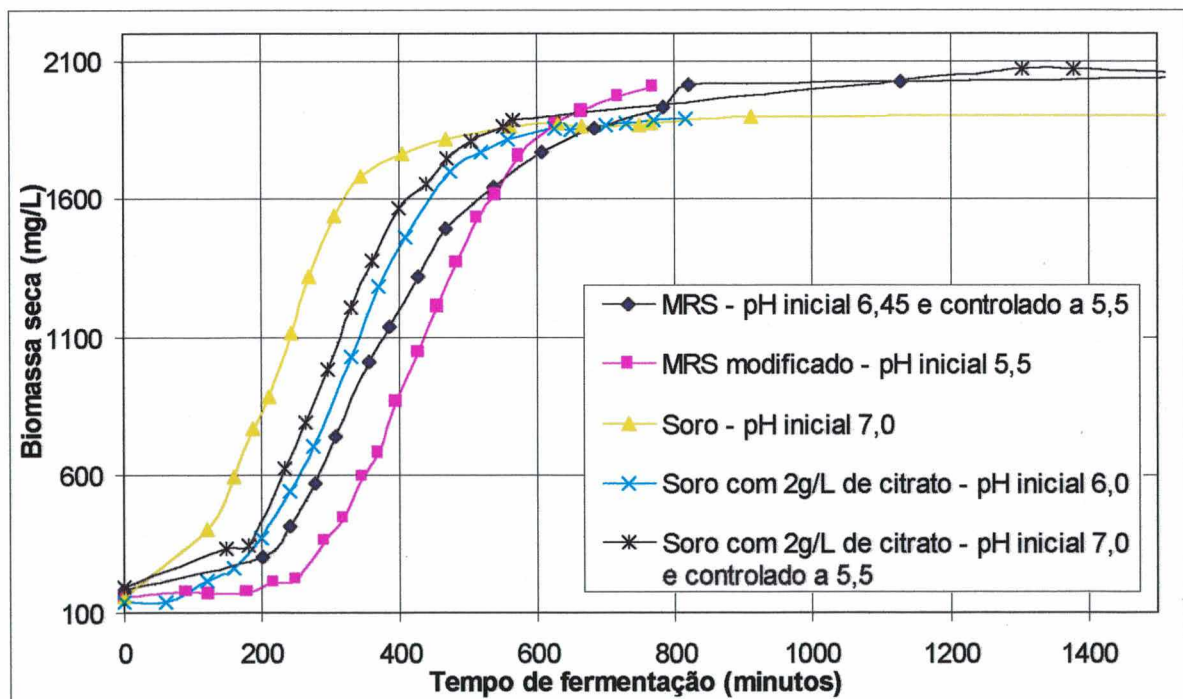


Figura 4.11 - Concentração de biomassa seca ao longo do tempo de fermentação, para os cinco experimentos realizados em fermentador. As condições comuns para os experimentos foram a agitação (200 rpm), volume total (4 L), temperatura (30°C), e inóculo (50mL da mesma cultura)

Pelo gráfico, é possível verificar que apesar de as concentrações finais de biomassa serem próximas, há diferenças no crescimento do microorganismo em meios de cultura diferentes.

4.3.3 Fermentações com meio MRS

Comparando as duas fermentações com meio MRS, fica claro que a concentração final é a mesma, mas o microorganismo adapta-se ao meio e cresce mais rapidamente quando o pH inicial é mais alto: na fermentação em que o pH começa em 6,45 o crescimento é mais rápido que na fermentação em que o pH mantém-se em 5,5. À medida em que o microorganismo cresce e aumenta a acidez do meio, diminuindo o pH, a velocidade de crescimento diminui. Em ambos os experimentos, o crescimento praticamente para com cerca de 2100 mg/L de biomassa. Isso se pode dever ao aumento da concentração de íons lactato em conjunto com a diminuição do substrato disponível. Experimentos citados em literatura, mas com temperatura de 26°C e concentração de lactose 150% maior (50g/L) (Cachon *et al.*, 1993) deram crescimentos semelhantes para o mesmo tempo de fermentação (até cerca de 13 horas = 780 minutos de fermentação), mas crescimentos muito maiores (de cerca de 4000mg/L) para tempos igualmente maiores (de 40 horas = 2400 minutos).

