



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTURA PARA  
PRODUÇÃO DE ACETOÍNA POR *Hanseniaspora guilliermondii***

**ROBERTA MIRANDA TEIXEIRA**

Engenheira de Alimentos – FURG

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química.**

**Orientador:** Prof. Dr. Agenor Furigo Jr.

**Co-orientador:** Prof. Dr. Jorge Ninow

FLORIANÓPOLIS

1999


**OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTURA PARA A PRODUÇÃO DE  
ACETOÍNA POR *Hanseniaspora guilliermondii***

**Roberta Miranda Teixeira**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química** da Universidade Federal de Santa Catarina, no curso de Pós-Graduação em Engenharia Química.

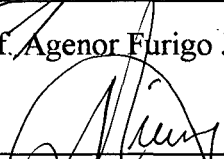
  
Orientador: Prof. Agenor Furigo Jr., Dr., EQA - UFSC

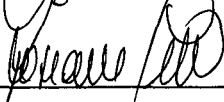
  
Co-orientador: Prof. Jorge Luiz Ninow, Dr., EQA - UFSC

  
Prof. Humberto Jorge José, Dr. rer. nat.  
Coordenador do Curso de Pós-Graduação

**Banca Examinadora**

  
Orientador: Prof. Agenor Furigo Jr., Dr., EQA - UFSC

  
Co-orientador: Prof. Jorge Luiz Ninow, Dr., EQA - UFSC

  
Profa. Roseane Fett, Dr., CAL - UFSC

  
Profa. Maria Isabel Queiroz, Dr., QMC - FURG

Florianópolis, 17 de junho de 1999.

*“Somos o que fazemos, mas somos principalmente,  
o que fazemos para mudar o que somos.”*

*Eduardo Galeano*

## AGRADECIMENTOS

---

A Eduardo, que sempre esteve ao meu lado nos momentos difíceis, por suas palavras de carinho e incentivo, meu especial agradecimento.

Aos meus pais, Roberto e Martha pelo amor, compreensão e confiança em mim depositada, meu eterno agradecimento.

Ao Seu Hugo e Dona Ivone, pelo apoio, amizade e carinho.

Aos professores Agenor Furigo Jr. e Jorge Luiz Ninow pela orientação e amizade.

À professora Maria Isabel Queiroz pela amizade, incentivo e contribuição a este trabalho com sua participação na banca examinadora.

À professora Roseane Fett pela participação da banca examinadora.

Ao professor César Costapinto Santana pela ajuda e atenção.

Aos colegas e amigos, especialmente a: Luizildo, Patrícia, Carlos, Fátima, Anne, Régis, Lu, Denise, Rita, Rafael, Cíntia, Darlene, Rodrigo, Daniela e Roseli pela companhia e apoio para a realização deste trabalho.

Ao sempre presente Edvilson pela amizade, apoio e atenção.

À Coordenadoria de Pós-Graduação em Engenharia Química, por permitir o desenvolvimento deste trabalho.

À CAPES, pelo apoio financeiro de março de 1997 a março de 1999.

## SUMÁRIO

---

LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABELAS .....	xiii
NOMENCLATURA .....	xiv
RESUMO .....	xix
ABSTRACT .....	xx
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1 Aromas .....	3
2.1.1 Conceito .....	3
2.1.2 Considerações gerais sobre aromas .....	3
2.1.3 O mercado de aromas .....	6
2.2 <i>Biotecnologia na produção de aromas</i> .....	9
2.3 <i>Microrganismos produtores de aromas</i> .....	10
2.4 <i>Hanseniaspora guilliermondii</i> .....	12
2.5 <i>Acetoína</i> .....	13
2.5.1 Biossíntese da acetoína .....	14
2.5.2 Biossíntese da acetoína por leveduras .....	17
2.5.3 Fatores que afetam a produção de acetoína .....	22
2.6 <i>Acetato de etila</i> .....	25
Fatores que afetam a produção de acetato de etila .....	26

---

<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	27
<b>3.1</b>	<b><i>Planejamento experimental</i></b> .....	27
3.1.1	Planejamento fatorial completo + estrela .....	29
3.1.2	Análises estatísticas .....	34
3.1.3	Determinação das condições ótimas para produção de acetoína..	34
<b>3.2</b>	<b><i>Microrganismo</i></b> .....	35
<b>3.3</b>	<b><i>Manutenção da levedura</i></b> .....	35
<b>3.4</b>	<b><i>Ensaio Fermentativo</i></b> .....	36
<b>3.5</b>	<b><i>Métodos Analíticos</i></b> .....	38
3.5.1	Amostragem .....	38
3.5.2	Determinação da concentração celular .....	38
3.5.3	Dosagem de glicose .....	39
3.5.4	Determinação da concentração de acetoína, etanol e acetato de etila	41
<b>3.6</b>	<b><i>Metodologia utilizada nos cálculos</i></b> .....	42
3.6.1	Fatores de conversão .....	42
3.6.2	Produtividade total .....	42
3.6.3	Velocidade específica máxima de crescimento .....	44
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	45
<b>4.1</b>	<b><i>Planejamento experimental</i></b> .....	45
<b>4.2</b>	<b><i>Otimização das condições de produção da acetoína</i></b> .....	56
<b>4.3</b>	<b><i>Cinética de crescimento, produção de acetoína, acetato de etila e etanol</i></b> .....	61

---

<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>76</b>
<b>6 SUGESTÕES .....</b>	<b>78</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>79</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>88</b>

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 2.1</b> – Processos para obtenção de aromas naturais (Gatfield <i>et al</i> , 1995) .....	7
<b>Figura 2.2</b> – Produtos alimentícios naturais produzidos biotecnologicamente (Gatfield <i>et al</i> , 1995) .....	9
<b>Figura 2.3</b> – Formação de hidroxiletiamina pirofosfato a partir do piruvato .....	15
<b>Figura 2.4a</b> – Mecanismos de formação de acetoína a partir de hidroxiletiamina pirofosfato .....	16
<b>Figura 2.4b</b> – Mecanismos de formação de acetoína a partir de hidroxiletiamina pirofosfato .....	16
<b>Figura 2.5</b> – Esquema da biossíntese da acetoína por leveduras .....	21
<b>Figura 3.1</b> – <i>Hanseniaspora guilliermondii</i> CCT 3800 (x1000) .....	35
<b>Figura 3.2</b> – Crescimento celular do inóculo de <i>Hanseniaspora guilliermondii</i> (40g/l de glicose; pH de 5,5 e temperatura de 30°C) .....	37
<b>Figura 3.4</b> – Reações ocorridas no método enzimático colorimétrico para determinação da concentração de glicose .....	40
<b>Figura 4.1</b> – Valores previstos em função dos valores observados para o modelo da concentração máxima em acetoína .....	51
<b>Figura 4.2</b> – Valores previstos em função dos valores observados para o modelo da conversão substrato em acetoína .....	52
<b>Figura 4.3</b> – Valores previstos em função dos valores observados para o modelo da produtividade em acetoína .....	52
<b>Figura 4.4</b> – Superfície de resposta da concentração máxima em acetoína em função da concentração inicial de glicose e temperatura .....	54
<b>Figura 4.5</b> – Superfície de resposta da conversão substrato em acetoína em função do pH inicial e temperatura .....	54
<b>Figura 4.6a</b> – Superfície de resposta da produtividade em acetoína em função da concentração inicial de glicose e temperatura .....	55
<b>Figura 4.6b</b> – Superfície de resposta da produtividade em acetoína em função do pH e concentração inicial de glicose .....	55
<b>Figura 4.6c</b> – Superfície de resposta da produtividade em acetoína em função do pH e temperatura .....	56
<b>Figura 4.7</b> – Curvas de nível da concentração máxima em acetoína (mg/l) em relação à concentração inicial de glicose e temperatura .....	57
<b>Figura 4.8</b> – Curvas de nível da concentração máxima em acetoína (mg/l) em relação à concentração inicial de glicose e temperatura .....	58



<b>Figura 4.9</b> – Curvas de nível da produtividade em acetoína ( $\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) em relação à concentração inicial de glicose e temperatura.....	59
<b>Figura 4.10</b> – Curvas de nível da concentração máxima em acetoína (mg/l) em relação à concentração inicial de glicose e pH.....	59
<b>Figura 4.11</b> – Curvas de nível da produtividade em acetoína ( $\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) em relação à concentração inicial de glicose e pH.....	60
<b>Figura 4.12</b> – Curvas de nível da concentração máxima em acetoína (mg/l) em relação à temperatura e pH.....	60
<b>Figura 4.13</b> – Curvas de nível da produtividade em acetoína ( $\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) em relação à temperatura e pH.....	61
<b>Figura 4.14</b> – Consumo de glicose, produção de acetoína e células do ensaio 1: concentração inicial de glicose igual a 30 g/l; temperatura de 26°C e pH inicial de 4,4.....	65
<b>Figura 4.15</b> – Consumo de glicose, produção de acetoína e células do ensaio 2: concentração inicial de glicose igual a 68 g/l; temperatura de 26°C e pH inicial de 4,4.....	65
<b>Figura 4.16</b> – Consumo de glicose, produção de acetoína e células do ensaio 3: concentração inicial de glicose igual a 30 g/l; temperatura de 34°C e pH inicial de 4,4.....	65
<b>Figura 4.17</b> – Consumo de glicose, produção de acetoína e células do ensaio 4: concentração inicial de glicose igual a 68 g/l; temperatura de 34°C e pH inicial de 4,4.....	66
<b>Figura 4.18</b> – Consumo de glicose, produção de acetoína e células do ensaio 5: concentração inicial de glicose igual a 30 g/l; temperatura de 26°C e pH inicial de 5,6.....	66
<b>Figura 4.19</b> – Consumo de glicose, produção de acetoína e células do ensaio 6: concentração inicial de glicose igual a 68 g/l; temperatura de 26°C e pH inicial de 5,6.....	66
<b>Figura 4.20</b> – Consumo de glicose, produção de acetoína e células do ensaio 7: concentração inicial de glicose igual a 30 g/l; temperatura de 34°C e pH inicial de 5,6.....	67
<b>Figura 4.21</b> – Consumo de glicose, produção de acetoína e células do ensaio 8: concentração inicial de glicose igual a 68 g/l; temperatura de 34°C e pH inicial de 5,6.....	67
<b>Figura 4.22</b> – Consumo de glicose, produção de acetoína e células do ensaio 9: concentração inicial de glicose igual a 17 g/l; temperatura de 30°C e pH inicial de 5,0.....	67
<b>Figura 4.23</b> – Consumo de glicose, produção de acetoína e células do ensaio 10: concentração inicial de glicose igual a 81 g/l; temperatura de 30°C e pH inicial de 5,0.....	68
<b>Figura 4.24</b> – Consumo de glicose, produção de acetoína e células do ensaio 11: concentração inicial de glicose igual a 49 g/l; temperatura de 24°C e pH inicial de 5,0.....	68
<b>Figura 4.25</b> – Consumo de glicose, produção de acetoína e células do ensaio 12: concentração inicial de glicose igual a 49 g/l; temperatura de 36°C e pH inicial de 5,0.....	68

<b>Figura 4.26</b> – Consumo de glicose, produção de acetoína e células do ensaio 13: concentração inicial de glicose igual a 49 g/l; temperatura de 30°C e pH inicial de 4,0.....	69
<b>Figura 4.27</b> – Consumo de glicose, produção de acetoína e células do ensaio 14: concentração inicial de glicose igual a 49 g/l; temperatura de 30°C e pH inicial de 6,0.....	69
<b>Figura 4.28</b> – Consumo de glicose, produção de acetoína e células do ensaio 15: concentração inicial de glicose igual a 49 g/l; temperatura de 30°C e pH inicial de 5,0.....	69
<b>Figura 4.29</b> – Consumo de glicose, produção de acetoína e células do ensaio 16: concentração inicial de glicose igual a 49 g/l; temperatura de 30°C e pH inicial de 5,0.....	70
<b>Figura 4.30</b> – Produção de acetoína, acetato de etila e etanol no ensaio 1: concentração inicial de glicose igual a 30 g/l; temperatura de 26°C e pH inicial de 4,4.....	70
<b>Figura 4.31</b> – Produção de acetoína, acetato de etila e etanol no ensaio 2: concentração inicial de glicose igual a 68 g/l; temperatura de 26°C e pH inicial de 4,4.....	70
<b>Figura 4.32</b> – Produção de acetoína, acetato de etila e etanol no ensaio 3: concentração inicial de glicose igual a 30 g/l; temperatura de 34°C e pH inicial de 4,4.....	71
<b>Figura 4.33</b> – Produção de acetoína, acetato de etila e etanol no ensaio 4: concentração inicial de glicose igual a 68 g/l; temperatura de 34°C e pH inicial de 4,4.....	71
<b>Figura 4.34</b> – Produção de acetoína, acetato de etila e etanol no ensaio 5: concentração inicial de glicose igual a 30 g/l; temperatura de 26°C e pH inicial de 5,6.....	71
<b>Figura 4.35</b> – Produção de acetoína, acetato de etila e etanol no ensaio 6: concentração inicial de glicose igual a 68 g/l; temperatura de 26°C e pH inicial de 5,6.....	72
<b>Figura 4.36</b> – Produção de acetoína, acetato de etila e etanol no ensaio 7: concentração inicial de glicose igual a 30 g/l; temperatura de 34°C e pH inicial de 5,6.....	72
<b>Figura 4.37</b> – Produção de acetoína, acetato de etila e etanol no ensaio 8: concentração inicial de glicose igual a 68 g/l; temperatura de 34°C e pH inicial de 5,6.....	72
<b>Figura 4.38</b> – Produção de acetoína, acetato de etila e etanol no ensaio 9: concentração inicial de glicose igual a 17 g/l; temperatura de 30°C e pH inicial de 5,0.....	73
<b>Figura 4.39</b> – Produção de acetoína, acetato de etila e etanol no ensaio 10: concentração inicial de glicose igual a 81 g/l; temperatura de 30°C e pH inicial de 5,0.....	73
<b>Figura 4.40</b> – Produção de acetoína, acetato de etila e etanol no ensaio 11: concentração inicial de glicose igual a 49 g/l; temperatura de 24°C e pH inicial de 5,0.....	73

- Figura 4.41** – Produção de acetoína, acetato de etila e etanol no ensaio 12: concentração inicial de glicose igual a 49 g/l; temperatura de 36°C e pH inicial de 5,0 ..... 74
- Figura 4.42** – Produção de acetoína, acetato de etila e etanol no ensaio 13: concentração inicial de glicose igual a 49 g/l; temperatura de 30°C e pH inicial de 4,0 ..... 74
- Figura 4.43** – Produção de acetoína, acetato de etila e etanol no ensaio 14: concentração inicial de glicose igual a 49 g/l; temperatura de 30°C e pH inicial de 6,0 ..... 74
- Figura 4.44** – Produção de acetoína, acetato de etila e etanol no ensaio 15: concentração inicial de glicose igual a 49 g/l; temperatura de 30°C e pH inicial de 5,0 ..... 75
- Figura 4.45** – Produção de acetoína, acetato de etila e etanol no ensaio 16: concentração inicial de glicose igual a 49 g/l; temperatura de 30°C e pH inicial de 5,0 ..... 75

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2.1</b> – Acetoína produzida no vinho por diferentes espécies de leveduras.....	14
<b>Tabela 3.1</b> – Valores relativos aos códigos dos níveis para as variáveis independentes no planejamento fatorial em estrela.....	30
<b>Tabela 3.2</b> – Ensaio realizado no planejamento fatorial completo $2^3$ + estrela.....	31
<b>Tabela 3.3</b> – Análise de variância para o ajuste de um modelo pelo método dos mínimos quadrados.....	34
<b>Tabela 3.4</b> – Composição do meio YMA (Yeast Malt Extract Agar).....	36
<b>Tabela 3.5</b> – Composição do meio YM (Yeast Malt Extract).....	36
<b>Tabela 3.6</b> – Reagentes utilizados no teste enzimático colorimétrico Enz Color.....	40
<b>Tabela 4.1</b> – Resultados do planejamento fatorial $2^3$ + estrela, para avaliar a concentração máxima em acetoína ( $C_{\text{acetoína}}$ ), conversão substrato em produto ( $Y_{\text{acet/s}}$ ) e produtividade ( $P_{\text{acetoína}}$ ).....	46
<b>Tabela 4.2</b> – Análise dos efeitos das variáveis independentes sobre a resposta em concentração máxima de acetoína ( $C_{\text{acetoína}}$ ).....	46
<b>Tabela 4.3</b> – Análise dos efeitos das variáveis independentes sobre a resposta em conversão substrato em acetoína ( $Y_{\text{acet/s}}$ ).....	47
<b>Tabela 4.4</b> – Análise dos efeitos das variáveis independentes sobre a resposta em produtividade em acetoína ( $P_{\text{acetoína}}$ ).....	47
<b>Tabela 4.5</b> – Coeficientes de regressão (codificados) para o modelo estimado para concentração máxima de acetoína ( $P_{\text{máx}}$ ).....	48
<b>Tabela 4.6</b> – Coeficientes de regressão (codificados) para o modelo estimado para conversão substrato em produto ( $Y_{\text{P/S}}$ ).....	48
<b>Tabela 4.7</b> – Coeficientes de regressão (codificados) para o modelo estimado para produtividade em acetoína ( $P_{\text{acetoína}}$ ).....	49
<b>Tabela 4.8</b> – Análise de variância para avaliar a significância estatística do modelo quadrático para concentração máxima em acetoína ( $C_{\text{acetoína}}$ ).....	50
<b>Tabela 4.9</b> – Análise de variância para avaliar a significância estatística do modelo para conversão substrato em produto ( $Y_{\text{acet/s}}$ ).....	50
<b>Tabela 4.10</b> – Análise de variância para avaliar a significância estatística do modelo quadrático para produtividade em acetoína ( $P_{\text{acetoína}}$ ).....	50
<b>Tabela 4.11</b> – Parâmetros cinéticos máximos alcançados para o crescimento celular.....	63
<b>Tabela 4.12</b> – Parâmetros cinéticos máximos alcançados para a produção em acetoína.....	63
<b>Tabela 4.13</b> – Parâmetros cinéticos máximos alcançados para a produção de etanol.....	64

## NOMENCLATURA

---

$b_0$	coeficiente do modelo codificado relativo ao termo independente
$b_{ij}$	coeficiente do modelo codificado relativo aos efeitos de interação
$b_i$	coeficiente do modelo codificado relativo aos efeitos principais
$b_{ii}$	coeficiente do modelo codificado relativo aos efeitos quadráticos
$C_{\text{acetoína}}$	concentração máxima em acetoína
CCT	Coleção de Cultura Tropical da Fundação “André Tosello”
CG	Cromatografia gasosa
DIC	detector de ionização de chama
F	teste de significância estatística
GL	graus de liberdade
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
$k$	número de fatores
$m$	número de níveis distintos
MQ	média quadrática
$MQ_R$	média quadrática da regressão
$MQ_r$	média quadrática dos resíduos
$n$	número total de observações (ensaios)
$n_i$	número de repetições do nível $i$
$p$	número de parâmetros do modelo
$P_{\text{acetoína}}$	produtividade em acetoína (g/l.h)
$P_x$	produtividade em células (g/l.h)

---

$P_{\max}$	valor máximo de produto formado (g/l)
$P_p$	produtividade em produto (g/l.h)
$r^2$	coeficientes de determinação
$S_f$	valor final de concentração de glicose (g/l)
$S_0$	valor inicial de concentração de glicose (g/l)
SQ	soma quadrática
$SQ_{ep}$	soma quadrática devido ao erro puro
$SQ_{fej}$	soma quadrática devido à falta de ajuste do modelo em relação às respostas observadas
$SQ_R$	soma quadrática devido a regressão
$SQ_r$	soma quadrática devido ao resíduo
$SQ_T$	soma quadrática total
$t$	tempo de fermentação (h), quando a concentração de células ou produto é máxima
$x_i$	variáveis independentes ou fatores
$x_i x_j$	efeito de interação sobre a resposta
$x_i$	efeito principal linear sobre a resposta
$x_i^2$	efeito quadrático sobre a resposta
$x_1$	concentração inicial de glicose
$x_2$	temperatura
$x_3$	pH
$X_0$	valor inicial de concentração celular (g/l)