4.3.4 Fermentações com soro de leite

Comparando as fermentações com soro de leite, nota-se antes de tudo que em todos os casos a velocidade de crescimento inicial do microorganismo foi maior que para os meios MRS. Nota-se também que a produção de biomassa é comparável à obtida com os meios MRS, e que os experimentos sem controle de pH deram a mesma produção de biomassa, enquanto a fermentação com soro e pH controlado apresentou uma produção final igual às dos meios MRS. Finalmente, percebe-se novamente que o pH inicial mais alto favorece o crescimento do microorganismo, já que a formação de biomassa foi mais rápida para a fermentação com soro e pH inicial 7 (experimento 3) do que para a com pH 6 (experimento4) e 5,5. A fermentação 5 não apresentou a mesma velocidade de crescimento que a fermentação 3, mesmo tendo o mesmo pH inicial, possivelmente devido à presença de citrato no meio; ainda assim, o crescimento é mais rápido que para pH inicial 6,0 (experimento 4). Note-se que a concentração de açúcares no meio MRS é de 20g/L, contra um máximo de 8 g/L de lactose nos meios com soro de leite. Assim, a

conversão de substrato em biomassa e a produtividade foi maior para as fermentações com soro de leite, já que as concentrações finais de biomassa são praticamente equivalentes.

4.3.5 Produção de diacetil e acetoína

Foram feitas determinações de diacetil e acetoína (por espectrofotometria) para os cinco experimentos em fermentador. Para todos os casos houve detecção de apenas traços de diacetil; para a acetoína, apenas nas fermentações com soro foi possível detectar alguma produção. A variação da concentração de acetoína durante as fermentações é apresentada a seguir, de forma a permitir a comparação entre os vários experimentos (Figura 4.12)

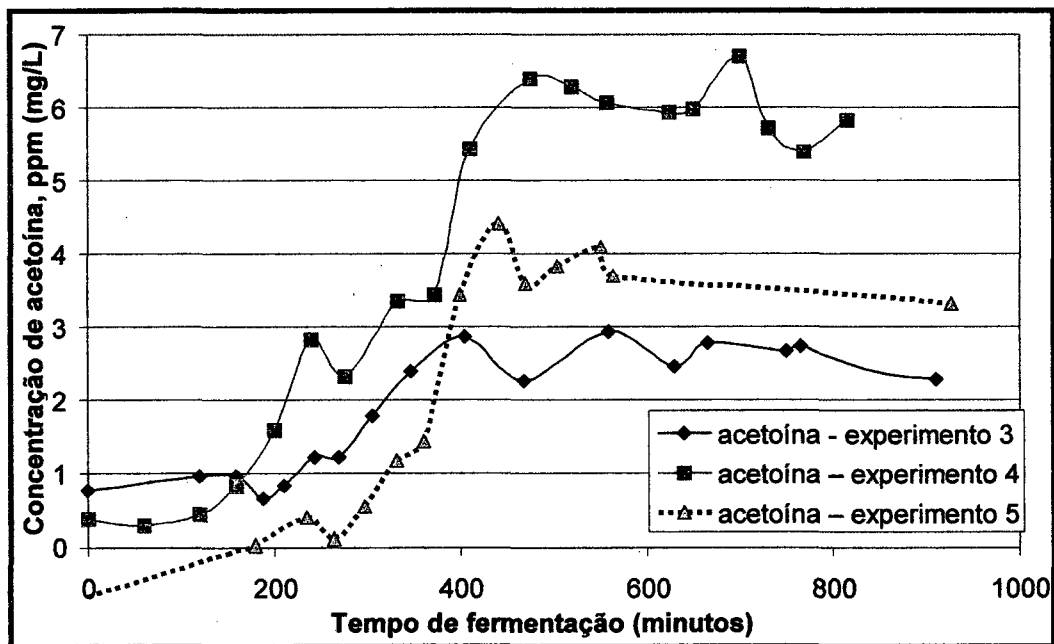


Figura 4.12 - Acetoína produzida durante as fermentações com soro de leite como meio de cultura