$X_{\max}$	valor máximo de concentração celular (g/l)
$y$	variáveis dependentes ou respostas
$\bar{y}$	estimativa dos valores populacionais das respostas
$y'$	derivada da função em estudo
$\bar{y}$	média global das respostas
$\hat{y}$	valor estimado pelo modelo
$y_{ij}$	respostas observadas para cada nível e repetição
$Y_{\text{acet/s}}$	conversão substrato em acetoina
YM	Yeast Malt Extract
YMA	Yeast Malt Extract Agar
$Y_{p/s}$	fator de conversão substrato em produto (g/g)
$Y_{x/s}$	coeficiente de conversão substrato em células (g/g)
$\alpha$	distância da condição do ponto central
$\delta$	nível de significância
$\varnothing$	diâmetro
$\lambda$	comprimento de onda
$\mu_x$	velocidade específica de crescimento
$\mu_{\max}$	velocidade específica máxima de crescimento
$\nu$	graus de liberdade

## RESUMO

A síntese de acetoína por *Hanseniaspora guilliermondii* a partir de glicose como fonte de carbono sob condições aeróbias é estudada. Um planejamento experimental e análise de superfície de resposta são desenvolvidos para avaliar a influência da concentração inicial de glicose, temperatura e pH na produção de acetoína. Os ensaios foram desenvolvidos em frascos agitados contendo meio YM à temperatura controlada. Um monitoramento do consumo de glicose, produção de biomassa e metabólitos (acetoína, acetato de etila e etanol) foi realizado. Os efeitos da concentração inicial de glicose e da temperatura apresentaram-se significativos para a resposta concentração máxima em acetoína. Já para a resposta produtividade, a concentração inicial de glicose e a interação entre temperatura e pH foram os efeitos que apresentaram significância estatística. Modelos empíricos para a produtividade e concentração máxima de acetoína foram determinados, os quais demonstraram-se não só significativos, como também preditivos. A otimização do processo foi realizada determinando-se os pontos de máximo nas equações representativas dos modelos acima citados. As condições ótimas encontradas são concentração inicial de glicose de 63 g/l e temperatura de 28 °C para a obtenção de uma concentração máxima em acetoína, sendo esta em torno de 365 mg/l. O ponto máximo considerando a produtividade e a concentração de acetoína é encontrado nas condições de concentração inicial de glicose igual a 64 g/l, temperatura de 30 °C e pH de 4,5.



## ABSTRACT

The synthesis of acetoin production by *Hanseniaspora guilliermondii* using glucose as carbon source, under aerobic conditions was investigated. Experimental design and response surface analysis were developed to evaluate the influence of initial concentration of glucose, temperature and pH on the acetoin production. The assays were carried out in agitated flasks with YM medium under controlled temperature. The glucose consumption, biomass and metabolites (acetoin, ethyl acetate and ethanol) productions were analyzed. The effects of initial concentration of glucose and temperature had shown significant on the maximal concentration of acetoin. On the productivity, the effects of initial concentration of glucose and the interaction between temperature and pH had shown statistic significance. Empirical models to represent the productivity and maximal acetoin concentration were determined, which showed significant and predictive. The process optimization was made through the maximal point of the model equations. The optimal conditions to produce a maximal acetoin concentration were 63 g/l for initial concentration of glucose and 28 °C for temperature, which was approximately 365 mg/l. However, the optimal conditions to productivity and acetoin concentration together were 64 g/l for initial glucose concentration, 30 °C for temperature and 4,5 for pH.

# INTRODUÇÃO

## 1. INTRODUÇÃO

Os aromas estão presentes em todos os alimentos, e podem ser formados durante seu processamento ou pela ação de microrganismos.

Muitas vezes, para reforçar ou mascarar o sabor de produtos alimentícios faz-se necessária a adição de substâncias químicas puras ou misturas, tornando o produto mais atrativo para o consumidor. Desta forma, os aromas tornaram-se aditivos indispensáveis para as indústrias de alimentos.

É crescente a importância da biotecnologia na síntese de componentes de aromas. Aromatizantes sintéticos, derivados da petroquímica ou outra natureza química, estão sendo substituídos gradativamente pelos de origem enzimática ou fermentativa.

Além de serem menos agressivos ao meio ambiente, os processos biotecnológicos produzem aromas considerados naturais, enquanto que aromatizantes e flavorizantes sintéticos são artificiais.

Tendo em vista as exigências cada vez maiores do mercado consumidor para a utilização de produtos naturais, e o alto custo de extração e purificação destes, diversos grupos de pesquisa vêm dedicando-se à investigação de bioprocessos capazes de produzir compostos naturais de interesse comercial.

A acetoína, objeto deste estudo, é sintetizada quimicamente por redução parcial do diacetil ou por ação microbiana a partir de uma fonte de açúcar. Funciona como potencializador de aromas, principalmente de manteiga.

De acordo com Romano & Suzzi (1996) e Moritz (1998), altas concentrações de acetoína são produzidas por *Hanseniaspora guilliermondii*, uma levedura apiculada do vinho.

Em face disso, este trabalho tem como objetivos o estudo da produção de acetoína por *Hanseniaspora guilliermondii*, utilizando planejamento experimental e análise de superfície de resposta para verificar a influência da concentração inicial de glicose, da temperatura e do pH no processo e, otimizar estas condições para a obtenção de uma máxima concentração desse produto.

# **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Aromas**

#### **2.1.1. Conceito**

Flavorizantes ou aromatizantes são substâncias químicas ou misturas acrescentadas a um alimento ou medicamento para suplementar ou modificar o “flavor” próprio ou mascarar o original (Simão, 1986).

De acordo com legislação brasileira ( Decreto-Lei Federal nº 986 de 21 de outubro de 1969:

Aditivo Intencional é toda substância ou mistura de substâncias dotadas ou não de valor nutritivo, adicionada ao alimento com a finalidade de impedir alterações, manter, conferir ou intensificar seu aroma, cor e sabor, modificar ou manter seu estado físico geral ou exercer qualquer ação exigida para uma boa tecnologia de fabricação do alimento.

#### **2.1.2. Considerações gerais sobre aromas**

O consumo de alimentos e bebidas está intimamente associado ao estímulo das sensações químicas humanas: odor e sabor. A sensação de odor é despertada pelas misturas altamente complexas de pequenas e hidrofóbicas moléculas de muitas classes químicas. Ocorrendo em traços de concentrações, estas moléculas, são detectadas pelas células receptoras do epitélio olfativo, localizado no interior da cavidade nasal. Os mensageiros químicos não voláteis do paladar interagem com os receptores localizados na língua e conferem somente quatro sensações básicas: doce, salgado, amargo e ácido. Também percebidos dentro da cavidade oral, mas transmitidos para o cérebro por neurônios não específicos, estão as impressões quente, frio e pungência (Berger, 1995).

A primeira identificação de compostos voláteis nos alimentos compreendia umas poucas centenas de constituintes. Mas, com o advento da análise instrumental moderna, particularmente a cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa, o número de compostos identificados explodiu, e a listagem corrente contém mais de 6200 registros de aproximadamente 400 diferentes fontes alimentares. A sensibilidade da espectroscopia clássica (ressonância magnética nuclear de alta resolução) aumentou durante os últimos anos e contribuiu, assim, para a caracterização estrutural de componentes de aromas. Apesar destas realizações, a descoberta de novos aromas está se tornando cada vez mais difícil. Extrapolando o número de precursores de aroma, desde resultados industriais confidenciais, até pesquisas recentemente publicadas, foi estimado que até 10.000 voláteis podem estar presentes nos alimentos. Encontrou-se uma maior complexidade de compostos em produtos que, depois de uma liberação fermentativa de precursores de aromas, receberam tratamentos térmicos ou outros tecnológicos adicionais: mais de 500 voláteis foram relatados no café, vinho, cerveja, rum, chá preto e cacau (Berger, 1995).

O interesse de muitos pesquisadores substituiu a determinação de componentes isolados, pela investigação de misturas de compostos formadores de aroma em um produto. A importância sensorial expressa através de unidades de odor (valor de aroma), depende da concentração ativa do odor identificado e seu respectivo limiar de detecção, o qual é determinado experimentalmente, de preferência na matriz do alimento. O ponto fraco deste conceito é a impossibilidade de prever a interação das moléculas de aromas entre si e com os outros componentes do alimento. Uma solução parcial para o problema é a associação cromatografia gasosa e olfatométrica (CG-O), também chamada “sniffing-gas chromatography”. Diluições sucessivas de extratos de aromas são submetidas à separação por cromatografia gasosa, os

componentes separados são identificados físico-quimicamente sendo que, em paralelo à coluna de separação, um fluxo é detectado por provadores humanos (Berger, 1995).

O valor dos aromas e fragrâncias é altamente dependente de suas qualidades sensoriais e pureza. Os processos biotecnológicos têm como vantagem a capacidade de gerar reações altamente estereoseletivas, já que a percepção de aromas e fragrâncias é baseada nas propriedades esteroquímicas das moléculas. Moléculas de aromas, e especialmente de fragrâncias, podem ser detectadas pelo nariz ou pela boca em concentrações muito pequenas, sendo utilizados em produtos a níveis muito baixos. Entretanto, como os limiares de detecção podem variar entre  $10^6$  e  $10^7$ , de molécula para molécula, os aromas e fragrâncias são utilizados em concentrações totalmente diferentes, o que resulta na necessidade de produção em escalas variando desde poucos quilogramas a várias toneladas por ano. As moléculas comumente utilizadas como aromas e fragrâncias são quimicamente muito diferentes, mas são geralmente pequenas, com pesos moleculares menores que 300, pois deverão ser voláteis para exercer seus efeitos. Qualquer modificação na estrutura química pode resultar em variações muito grandes nas propriedades sensoriais, em termos de intensidade, qualidade e limiar de detecção. Moléculas com a mesma funcionalidade básica, por exemplo, aldeídos e cetonas, podem ter, freqüentemente, características sensoriais muito diferentes. Aromas e fragrâncias são compostos por uma mistura complexa de diferentes moléculas. Geralmente, uma alta qualidade destes é devida a efeitos combinados de um grande número de moléculas diferentes, cada uma com diferentes características no sabor e odor (Cheetham, 1993).



### 2.1.3. O mercado de aromas

A indústria original de aromas e fragrâncias foi influenciada por quatro principais áreas tecnológicas: primeira, a extração de aromas e óleos essenciais de plantas e, em menor escala, de fontes animais. Segundo, a química, que tem representado um papel importante na identificação de algumas moléculas de propriedades sensoriais, e também no desenvolvimento de processos eficientes, baseados na síntese orgânica utilizando derivados petroquímicos como matéria-prima. Terceiro, alimentos fermentados tradicionais, como cerveja, vinho, vinagre, pão, queijo e iogurte, que incentivaram pesquisas biotecnológicas e agora são beneficiadas pelos avanços na engenharia de bioprocessos. E, finalmente, o progresso que propiciou um aumento no conhecimento científico das reações que ocorrem durante o cozimento e o processamento dos alimentos (Cheetham, 1993).

A síntese biotecnológica de compostos de aromas vem crescendo consideravelmente na indústria de alimentos. Isto é resultado, entre outras coisas, dos avanços científicos em processos biológicos, fazendo uso de microrganismos ou enzimas como alternativa às sínteses químicas, combinado aos recentes desenvolvimentos de técnicas analíticas como HPLC, CG e espectrometria de massa. O aumento das pesquisas à procura de novos produtos e bioprocessos também deve-se ao desenvolvimento de um mercado consumidor que procura ingredientes alimentares não-tóxicos ou naturais (Christen & Munguia, 1994).

Por outro lado, a indústria alimentícia vem sendo fortemente influenciada pelo aumento do conhecimento dos consumidores sobre as características nutricionais e os insumos de sua dieta, bem como dos aditivos empregados nos produtos industrializados. Isso pode ser observado não só pelo aumento do número de produtos

com baixo índice de gordura, sódio, cafeína e colesterol, como também pela troca da sacarina pelo aspartame e pela busca de corantes, antioxidantes e preservativos naturais.

Devido à complexidade de muitos aromas naturais, tanto em relação à composição, como estrutura química individual, a aplicação de métodos biotecnológicos na produção destes compostos vem atraindo muita atenção desde a última década.

Aromas produzidos biotecnologicamente podem ser caracterizados como “naturais” ou “idênticos aos naturais” e, portanto, são preferidos pelo consumidor. A presença de aromas adiciona valor ao produto, o que significa que o custo do bioprocessamento passa a ser menos significativo no custo do produto final.

Durante os últimos 15 anos, os processos biotecnológicos vêm se estabelecendo nas indústrias para produção de aromas naturais. As leis de regulamentação de aditivos para alimentos de muitos países reconhecem o fato que aromas e constituintes de aromas naturais possam ser obtidos biotecnologicamente (Figura 2.1). Contudo, algumas condições devem ser garantidas para se assegurar que o produto final seja natural. Estas condições estipulam que a matéria-prima ou substrato sejam naturais e, somente processos físicos sejam empregados no isolamento e purificação dos produtos formados. (Gatfield *et al*, 1995)

⇒ <b>Extração:</b>	animal (bovinos, aves, peixes, etc.) vegetal (cogumelos, ervas, etc.)
⇒ <b>Destilação:</b>	citrus, pimentas, mentas, etc.
⇒ <b>Concentração:</b>	extratos, sucos de frutas, etc.
⇒ <b>Biotecnologia:</b>	fermentação (ácidos, álcoois, ésteres, etc.) modificações enzimáticas (queijos, sopas, etc.)

**Figura 2.1 – Processos para obtenção de aromas naturais (Gatfield *et al*, 1995).**

É possível obter uma escala de produção tanto para misturas complexas como para componentes individuais de aromas, via fermentação microbiana e tecnologia enzimática. Muitas classes diferentes de componentes de aromas podem ser obtidas por estas vias, incluindo ácidos, ésteres, álcoois, aldeídos e cetonas, todos caracterizados por sua alta volatilidade (Christen & Rimbault, 1991; Gatfield *et al*, 1995).

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

Em 1996, o mercado mundial de aromas e fragrâncias, incluindo vendas de componentes de aromas e fragrâncias e óleos essenciais, foi estimado em 10 bilhões de dólares a uma taxa média de crescimento anual de 7,5% desde 1992. O setor de aromas ocupa uma fatia de 39% do total deste montante. Para 1999 é projetado um crescimento anual de 3,5 a 4%, quando espera-se que o consumo de aromas e fragrâncias exceda 11 bilhões de dólares. Os Estados Unidos e a União Européia, juntos, são responsáveis por aproximadamente 70% do consumo de todos os aromas químicos. (Somogyi *et al*, 1996, 1998).

Os produtos da química fina importados pelo Brasil representam, anualmente, um montante de 2 bilhões de dólares. Deste montante, o setor de aditivos para alimentos e cosméticos deve representar aproximadamente 100 milhões de dólares anuais, indicando sua importância econômica ( Vitolo, 1994).

## 2.2. Biotecnologia na produção de aromas

A biotecnologia tem sido utilizada pelo homem na produção de alimentos por milhares de anos (Figura 2.2). O benefício original deste método de preparo dos alimentos foi um considerável aumento na vida útil de alguns produtos. A razão pela qual este modo tradicional ainda vem sendo utilizado é devida às modificações sensoriais positivas provocadas pelas enzimas e microrganismos (Gatfield *et al*, 1995).

<b>QUEIJO</b>	bactérias, fungos	Camembert: <i>Pen. camemberti</i> Roquefort: <i>Pen. roqueforti</i> Emmentale: bacteria <i>Propioni</i>
<b>IOGURTE</b>	bactérias	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>
<b>PÃO</b>	leveduras	<i>Sacharomyces cerevisae</i>
<b>CARNE</b>	enzimas	proteases
<b>VINHO, CERVEJA</b>	leveduras	<i>Sacharomyces cerevisae</i>
<b>VEGETAIS</b>	bacterias, leveduras	pepinos <i>Lactobacillus</i> azeitonas <i>Sacharomyces</i>
<b>CHÁS, CACAU</b>	enzimas, microrganismos	
<b>MOLHO DE SOJA</b>	fungos	<i>Aspergillus oryzae</i>

Figura 2.2 – Produtos alimentícios naturais produzidos biotecnologicamente (Gatfield *et al*, 1995)

Biotransformações vêm sendo crescentemente empregadas na manufatura de substâncias químicas específicas, especialmente aromas e fragrâncias. Avanços nesta tecnologia, conduziram ao desenvolvimento de um número crescente de novidades científicas e de processos eficientes para a fabricação de moléculas de alta atividade biológica. Tais processos vêm exigindo pesquisas multidisciplinares no seu desenvolvimento (Cheetham, 1993).

A síntese de componentes de aromas, via processos biotecnológicos, atualmente vem ocupando um importante papel na indústria de alimentos (Fabre *et al.*, 1995). Além disso, o considerável interesse dedicado pelos grupos de pesquisas acadêmicas e industriais nesta área indicam a importância desta tecnologia para desenvolvimentos futuros de aromas naturais (Gatfield *et al.*, 1995).

De uma forma geral, são duas as formas de produzir aromas por vias biotecnológicas. A via mais utilizada pelos sistemas tradicionais consiste na síntese de substâncias aromáticas por bioprodução. Esta se dá por via fermentativa, onde a cultura microbiana pode ser melhorada pela otimização das condições de cultivo (Fabre, 1996). Outro processo que envolve reações múltiplas é a bioconversão, onde a partir de sistemas enzimáticos é possível ampliar, degradar ou modificar o substrato, deste modo acrescentando ou substituindo a síntese química (Berger, 1995).

### **2.3. Microrganismos produtores de aromas**

A tecnologia existente para a produção de aromas é baseada principalmente em materiais de plantas onde as flutuações sazonais são uma desvantagem. Por outro lado, a síntese química, geralmente carece de estereoseletividade. Por essas razões os microrganismos são uma fonte em potencial de essências naturais (Pastore, 1994).

Dentre os microrganismos produtores de aromas estão as bactérias, as leveduras e os fungos filamentosos.

A classe de fungos mais estudada para a produção de aromas são os basidiomicetos. As bactérias e leveduras apresentam vantagens consideráveis em relação aos fungos filamentosos, devido à sua fácil tecnologia, conhecimento biológico e às diversas modificações genéticas realizadas nestes microrganismos (Fabre, 1995).

Sob condições mais amenas que as utilizadas na síntese química, muitas leveduras produzem aromas intensos, como os compostos voláteis reportados a partir de cepas de *Tyromyces sambuceus*, *Ceratocystis* sp., *Yarrowia lipolytica*, *Kloeckera satarnus*, *Hansenula anomala*, *Pichia pastoris*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Geotrichum* sp. e *Kluyveromyces lactis* ( Fabré, 1995).

A acetoína, objeto deste estudo, é produzida na fermentação do vinho por leveduras (Romano & Suzzi, 1996).

As leveduras do vinho foram subdivididas por Antonioni (1951) em leveduras ativamente fermentativas, produzindo somente 2,3-butanodiol, moderadamente fermentativas, produzindo 2,3-butanodiol e acetoína e fracamente fermentativas, produzindo somente acetoína (Romano & Suzzi, 1996).

Um estudo biométrico de 96 cepas de *Kloeckera apiculata* e *Hanseniaspora guilliermondii*, realizado por Romano *et al.* (1993), para verificar a capacidade de produção de acetoína destas leveduras em meio sintético e mosto, verificou que altos níveis deste componente são uma característica destas espécies, confirmando estudos anteriores realizados por Antonioni & Gugnoni (citado por Romano & Suzzi, 1996) os quais determinaram que as leveduras apiculadas são normalmente produtoras de altas concentrações de acetoína ( em torno de 200 mg/l).

Moritz (1998) estudando o crescimento de leveduras produtoras de aromas em meio complexo, verificou que *Hanseniaspora guilliermondii* apresentou os maiores níveis em acetoína (334 mg/l) contra 277mg/l produzidos por *Kloeckera apiculata*.

Deiana *et al.* (1990), estudando a capacidade de produção de acetoína e diacetil por *Debaromyces hansenii* verificou níveis em acetoína em torno de 100 mg/l a partir de concentrações iniciais de 2% em glicose.

A acetoína também pode ser produzida por bactérias do ácido láctico, bem como espécies de *Micrococcaceae*, *Enterobacteriaceae* e *Propionibacterium* com um interesse em particular na produção de queijos ( citados por Deiana *et al.*, 1990).