Comparando as curvas da Figura 4.12 com as curvas de crescimento do microorganismo em soro de leite (Figura 4.11), nota-se que a fase em que há produção de acetoína coincide com a fase final de crescimento do microorganismo, quando a velocidade de crescimento começa a diminuir. No experimento 3, houve uma pequena produção de acetoína, de cerca de 2,5 mg/L. No experimento 4, em que houve adição de ácido cítrico e o pH diminuiu de 6 até 5,2 ao longo da fermentação, a produção foi substancialmente maior (de cerca de 6mg/L). No experimento 5, também com ácido cítrico mas com o pH diminuindo de 7 até 5,5, ponto em que começou a ser

controlado, a produção média de acetoína foi de 3,5 mg/L. Os resultados são próximos aos reportados na literatura (Cachon *et al.*, 1993, 1993₂) sem a presença de citrato, mas os meios com ácido cítrico, deveriam dar produções de 5 a 10 vezes maiores.

Sabe-se que a maior produção de derivados diferentes do ácido láctico está associada à condição de limitação de substrato (lactose). Isso pode explicar a formação de acetoína na fase final de crescimento, quando a concentração de substrato disponível é bem menor. Nesse caso, no entanto, dever-se-ia verificar uma produção maior de acetoína nos meios feitos com soro (onde usou-se menos substrato) do que nos meios MRS. Essa comparação ainda não será possível porque os resultados de análises com meio MRS foram inconclusivos.

4.3.6 Comentário sobre a determinação de diacetil e acetoína

A análise de diacetil e acetoína usando a reação de Voges-Proskauer apresentou problemas quanto à precipitação de proteínas do leite e quanto à presença de biomassa. Foram feitas tentativas de medição do diacetil e da acetoína diretamente no meio de cultura, mas houve a formação de precipitados, possivelmente de proteínas e talvez da biomassa, interferindo com as medidas. Para a análise do experimento 3, foi feita a centrifugação da amostra após a adição dos reagentes, para eliminar o precipitado; no caso dos experimentos 1 e 2, foi feita a centrifugação da amostra antes da adição de reagentes (para eliminar a biomassa), mas devido à formação de precipitado após a adição dos reagentes, foi necessária uma nova centrifugação.

Observou-se que, além da reação ser extremamente dependente do tempo, há a formação de coloração mais acentuada na superfície líquida das amostras, em contato com o ar. Na tentativa de isolar-se a amostra do ar, foram adicionadas às amostras da fermentação 3 cerca de 70µL de n-hexano – que, sendo insolúvel e menos denso que a amostra, poderia formar uma camada sobre a amostra e isolá-la do ar.

É provável ainda que a cor do meio de cultura MRS (devido principalmente às peptonas) interfira com as medidas, já que nas análises de diacetil e acetoína com amostras dessas fermentações, onde se esperava pelo menos pequenas quantidades de acetoína, não forneceram resultados conclusivos.

CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

No presente trabalho, relata-se que foram feitos estudos preliminares para avaliar o comportamento da bactéria *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* com relação à quantidade de inóculo, transferência de oxigênio e pH. Posteriormente foram feitos planejamentos experimentais com o objetivo de obter meios de cultura que dessem a máxima produção de biomassa pelo microorganismo, e a realização de modelos que representassem essa produção como função da composição do meio. Finalmente, foram feitos experimentos em fermentador com meios de cultura citados na literatura e com soro de leite, com o objetivo de avaliar a produção de biomassa, diacetil e acetoína no processo. A partir dos resultados obtidos, pode-se chegar às seguintes conclusões:

A partir dos resultados preliminares, fica claro que diversos fatores alteram sensivelmente o crescimento do microorganismo em estudo, entre eles a quantidade de inóculo, que é diretamente proporcional à produção final de biomassa para volumes de inóculo inferiores a cerca de 0,8% do volume total de meio; a velocidade de transferência de oxigênio, que é inversamente proporcional à formação de biomassa, e o pH, que é diretamente proporcional à produção final de biomassa (ou seja, a acidez do meio é inversamente proporcional à produção de biomassa).

A partir dos planejamentos experimentais, percebe-se que modelos lineares com interações de segunda ordem representam bem o comportamento do sistema estudado para pequenas faixas de variação das variáveis estudadas, mas que não são adequados para faixas mais largas. Nota-se também que concentrações simultaneamente altas de diferentes nutrientes podem causar a diminuição da produção de biomassa em comparação com meios menos concentrados, possivelmente devido à diminuição do a_w em meios mais concentrados.

Quanto aos nutrientes utilizados, todos estimulam o crescimento do microorganismo quando em concentrações baixas, mas a partir de determinados pontos causam a diminuição do crescimento do microorganismo. Não se pode isolar o efeito de cada nutriente por causa dos seus efeitos de interação, mas para diversas concentrações de YEA e PEP a lactose tem efeito inibidor a concentrações superiores a 3%; para diversas concentrações de LAC e PEP (especialmente as mais baixas), o extrato de levedura apresenta efeito estimulante até concentrações da ordem de 4%; para diversas concentrações de LAC e YEA (especialmente as mais baixas), a peptona tem

efeito estimulante até concentrações da ordem de 15%. Nos caso de PEP, o aumento de produção de biomassa é pequeno para variações superiores a 10%, em comparação com variações inferiores a esse valor.

Foi possível elaborar um modelo que representa razoavelmente a produção de biomassa como função de LAC, PEP e YEA na faixa estudada. Segundo esse modelo, o meio com composição ótima para o crescimento do microorganismo nas condições dos experimentos é de 1,3% de LAC, 3,6% de YEA e 8,3% de PEP, dando uma produção teórica de 2,5 g/L de biomassa seca.

A partir dos experimentos usando soro de leite, percebe-se que as produções de biomassa com meios contendo soro de leite como substituto da lactose são superiores às produções com formulações contendo lactose. As concentrações de TRYP e YEA afetam a produção de biomassa nos meios com soro de forma semelhante à PEP e YEA nos meios com lactose. Foi possível elaborar um modelo que representa razoavelmente a produção de biomassa como função de SORO, TRYP e YEA dentro das faixas de variação estudadas para as concentrações de nutrientes; segundo esse modelo, a concentração ideal de soro de leite reconstituído (com 8,2% g/g de sólidos) é da ordem de 50% mL/mL, a de YEA é de 2,85% e a de PEP é de 11%.

Observando-se os planejamentos experimentais de uma forma geral, nota-se que o planejamento evolucionário foi um método eficiente para auxiliar no desenvolvimento de um meio de cultura otimizado para a produção de biomassa de Llld. Observa-se ainda que fazer um primeiro plano com um número reduzido de variáveis e um número grande de experimentos (como em S1 e S2), de forma a fornecer um modelo prévio mais elaborado do comportamento do sistema com algumas concentrações de nutrientes “fixas” pode ser vantajoso para dar uma estimativa inicial consistente para os planos completos de experimentos.

Quanto aos métodos analíticos para os planejamentos com soro, nota-se que métodos espectrofotométricos e de massa seca devem ser aperfeiçoados ou substituídos por outros métodos devido às dificuldades geradas pela presença de proteínas do soro, mesmo ultrafiltrado.

A partir dos experimentos feitos em fermentador, fica claro que nas condições dos experimentos a velocidade de crescimento do microorganismo em meio com soro de leite é maior que nos meios MRS e MRS modificado; como a produção de biomassa para os dois tipos de meios

praticamente coincide, a produtividade de meios com soro foi também maior. Os experimentos realizados indicam que um pH menor implica em inibição do crescimento, e observa-se que meios com citrato provavelmente também causam um retardamento no crescimento celular.