De acordo com Boumerdassi *et al.* (1997), na presença de altas concentrações de citrato e oxigênio dissolvido, *Lactococcus lactis*, produz concentrações em acetoína em torno de 8,5 mM.

Rezanka *et al.* (1994) estudando a produção de compostos voláteis em culturas de *Streptomyces avermetilis*, detectou de 0,8 a 1,21% de acetoína entre 36 compostos identificados.

#### **2.4. *Hanseniaspora guilliermondii***

A espécie *H. guilliermondii* é também conhecida como o *Hanseniaspora melligeri* e *Hanseniaspora apuliensis*. Crescem em meio de glicose, extrato de levedura, água e peptona. Após dois dias de incubação à 25 °C, as células tornam-se apiculadas, de forma alongada ou oval, e tamanho entre (2,2 – 5,8)  $\mu\text{m}$  x (4,5 – 10,2)  $\mu\text{m}$ . Sua reprodução é por brotamento bipolar (Smith, 1984).

Bioquímica, morfológica e nutricionalmente, as espécies de *Hanseniaspora* e o gênero imperfeito *Kloeckera* têm sido reportadas como um grupo. *H. guilliermondii* é a forma perfeita da *K. apis*, sendo que a *K. apiculata* é o estado imperfeito da *H. uvarum* (Miller *et al.*, 1958 citado por Romano *et al.*, 1993).

## 2.5. Acetoína

Acetoína ( $C_4H_8O_2$ ), também conhecida por acetil-metil-carbinol, é uma cetona (3-hidroxi-2-butanona) de odor agradável, peso molecular 88,10 e ponto de ebulição  $148^\circ C$ . É um aromatizante utilizado pela indústria alimentícia, na produção de alimentos lácteos e bebidas. Juntamente com o diacetil, é responsável por parte do aroma de uma vasta gama de produtos lácteos, principalmente queijos e manteiga. Também funcionam como potencializadores de outros aromas, como o de vinagre e café (Merck & Co.,1983; Hughes, 1994).

Acetoína é um produto comum em fermentações alcoólicas, e um componente muito importante no vinho, pois está intimamente ligada ao seu “bouquet”, sendo também um componente chave na biossíntese do 2,3-butanodiol e diacetil. Estes três compostos estão correlacionados, representando três níveis de oxidação. Os microrganismos produzem quantidades bem maiores de acetoína do que diacetil (Collins, 1972).

Nem acetoína, nem 2,3-butanodiol são odores fortes. De fato, seus limiares de detecção no vinho são muito altos, em torno de 150mg/l. Entretanto o diacetil, o qual gera um odor ruim em bebidas alcoólicas, possui um odor característico e detectável em níveis muito baixos (limiares de detecção em torno de 8mg/l) (Dubois, 1994).

A acetoína é formada durante a fermentação pela atividade microbiana de bactérias lácticas e leveduras, mas existem poucos estudos que relatem a quantidade produzida por espécies individuais durante a fermentação do vinho (Romano e Suzzi, 1996). A Tabela 2.1 descreve as quantidades de acetoína produzidas no vinho por diferentes espécies de leveduras de relatadas por diversos autores.



**Tabela 2.1 – Acetoína produzida no vinho por diferentes espécies de leveduras**

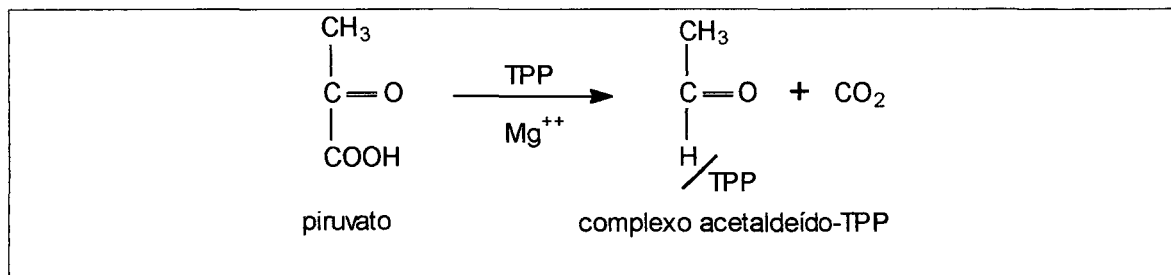
Espécie	n° de cepas	Faixa (mg/l)	média (mg/l)	Referência
<i>Saccharomyces cerevisae</i>	1	0-0	0	Antoniani et al.(1941)
	10	26,3-76,2	56,4	Rosini et al.(1992)
	100	0,1-194,6	8,5	Romano et al.(1993)
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	10	0,0-21,9	5,5	Rosini et al.(1992)
<i>Kloeckera apiculata</i>	2	90-220		Antoniani et al.(1941)
	10	68,6-225,0	138,1	Rosini et al.(1992)
	48	55,8-187,4	290,6	Romano et al.(1993)
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	48	50,3-258,1	168,3	Romano et al.(1993)
<i>Hanseniaspora valbyensis</i>	10	22,9-408,7	144,9	Rosini et al.(1992)
<i>Candida stellata</i>	10	34,9-254,1	94,9	Rosini et al.(1992)
<i>Zigosaccharomyces bailii</i>	35	17,1-34,4	24,8	Romano et al.(1993)
<i>Zigosaccharomyces fermentati</i>	35	0,0-0,0	0,0	Romano et al.(1993)
<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	10	211,7-478,3	310,2	Rosini et al.(1992)
	20	55,5-362,7	154,0	Romano et al.(1996)

\*Fonte: Romano e Suzzi (1996)

### 2.5.1. Biossíntese da acetoína

A presença de compostos carbonílicos, como diacetil e acetoína, em produtos fermentados, foi por muito tempo atribuída unicamente à ação bacteriana. Entretanto, entre os anos de 1950 e 1960, tornou-se claro que as leveduras também produzem acetoína e diacetil. Não obstante, os mecanismos de produção permaneceram em controvérsia por um longo tempo até os estudos de Collins (1972) e Wainwright (1973) que revelaram a biossíntese da acetoína por leveduras.

De acordo com Collins (1972) a reação chave na utilização do piruvato, proveniente de glicólise, é a descarboxilação do piruvato à hidroxietiltiamina pirofosfato, chamado de complexo acetaldeído-TPP. A descarboxilação do piruvato requer tiamina pirofosfato e um metal bivalente (Figura 2.3).



**Figura 2.3 – Formação de hidroxietiltiamina pirofosfato a partir do piruvato**

Existem dois mecanismos através dos quais os microrganismos utilizam hidroxietiltiamina pirofosfato (complexo C<sub>2</sub>) na formação de acetoína. Bactérias, exceto *Escherichia coli*, utilizam o mecanismo descrito pela figura 2.4 a. O complexo C<sub>2</sub> reage com outra molécula de piruvato para formar ácido α-acetoláctico, e o C é , então descarboxilado para formar acetoína. Na presença de NAD reduzida e da enzima redutase, acetoína pode ser reduzida a 2,3-butilenoglicol, com simultânea reoxidação da NAD.

Leveduras e *E. coli* utilizam o mecanismo descrito pela figura 2.4b. O complexo C<sub>2</sub> reage com o acetaldeído livre para formar acetoína diretamente, sem a formação intermediária do α-acetolactato.

Collins (1972) relata que leveduras produzem α-acetolactato, mas elas não possuem α-acetolactato descarboxilase e não podem formar acetoína a partir do α-acetolactato que elas produzem. De acordo com Chuang & Collins (1968), aparentemente as leveduras utilizam o α-acetolactato que elas produzem exclusivamente para formar produtos importantes ao seu metabolismo, como valina e ácido pantotênico.

Ao contrário do que foi anteriormente suposto, Haukeli & Lie (1972) verificaram que leveduras também podem descarboxilar o α-acetolactato à acetoína pelo mecanismo normalmente utilizado por bactérias. Em ensaios radioativos, Deiana *et*

al. (1990) descobriram que algumas cepas de *Debaromyces hansenii* produziram acetoina a partir da glicose e ácido láctico através da descarboxilação do  $\alpha$ -acetolactato.

A quantidade de acetoina produzida foi afetada pela cepa, substrato e tempo de incubação.

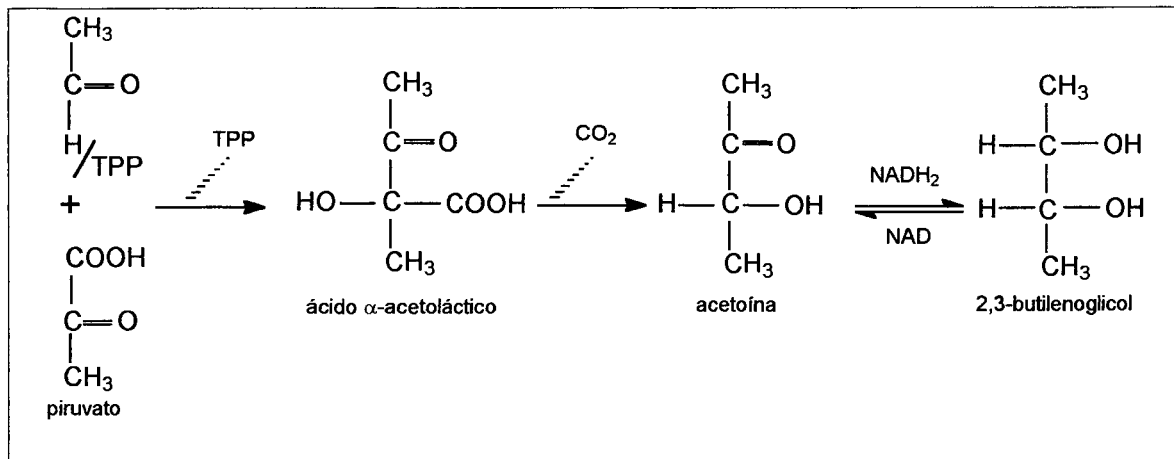


Figura 2.4a – Mecanismos de formação de acetoina a partir de hidroxiletiamina pirofosfato