Nos mesmos experimentos em fermentador, não foi possível detectar diacetil; as análises de acetoína mostram que a produção desse metabólito coincide com a fase final (de diminuição) de crescimento do microorganismo. Os resultados obtidos ficaram abaixo dos obtidos com o mesmo microorganismo, em condições semelhantes, citados na literatura. As análises espectrométricas de diacetil e acetoína mostram que, para meios de cultura contendo soro de leite, há interferência das proteínas do soro (que precipitam em pH alto, necessário na análise), da biomassa produzida e do ar (possivelmente do oxigênio); o método baseia-se, ainda, em uma reação bastante dependente do tempo.

Para futuras investigações tanto para da produção do Lld, quanto da produção de diacetil e acetoína, ficam as seguintes sugestões:

Quanto aos fatores que alteram o crescimento do microorganismo, a agitação, temperatura, velocidade de transferência de oxigênio e pH do meio de cultura foram escolhidos no início do trabalho, com base em valores da bibliografia, e não foram variados. Como esses fatores são importantes, devem ser estudados antes de se trabalhar maiores mudanças nos meios de cultura. Sugere-se velocidades de transferência de oxigênio mínimas e $\text{pH} = 7,0$, como um ponto de partida.

Quanto aos nutrientes utilizados para o meio de cultura, sugere-se a avaliação do uso de leveduras autolisadas ou mesmo suspensões de leveduras inativadas em substituição ao extrato de levedura. Um meio com soro de leite e leveduras autolisadas pode ser industrialmente econômico.

Quanto aos modelos elaborados, uma aplicação industrial (ou mesmo aplicações rotineiras de laboratório) exige que se encontre a formulação que dê o menor custo em relação à produção de biomassa. Isso pode ser feito preliminarmente criando um modelo para o custo do meio de cultura, dividindo o modelo para a produção de biomassa pelo modelo para o custo e encontrando-se o máximo da função, mas posteriormente se deve levar em conta a

produtividade. Esses métodos podem ser promissores para a otimização de processos industriais de culturas *starter*.

Quanto à produção de diacetil e acetoína pelo Llld, há uma série de fatores que supõe-se alteram a produção desses metabólitos; os que deveriam ser verificados preliminarmente são a concentração de citrato e a velocidade de transferência de oxigênio para o meio. Além disso, a possibilidade de se influenciar o metabolismo da bactéria – pela introdução de pequenas quantidades de etanodiol, por exemplo, ou de outro diol vicinal barato – para aumentar a produção de diacetil poderia ser verificada, além da investigação da produção de acetoína por culturas em crescimento vegetativo, em condições de limitação de substrato e com a adição de citrato.

Quanto aos métodos analíticos de determinação de diacetil e acetoína, recomenda-se a avaliação de métodos cromatográficos em substituição ao espectrofotométrico.

Finalmente, no caso específico da produção de diacetil como nutriente, recomenda-se três linhas de ação que são embasadas na literatura e não nos resultados obtidos nesse trabalho, mas podem apresentar resultados extremamente promissores, em comparação com a produção do diacetil por bactérias lácticas, embora duas se distanciem um pouco da engenharia bioquímica:

- Testar a oxidação de 2,3 butanodiol ou de 2-buteno para a produção de diacetil
- Estudar a produção de furfural a partir de pentoses da cana-de-açúcar, processo em que o diacetil é um subproduto;
- Pesquisar a possibilidade de fazer biotransformações de precursores como o 2,3 butanodiol ou pentoses por microorganismos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AESCHLIMANN A., STOCKAR U. The effect of yeast extract supplementation on the production of lactic acid from whey permeate by *Lactobacillus helveticus* Appl. Microbiol. Biotechnol. (1990) **32**, 398-402
- ALBERTAZZI, E. CARDILLO, R. SERVI, S. ZUCCHI, G. Biogenesis of 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate important aroma components biotechnology letters (1994) **5**, 491-496
- ALMOSNINO A. M., BELIN J. M., Apple pomace: an enzyme system for producing aroma compounds from polyunsaturated fatty acids Biotechnology letters (1991) **12**, 893-898
- 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 (1994) **1**, 38-42
- BARROS NETO, B. SCARMINIO, I. S., BRUNS R. E. Planejamento e otimização de experimentos 1ª ed. Campinas: Editora da Unicamp (1996)
- BASSIT N., BOQUIEN C.Y., PICQUE D., CORRIEU G. Effect of initial oxygen concentration on diacetyl and acetoin production by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* biovar *diacetylactis* Applied and environmental microbiology (1993) **6**, 1893-1897
- BERGER, R. G. Aroma Biotechnology 1st. ed. Berlin: Springer- Verlag, 1995, 239p.
- BERGEY'S Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2 SNEATH P. H. A., Ed. Baltimore: Williams & Wilkins, (1986)
- BOUMERDASSI H., MONNET C., DESMAZEAUD M., CORRIEU G. Effect of citrate on production of diacetyl and acetoin by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CNRZ 483 cultivated in the presence of oxygen J. Dairy Sci. (1997) **80**, 634-639
- BRUHN J. C., COLLINS E. B. Reduced nicotinamide adenine nucleotide oxidase of *Streptococcus diacetylactis* Journal of dairy science (1970) **7**, 857-860
- CACHON R., DIVIÈS C. A Descriptive Model for Citrate Utilization by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* bv. *diacetylactis* Biotechnology letters (1993) **8**, 837-842

- CACHON R., DIVIÈS C. Modeling of growth and lactate fermentation by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* in batch culture Appl. Microbiol. Biotechnol. (1993) **40**, 28-33
- CHARLWOOD B. V., MACLEOD G., WILLIAMS A. A., Bioformation of flavours (1992)
London: The Royal Society of Chemistry
- CHEETHAM, P. S. J. The use of biotransformations for the production of flavours and fragrances Trends in Biotechnology (1993) **11**, 478-488
- CHEN J. P., YANG B., Enhancement of release of short-chain fatty acids from milk fat with immobilized microbial lipase Journal of Food Science (1992) **3**, 781-782
- CHRISTIEN P., RAIMBAULT, M. Optimization of culture medium for aroma production by *Ceratocystis fimbriata* Biotechnology Letters, (1991) **17**, 521-526
- CHRISTIEN P., VILLEGAS E., REVAH S. Growth and aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in various fermentation media Biotechnology letters (1994) **11**, 1183-1188
- COGAN T. M., O'DOWD M., MELLERICK D. Effects of pH and sugar on acetoin production from citrate by *Leuconostoc lactis* Applied and environmental microbiology (1981) **1**, 1-8
European Pat. Application 90310439.6 (1990) para Meiji Milk Products Co. Ltd.
- EL-GENDY S. M., ABDEL-GALIL H., SHAHIN Y., HEGAZI F. Z. Acetoin and diacetyl production by homo- and heterofermentative lactic acid bacteria J. Food Protection (1983) **5**, 420-425
- FARMER, L. J. Proceedings of the Nutrition Society (1994), **53**, 327-333
- GATFIELD, I. L. Enzymatic and microbial generation of flavors Perfumer & Flavorist (1995) **20**, 5-14
- GATFIELD I. L, GÜNTERT M., SOMMER H., WERKHOFF P., Some aspects of the microbiological production of flavor-active lactones with particular reference to γ -decalactone. Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. (1993) **15** (5/6), 165-170