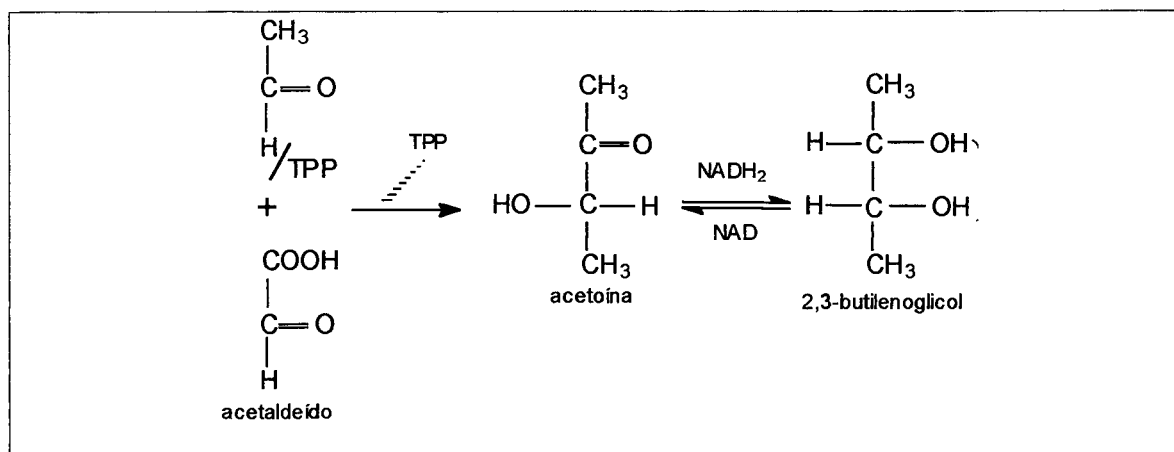
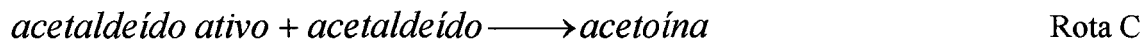
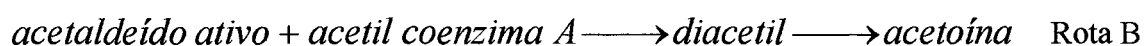
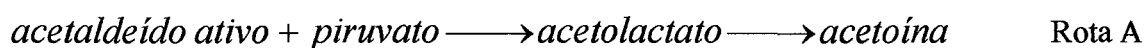


Figura 2.4b – Mecanismos de formação de acetoina a partir de hidroxiletiamina pirofosfato

### 2.5.2. Biossíntese da acetoína por leveduras

Nas leveduras do vinho, a acetoína é um importante subproduto do metabolismo de carboidratos, o qual ocorre somente na presença de carboidratos fermentescíveis ou de ácido pirúvico, necessário ao metabolismo dos microrganismos, particularmente para a síntese de material celular. Leveduras formam piruvato a partir da glicose via glicólise, o qual é sua descarboxilado à hidroxietiltiamina PP<sub>1</sub> (TPP) (Romano e Suzzi, 1996).

Dependendo do substrato com o qual o acetaldeído ativo reage, as seguintes vias podem ser derivadas:



#### Rota metabólica A

A síntese começa com o piruvato, o qual é derivado da degradação de carboidratos. O acetaldeído ativo e o piruvato são, então transformados em  $\alpha$ -acetolactato pela ação da enzima ácido acetohidroxi sintetase.

Leveduras pertencentes ao gênero *Sacharomyces* produzem  $\alpha$ -acetolactato em concentrações consideráveis durante a fermentação, e este componente altamente lábil poderá ser convertido facilmente à diacetil ou acetoína, particularmente na presença de oxigênio (Haukeli & Lie, 1972).

Com tratamento térmico sob condições estritamente anaeróbicas, o ácido  $\alpha$ -acetoláctico pode ser diretamente convertido, por via não enzimática, à uma taxa de aproximadamente  $0,05\% \cdot h^{-1}$ , formando principalmente acetoína e algum diacetil ( De

Man, 1959, citado por Romano e Suzzi, 1996). Um máximo de 80% de conversão em acetoína foi obtido a partir de 30 minutos de tratamento térmico a 70°C em condições anaeróbicas (oxigênio dissolvido em concentrações inferiores a 0,1mg/l) (Inoue *et al.*, 1991). Entretanto, o ácido  $\alpha$ -acetoláctico microbiano é descarboxilado à acetoína somente na presença da enzima ácido  $\alpha$ -acetoláctico descarboxilase. Uma explicação para esta observação é que o ácido  $\alpha$ -acetoláctico produzido por microrganismos não está livre, mas completamente rodeado por enzimas, não podendo ser convertido por uma decomposição espontânea (Romano e Suzzi, 1996).

O  $\alpha$ -acetolactato pode ser degradado não enzimaticamente a diacetil através da descarboxilação oxidativa, e sua decomposição depende das propriedades químicas e físicas das bebidas alcoólicas. A conversão do ácido  $\alpha$ -acetoláctico a diacetil é quantitativa quando soluções aquecidas de  $\alpha$ -acetolactato são agitadas com ar (Wainwright, 1974 citado por Romano e Suzzi, 1996). A evidência é que o diacetil é formado a partir do ácido  $\alpha$ -acetoláctico como um subproduto da biossíntese do ácido  $\alpha$ -oxo-isovalérico, um composto intermediário na biossíntese da valina, leucina e ácido pantotênico.

Finalmente, a conversão do ácido  $\alpha$ -acetoláctico a diacetil, geralmente ocorre de um modo não enzimático fora da célula da levedura, e estudos mais avançados são necessários para provar que as enzimas das leveduras ou células intactas catalisem esta transformação.

## Rota Metabólica B

Uma outra rota de biossíntese da acetoína em leveduras é a condensação do acetaldeído ativo com a acetil coenzima A para formar diacetil (Collins, 1972), o qual é sucessivamente reduzido à acetoína. Embora elas produzam uma grande quantidade de acetoína (Collins, 1972), algumas cepas de *S. cerevisiae* não são aptas a produzir diacetil devido à ineficiência da diacetil sintetase, a enzima necessária para a reação da acetil coenzima A com o acetaldeído ativo. A aeração das culturas aumenta a produção de diacetil.

Uma vez que as leveduras tenham formado diacetil por este mecanismo, elas podem, por meio da diacetil redutase (Seitz *et al.*, 1963 citado por Romano e Suzzi, 1996), reduzir o diacetil à acetoína, e muitas delas podem reduzir acetoína a 2,3-butanodiol (Juni, 1952, citado por Romano e Suzzi, 1996). A diacetil redutase catalisa a redução do diacetil à acetoína com NADH como um doador de elétrons mas falha para catalisar a reação inversa (Schwarz *et al.*, 1994). A redução do diacetil pela enzima é irreversível. O 2,3-butanodiol é oxidado à acetoína com  $\text{NAD}^+$ , demonstrando que a redução da acetoína é uma reação reversível.

A diacetil redutase é mais ativa no diacetil a pH 7,0, considerando que esta não é ativa a baixos valores de pH, conseqüentemente, há uma menor conversão de diacetil à acetoína quando o pH da cultura é baixo. A enzima é mais ativa a 40°C em *Kluyveromyces marxianus* (Schwarz *et al.*, 1994) e *S. carlsbergensis* (Legeay *et al.*, 1989). A atividade da diacetil redutase foi detectada em *S. cerevisiae* (Heidlas *et al.*, 1990), *S. carlsbergensis* (Legeay *et al.*, 1989) e *Candida utilis* (Verduyn *et al.*, 1988).

A atividade metabólica das leveduras reduz rapidamente o diacetil à acetoína e então a 2,3-butanodiol, e este metabolismo rápido explica a ausência de quantidades apreciáveis de diacetil durante a fase ativa da fermentação. Quanto mais

leveduras estiverem presentes, mais rapidamente o diacetil é reduzido, então altas razões de inóculo favorecem a redução do diacetil. A redução do diacetil à acetoína é mais rápida a temperaturas maiores e quando a levedura é uniformemente suspensa no meio (Geiger e Piendl, 1975, citado por Romano e Suzzi, 1996).

### **Rota Metabólica C**

As leveduras também formam acetoína por um mecanismo diferente daqueles observados nas bactérias: pela condensação do acetaldeído ativo (complexo acetaldeído-TPP) com o acetaldeído livre formado a partir do piruvato (Juni, 1972 citado por Romano e Suzzi, 1996), sem formação intermediária do  $\alpha$ -acetolactato. A produção de acetoína pelas células extraídas de leveduras é estimulada pela adição de acetaldeído, o que indica que as leveduras formam acetoína pela condensação do acetaldeído livre com o complexo acetaldeído-TPP. Este mecanismo descrito por Collins (1972), confirma que a acetoína não pode ser oxidada a diacetil, ao contrário de relatos anteriores.

A formação de acetoína depende da razão  $\text{NAD}^+ / (\text{NADH} + \text{H}^+)$  e da concentração intracelular de ácido pirúvico (Dittrich e Eschenbruch, 1968 citado por Romano e Suzzi, 1996).

A Figura 2.5 apresenta o resumo das reações que são atualmente conhecidas de acordo com Romano e Suzzi (1996).