- GONZÁLEZ J., VIDAL I., BERNARDO A., MARTIN R. Kinetics of the diacetyl and 2,3 pentanedione reduction by diacetyl reductase (α -diketone reductase (NAD)) from *Staphylococcus aureus* Biochimie (1988) **70**, 1791-1797
- GUYMON J. F., CROWELL E. A. The formation of acetoin and diacetyl during fermentation, and the levels found in wines Am. J. Enol. Vitic. (1961). **12**, 60-66
- HARVEY R. J., COLLINS E. B. Roles of citrate and acetoin in the metabolism of *Streptococcus diacetylactis* Journal of bacteriology (1963) **86**, 1301-1307
- HONG Y. C., HUANG L. C., REINECCIUS G. A., HARLANDER S. K., LABUZA T. P. Production of aroma compounds from strawberry cell suspension cultures by addition of precursors Plant Cell, Tissue and Organ Culture (1990) **21**, 245-251
- HUGENHOLTZ J., STARRENBURG M. J. C. Diacetyl production by different strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* and *Leuconostoc* spp. Applied microbiology and biotechnology (1992) **38**, 17-22
- ISHII N., MATSUMURA M., KATAOKA H., TANAKA H., ARAKI K. Diacetyl fermentation coupled with pervaporation using oleyl alcohol supported liquid membrane Bioproc. Eng. (1995) **13**, 119-123
- IZZO H. V., HO C.T. Ammonia affects maillard chemistry of an extruded autolyzed yeast extract: pyrazine aroma generation and brown color formation Journal of food science (1992) **3**, 657-674
- JAY, J. M. Antimicrobial properties of diacetyl Applied and environmental microbiology (1982) **44**, **3**, 525-532
- JENSEN P. H., HAMMER K. Minimal requirements for exponential growth of *Lactococcus lactis* Appl. Environ. Microbiol. (1993) **12**, 4363-4366
- KANEKO T., SUZUKI H. e TAKAHASHI T. The effects of metal ions on diacetyl production by *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* 3022 Agric. Biol. Chem. (1987) **9**, 2315-2320

- KANEKO T., WATANABE Y., SUZUKI H. Enhancement of diacetyl production by a diacetyl-resistant mutant of (Citr+) *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 3022 and by aerobic conditions of growth *Journal of Dairy Science* 73:291-298 (1990)
- KANEKO T., WATANABE Y., SUZUKI H. Differences between *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 2206 and (Citr+) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 3022 in the characteristics of diacetyl production *Applied and Environmental Microbiology*, Oct. 1991, p. 3040-3042
- LANGRAND G., RONDOT N., TRIANTAPHYLIDES C., BARATTI J. Short chain flavour esters synthesis by microbial lipases *Biotechnology letters* (1990) 8, 581-586
- MAN J. C. de, ROGOSA M., SHARPE M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli (1960) *J. Appl. Bacteriol.* 23, 130-135
- MANJÓN A., IBORRA J. L., AROCAS A. Short-chain flavour ester synthesis by immobilized lipase in organic media *Biotechnology letters* (1991) 5, 339-344
- MATTESICH J., COOPER J. R. The spectrophotometric determination of diacetyl *Anal. biochem.* (1989) 180, 349-350
- MERCK & Co., 1990. The MERCK Index 11th ed. New Jersey: Merck & Co. Inc., 1990
- MONNET C., SCHMITT P., DIVIES C. Diacetyl production in milk by an α -acetolactic acid accumulating strain of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* *Journal of Dairy Science* 77: 2916-2924 (1994)
- OCHI H. TAKAHASHI M., KANEKO T., SUZUKI H., TANAKA H. Diacetyl production by co-immobilized citrate-positive *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 3022 and homogenized bovin liver in alginate fibers with double gel layers *Biotechnol. lett.* (1991) 7, 505-510
- OH S., RHEEM S., SIM J., KIM S., BAEK Y. Optimizing conditions for the growth of *Lactobacillus casei* YIT 9018 in Tryptone-Yeast Extract-Glucose Medium by Using Response Surface Methodology *Appl. Env. Microbiol.* (1995) 11, 3809-3814
- OLIVARES J. C., RUA B., SUSAEETA I., ALDAMIZ-ECHEVARRIA P. Growth kinetics of several lactic acid bacteria useful as starter for ewe's cheese production *Biotechnology letters* (1993) 10, 1071-1076