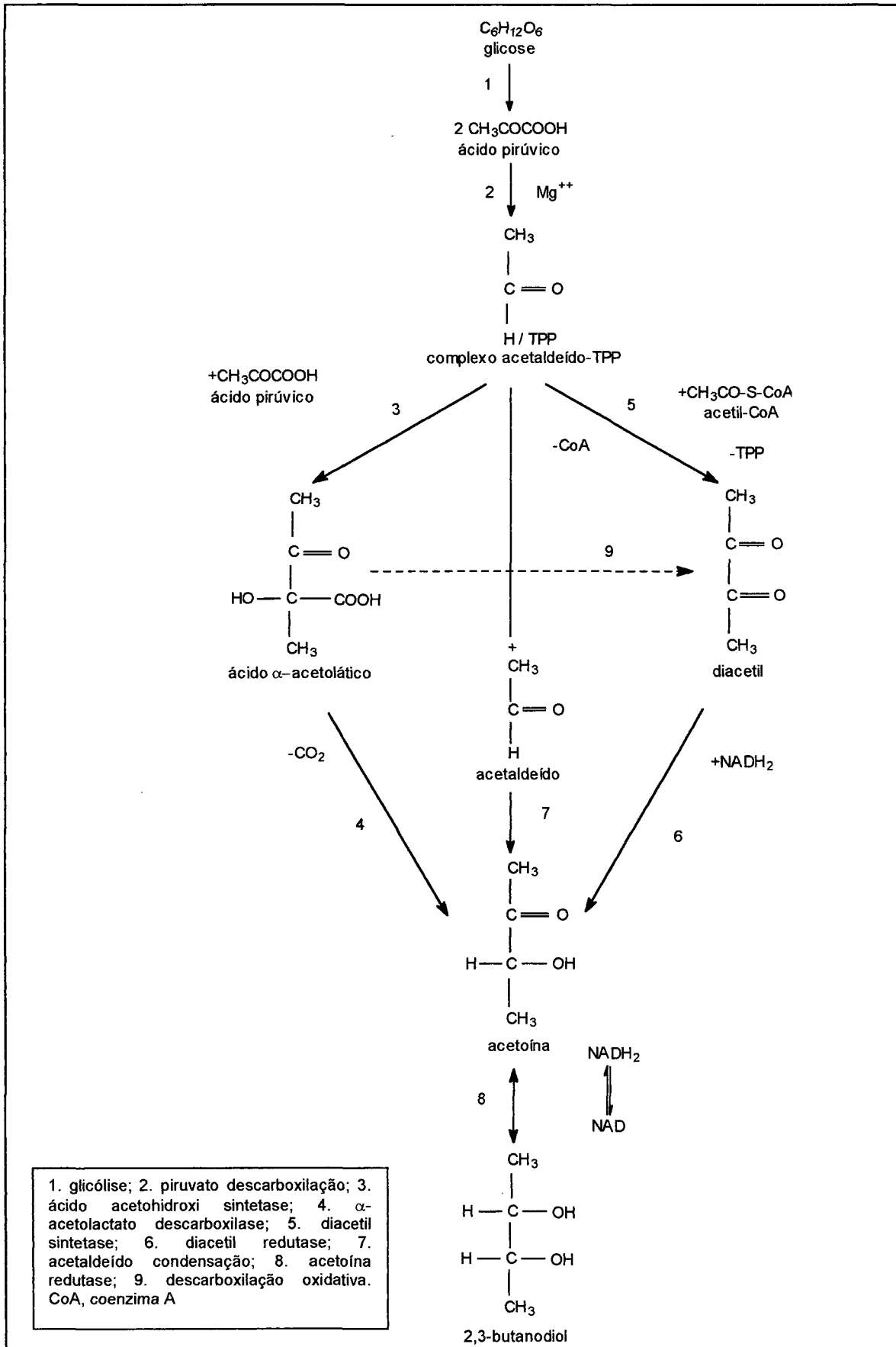


Figura 2.5 – Esquema da biossíntese da acetoína por leveduras



### 2.5.3. Fatores que afetam a produção de acetoína

De acordo com Fabre *et al.* (1995), vários estudos têm revelado que a produção de compostos voláteis por microrganismos é dependente da composição do meio e das condições de cultura.

A produção de acetoína é dependente da temperatura. Quando a temperatura aumenta, a velocidade de decomposição do  $\alpha$ -acetolactato no meio de fermentação também aumenta, e mais diacetil e acetoína são produzidos. Fermentação à temperatura de 30°C, em comparação com 12, 18 e 24°C, aumenta sensivelmente a quantidade de acetoína produzida por *S. cerevisiae* no vinho (Romano e Suzzi, 1992). Mais acetohidroxi ácidos são formados quando a temperatura de fermentação é elevada (Inoue, 1974 citado por Romano e Suzzi, 1996), sugerindo uma rota preferencial de produção de acetoína a partir do acetolactato (Romano e Suzzi, 1996). A redução do diacetil à acetoína é mais rápida a temperaturas maiores e quando a levedura é uniformemente suspensa no meio (Geiger e Piendl, 1975, citado por Romano e Suzzi, 1996). A enzima diacetil redutase é mais ativa a 40°C em *Kluyveromyces marxianus* (Schwarz *et al.*, 1994) e *S. carlsbergensis* (Legeay *et al.*, 1989).

Acetoína é detectada em quantidades maiores em fermentações por leveduras em meios altamente aerados (Crowell e Guymon, 1963 citado por Romano e Suzzi, 1996). Leveduras pertencentes ao gênero *Sacharomyces* produzem  $\alpha$ -acetolactato em concentrações consideráveis durante a fermentação, que poderá ser convertido facilmente à diacetil ou acetoína, particularmente na presença de oxigênio (Haukeli & Lie, 1972). Um meio pobre em oxigênio (0,2 mg/l de O<sub>2</sub>) leva à formação mais rápida de  $\alpha$ -acetolactato, sendo que níveis máximos deste composto são obtidos em meio altamente aerado (17,4 mg/l de O<sub>2</sub>). Aerações normais proporcionam níveis menores. A formação de  $\alpha$ -acetolactato, dependente de oxigênio, está intimamente

relacionada à utilização de carboidratos, aminoácidos treonina e lisina, e cátions de ferro e potássio presentes no meio.

De Mas *et al.* (1988), estudando a produção de 2,3-butanodiol por cepas de *Bacillus polymixa*, verificaram que a produção de qualquer metabólito foi dependente da taxa de disponibilidade relativa de oxigênio na cultura. À uma alta taxa de aeração (acima de 50 mmoles  $O_2 \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$ ), foram detectados maiores rendimentos em acetoína e acetato. Em uma disponibilidade intermediária de oxigênio o rendimento de 2,3-butanodiol foi máximo.

Bassit *et al.* (1993), estudando o efeito da concentração inicial de oxigênio na produção de diacetil e acetoína por *Lactococcus lactis*, verificou que concentrações máximas desses componentes foram encontradas em meio com 100% de saturação em  $O_2$ . Justificado pelo aumento da atividade da  $\alpha$ -acetolactato sintetase na presença de oxigênio.

O volume do meio de cultura apresentou importante influência na produção de 2,3-butanodiol, etanol, acetoína e acetato em estudos realizados em frascos agitados por Nakashimada *et al.* (1998). Quando este aumenta, a taxa de transferência de oxigênio diminui e, a produção de etanol e 2,3-butanodiol aumentam com o decréscimo da produção de acetoína e acetato.

O pH é um importante parâmetro na regulação do metabolismo microbiano. Condições alcalinas favorecem a produção de ácidos orgânicos, ao passo que a formação de acetoína e 2,3-butanodiol é privilegiada em valores de pH ligeiramente ácidos ( Jansen, 1983). Romano *et al.* (1993) observaram que a produção de acetoína em mosto de uva por *H. guilliermondii* e *K. apiculata* foi cerca de cinco vezes maior que as produzidas em meio complexo formulado. Parte deste efeito pôde ser atribuído ao pH do mosto, em torno de 2,85, contra 5,5 do meio formulado. A diacetil redutase é mais ativa a pH 7,0, considerando que esta não é ativa a baixos

valores de pH, há uma menor conversão de diacetil à acetoína quando o pH da cultura é baixo (Romano e Suzzi, 1996).

Normalmente, pequenas quantidades de diacetil são acumuladas por bactérias quando o pH cai abaixo de 5,5. Isto ocorre porque a enzima citrato permease é muito mais ativa a baixos valores de pH (Harvey, 1962 citado por Collins, 1972). Citrato permease é requerida para o transporte ativo de citrato dentro das células de *Streptococcus diacetilactis*, *Lactococcus citrovorum*, e algumas outras bactérias. Outro fator importante é que a diacetil redutase, enzima envolvida na conversão de diacetil à acetoína, não é muito ativa em pH baixo (Sandine, 1965 citado por Collins, 1972). Entretanto, pouco se sabe sobre o pH interno da célula, e uma suposição que se faz é que este decresce com o pH do meio. Porém, se isto ocorre, a diacetil redutase presente torna-se menos ativa, ocorrendo uma menor conversão de diacetil à compostos menos ativos quando o pH da cultura é baixo. Também, é importante salientar que a maioria das bactérias crescem mais lentamente em pH baixo. Isto resulta em uma maior disponibilidade de piruvato para ser utilizado na produção de diacetil e acetoína, porque quando crescem lentamente, as células requerem menores quantidades de piruvato para síntese de material celular. As taxas de entrada e metabolismo do citrato não estão relacionadas ao crescimento (Harvey, 1963, citado por Collins, 1972) e, a utilização de citrato, de fato, aumenta a baixos valores de pH, quando a taxa de crescimento é pequena (Collins, 1972).

Cachon e Diviés (1993) propuseram um modelo de utilização de citrato por *Lactococcus lactis* e observaram que a bioconversão de citrato em diacetil e acetoína foi máxima em pH de 5,5. Quando o ácido cítrico entra na célula a molécula é quebrada em acetato, acumulado no meio de cultura, e oxaloacetato que será descarboxilado a piruvato. A produção de moléculas C4 (diacetil, acetoína e 2,3-

butilenoglicol) somente é observada quando altas concentrações de piruvato são acumuladas, o que ocorre durante a fermentação de citrato em pH ácido.

A quantidade de diacetil sintetase nas células de *S. cerevisiae* é influenciada pela idade da cultura e pela composição do meio, especificamente a concentração de glicose (Collins, 1972). De acordo com Wickerham (1951) citado por Romano *et al.* (1993), esta deverá estar em torno de 50 g/l.

A atividade metabólica das leveduras reduz rapidamente o diacetil à acetoína. Uma quantidade elevada de inóculo favorece a produção de acetoína, pois quanto mais leveduras estiverem presentes no meio, mais rapidamente o diacetil é reduzido (Burger *et al.*, 1958 citado por Romano e Suzzi, 1996). Em estudos realizados em leveduras do vinho por Romano *et al.* (1997), foi utilizada uma concentração de inóculo de 5 g/l, já Haukeli e Lie (1972) estudando o comportamento cinético de algumas linhagens de leveduras do vinho utilizaram inóculo em concentrações de 2,5 g/l.

## 2.6. Acetato de etila

O acetato de etila ( $C_4H_8O_2$ ) é um éster de peso molecular 88,10 e ponto de ebulição 77°C. É um líquido incolor com aroma avinagrado, e sabor agridoce, parecido com o da uva. É utilizado pela indústria de alimentos em essências artificiais de frutas para bebidas alcoólicas, refrescos, pudins e sorvetes e, pela indústria química na fabricação de vernizes, filmes fotográficos, perfumes e outros (Merck & Co., 1983; Hughes, 1994).