- OUGH C. S., AMERINE M. A. Methods for Analysis of Musts and Wines 1st Rev. ed. reviewed, New York: John Wiley & Sons, 1988
- PACK M. Y., VEDAMUTHU E. R., SANDINE W. E., ELLIKER P. R. Effect of temperature on growth and diacetyl production by aroma bacteria in single and mixed-strain lactic cultures J. Dairy Sci. (1967) 3, 339-345
- PARK S. H., XING R., WHITMAN W. B. Nonenzymatic acetolactate oxidation to diacetyl by flavin, nicotinamide and quinone coenzymes Bioch. Bioph. Acta (1995) 1245, 366-370
- PASTORE G. M., SATO H. H., YANG T. S., PARK Y. K., MIN D. B. Production of fruity aroma by newly isolated yeast Biotechnology letters (1994) 4, 389-392
- PETIT C., VILCHEZ F., MARCZACK R. Formation and stabilization of diacetyl and acetoin concentration in fully grown cultures of *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* Biotech. Letters (1989) 1, 53-56
- RAMOS A., JORDAN K., COGAN T. M., SANTOS H. ¹³C nuclear magnetic resonance studies of citrate and glucose cometabolism by *Lactococcus lactis* Appl. Environ. Microbiol. (1994) 6, 1739-1748
- RAYMOND, Y., MORIN, A., CORNIER, F., CHAMPAGNE, C. P., DUBEAU, H. Physical factors influencing the production of strawberry aroma by *Pseudomonas fragi* grown in skim milk (1990) Biotechnology letters, 12, 931-936
- RAZAFINDRALAMBO H., *et al.*, Chiral flavour compounds - properties and analysis in PATTERSON, R. L. S., *et al.*, Bioformation of flavours (1992) London: The Royal Society of Chemistry
- RENNA M. C., NAJIMUDIN N., WINIK L. R., ZAHLER S. A. Regulation of *Bacillus subtilis* *alsS*, *alsD*, and *alsR* genes involved in post-exponential phase production of acetoin J. Bacteriol., (1993) 12, 3863-3875
- ROMANO P., SUZZI G., ZIRONI R., COMI G. Biometric study of acetoin production in *Hanseniaspora guilliermondii* and *Kloeckera apiculata* Applied and environmental microbiology (1993) 6, 1838-1841

- SALOFF-COSTE C. J. Lactic acid bacteria Danone World Newsletter (1994) 5
- SCHLEGEL H. G., General microbiology 7th ed. Cambridge: University Press 1993, 655pp.
- SEITZ E. W. Microbial and enzyme-induced flavors in dairy foods J. Dairy Sci. (1990) 73, 3664-3691
- SEREBRENNIKOV, V. M. Effects of temperature on the biosynthesis of 2,3-butanediol and acetoin under varying conditions of batch culturing of *Bacillus polymyxa* CCM 1465 Appl. Biochem. Microbiol. (1995) 6, 537-542
- SMID E. J., PLAPP R., KONINGS W. N. Peptide uptake is essential for growth of *Lactococcus lactis* on the milk protein casein J. Bacteriol. (1989) 11, 6135-6140
- SMITH M. R., van der SCHAAF A., de REE E. M., de BONT J. A. M., HUGENHOLTZ J. The physiology of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* in hollow-fibre bioreactors: glucose, lactose and citrate metabolism at high cell densities Appl. Microbiol. Biotechnol. (1993) 39, 94-98
- SOMOGY L. P., RHOMBERG B., TAKEI N. 1995 report Obtido de <http://www-cmrc.sri.com/CIN/JanuaryFebruary96/Article12.html>
- STANIER R. Y., INGRAHAM, J. L., WHEELIS, M. L., PAINTER, P. R. General Microbiology 5th ed. London: MacMillan Press Ltd., 1987
- STATSOFT, Inc. - Arquivo de ajuda do programa "Statistica for Windows – Release 4.3 a" (©1993)
- TAKAHASHI H., OCHI H., KANEKO T., SUZUKI H., TANAKA H. Diacetyl production by immobilized (Citr+) *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 3022 in the fibrous Ca-alginate gel Biotechnology Letters vol. 12 no. 8 569-574 (1990)
- TAKKEN H. J., GROESBEEK N. M., ROOS R. Downstream processing: concentration and isolation techniques in industry in PATTERSON, R. L. S.,
- U. S. Pat. Office United States Patent and Trademark Office: Crystal Park 3, Suite 461 Washington, DC 20231 Fax: (703) 306-2654 (www.uspto.gov)

VERHUE W. M., TJAN F. S. B. Study of the citrate metabolism of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* by means of ^{13}C nuclear magnetic resonance Applied and environmental microbiology (1991) 11, 3371-3377