### ➤ Fatores que afetam a produção de acetato de etila

A tensão de oxigênio é um fator que exerce importante influência no acúmulo de acetato de etila em *H. anomala* e outros microrganismos (Nordström, 1964, citado por Armstrong *et al.*, 1984). Para *Candida utilis*, a aeração também apresentou um efeito significativo na utilização de etanol e no acúmulo de acetato de etila. Aeração pobre resulta em baixa utilização de etanol e pequeno acúmulo do éster. Aumentos nos níveis de aeração resultaram em maiores velocidades de utilização de etanol e de acúmulo de acetato de etila. Entretanto, a níveis muito altos de aeração, o rendimento em éster decresce ( Armstrong *et al.*, 1984).

O pH tem demonstrado ser crítico na produção de acetato de etila por *H. anomala*, sendo determinados como níveis ótimos os valores entre 2,4 e 3,0 ( Tabachnick, 1953, citado por Armstrong *et al.*, 1984). Em níveis maiores de pH, o éster formado é hidrolisado por esterases (Nordström, 1964, citado por Armstrong *et al.*, 1984). Armstrong *et al.*(1984) estudando a produção de acetato de etila por *Candida utilis* a partir de soluções de etanol, utilizou três valores iniciais de pH (2,5; 4,5 e 7,0) e verificou que as maiores quantidades de acetato de etila foram produzidas a pH 7,0, com uma conversão quase 2 vezes maior que em pH de 2,5. Ótimos rendimentos foram demonstrados em valores de pH entre 5,0 e 7,0.

O efeito da concentração de etanol na conversão em acetato de etila por *C. utilis* foi estudado por Armstrong *et al.* (1984). Foram observadas conversões mais rápidas de etanol à acetato de etila quando a concentração do substrato era em torno de 10g/l, enquanto concentrações acima de 35g/l indicaram um forte efeito inibidor na produção do éster.

# **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

Neste capítulo serão descritas a metodologia utilizada para o delineamento do experimento, bem como o microrganismo, meios de cultura, equipamentos e métodos analíticos utilizados nos ensaios.

#### **3.1. Planejamento Experimental**

A otimização, que visa maximizar a economia global de um processo fermentativo, está relacionada principalmente à três critérios na indústria: maximização das concentrações dos produtos (biomassa, metabólitos); minimização do tempo de fermentação e do custo da operação (Deneuve, 1991).

O planejamento experimental, ou fatorial, é um conjunto de técnicas, freqüentemente utilizado em estudos de processos para investigações qualitativas ou quantitativas, explorando os efeitos e relações de variáveis de entrada (fatores) sobre as variáveis de saída (respostas). Este processo pode atingir diferentes áreas, como a engenharia química, biotecnologia, pesquisas da área agrícola, melhoria de processos industriais, bem como em processos que utilizam simulação computacional (Box et al, 1978).

Por meio de planejamentos experimentais, baseados em princípios estatísticos, podemos extrair do sistema em estudo o máximo de informações, fazendo um número mínimo de experimentos, permitindo a investigação do processo em uma faixa ampla de variação com redução de tempo e custos (Barros Neto *et al*, 1995).

No planejamento de um experimento é necessário, primeiramente, determinar quais são os fatores e as respostas de interesse para o sistema em estudo. Com isto, serão programados ensaios através de um planejamento fatorial, o qual

consiste em uma especificação detalhada das condições experimentais que devem ser realizadas. Deverão ser especificados os níveis (valores) em que cada fator é estudado.

Em geral, são realizadas investigações preliminares para que se tenha conhecimento de quais fatores influenciam a resposta, sendo usual para tanto, a utilização de um planejamento fatorial simples (Barros Neto *et al.*, 1995; Santos, 1998).

É importante salientar que, para uma adequada avaliação dos resultados obtidos, é necessário um conhecimento prévio do processo, aliado às ferramentas utilizadas no planejamento experimental (Navarro, 1996).

O planejamento fatorial em que todas as variáveis são estudadas em apenas dois níveis é o mais simples. Assim, havendo “k” fatores, isto é “k” variáveis controladas, serão necessários  $2^k$  ensaios para investigar todas as combinações possíveis dessas variáveis.

Para avaliar o erro experimental associado aos ensaios e ao experimentador, são realizadas duplicatas ou triplicatas nas condições experimentais intermediárias entre os dois níveis atribuídos a cada variável, que corresponde ao nível “0” ou ponto central (Barros Neto *et al.*, 1995; Santos, 1998).

De posse dos resultados do planejamento é possível calcular os efeitos principais e de interação dos fatores sobre as respostas, especificar os efeitos mais significativos e ajustar um modelo linear ou de primeira ordem, que correlaciona as variáveis de entrada e saída.

Caso ocorra uma falta de ajuste do modelo linear, pode-se complementar o planejamento fatorial inicial adicionando-se  $2k$  ensaios segundo a configuração “estrela”, para obter um modelo quadrático ou de segunda ordem (Santos, 1998).

A metodologia de superfície de resposta (RSM, de Response Surface Methodology) tem sido utilizada com grande sucesso na análise, modelagem e



otimização de diversos processos industriais. A modelagem, normalmente, é feita ajustando-se modelos lineares ou quadráticos a resultados experimentais a partir de planejamentos fatoriais (Barros Neto *et al*, 1995).

Para verificar a influência das variáveis de entrada sobre as respostas, foi realizado um planejamento experimental, onde têm-se um planejamento fatorial com dois níveis adicionado de outro realizado com configuração “estrela”, que utiliza a metodologia por análise de superfície de resposta para modelar e otimizar tal processo.

### 3.1.1. Planejamento Fatorial Completo + estrela

Neste estudo considerou-se que a produção via fermentativa de acetoína é afetada por três variáveis  $x_i$  independentes: concentração inicial de glicose ( $x_1$ ), temperatura ( $x_2$ ) e pH ( $x_3$ ) do meio. Como respostas foram obtidas as  $y_k$ , variáveis dependentes: concentração máxima em acetoína ( $y_1$ ), fator de conversão substrato em produto ( $y_2$ ) e produtividade em acetoína ( $y_3$ ).

Um planejamento fatorial com três fatores e dois níveis (-1 e +1) adicionado de seis ensaios distribuídos rotacionalmente (pontos axiais) a uma distância “ $\alpha$ ” da condição do ponto central foi desenvolvido. Foram realizados ainda, dois ensaios no ponto central, para a estimativa do erro experimental.

A distância “ $\alpha$ ” é definida pela Equação 3.1.

$$\alpha = \sqrt[4]{2^k} \quad (3.1)$$

onde  $k$  é o número de variáveis ou fatores.

Para este estudo  $k=3$  portanto,  $\alpha = 1,68$ , sendo então incluídos na matriz de planejamento os níveis  $-1,68$  e  $+1,68$ .

A determinação dos valores reais foi realizada fixando-se inicialmente os valores correspondentes aos níveis -1 e +1. A seguir, calculou-se o restante relacionando-se as respectivas distâncias entre os valores codificados.

Na Tabela 3.1 são apresentados os valores utilizados neste planejamento fatorial relativos aos níveis codificados (-1,68; -1; 0; +1; +1,68).

**Tabela 3.1 – Valores relativos aos códigos dos níveis para as variáveis independentes no planejamento fatorial em estrela**

Variáveis independentes	símbolo	Código do níveis				
		-1,68	-1	0	+1	+1,68
concentração inicial de glicose (g/l)	x <sub>1</sub>	17	30	49	68	81
temperatura (°C)	x <sub>2</sub>	24	26	30	34	36
pH	x <sub>3</sub>	4,0	4,4	5,0	5,6	6,0

O planejamento fatorial completo em estrela com ponto central, que totaliza dezesseis experimentos realizados em ordem aleatória é apresentado na Tabela 3.2.

É importante salientar que o número de experimentos e o número de condições experimentais são conceitos diferentes. Um determinado número de réplicas deve ser adicionado ao número de condições experimentais para fornecer o número de experimentos. As réplicas são de fundamental importância, pois servem para determinar o erro experimental (Santos, 1998).

**Tabela 3.2 – Ensaio realizado no planejamento fatorial completo  $2^3 +$  estrela**

ensaio	$x_1$	$x_2$	$x_3$
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	-1,68	0	0
10	+1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	+1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	+1,68
15	0	0	0
16	0	0	0

O ajuste matemático aos resultados deste planejamento experimental foi realizado através de um modelo quadrático com interações, que segue a Equação genérica 3.2.

$$y = b_0 + \sum_{i=1}^3 b_i x_i + \sum_{i=1}^3 b_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 b_{ij} x_i x_j \quad (3.2)$$

onde:

$y$ : estimativa dos valores populacionais das respostas;

$b_0, b_i, b_{ii}, b_{ij}$ : coeficientes de regressão relativos aos efeitos principais lineares ( $x_i$ ) quadráticos ( $x_i^2$ ) e interações ( $x_i x_j$ ).

Para avaliação do desempenho do modelo foram analisados os desvios das observações com relação à média global, a soma quadrática total (Equação 3.3).

$$SQ_T = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2 \quad (3.3)$$

onde:

$n_i$ : número de repetições do nível  $i$ ;

$m$ : número de níveis distintos;

$\bar{y}$ : média global das respostas;

$y_{ij}$ : respostas observadas.

A  $SQ_T$  compreende a soma quadrática devido à regressão ( $SQ_R$ ) e ao resíduo ( $SQ_r$ ), de acordo com a Equação 3.4.

$$SQ_T = SQ_R + SQ_r \quad (3.4)$$

Sendo a  $SQ_r$  definida pela Equação 3.5.

$$SQ_r = SQ_{ep} + SQ_{faj} \quad (3.5)$$

onde:

$SQ_{ep}$ : soma quadrática devido ao erro puro, responsável pela medida do erro aleatório que oferta a resposta;

$SQ_{faj}$ : é a soma quadrática devido à falta de ajuste do modelo em relação às respostas observadas (Box et al, 1978).

Para verificar se o modelo explica uma quantidade significativa da variação dos dados experimentais, utilizou-se o teste F de significância. Neste teste

comparam-se os valores de F estimados a partir dos dados experimentais com o valor tabelado de uma distribuição de frequência de referência ( $F_{v_1, v_2}$ ) no nível de significância desejado.

A partir do teste F podemos verificar se a hipótese nula é válida, isto é, se as modificações introduzidas nas condições experimentais não possuem efeito sobre os resultados obtidos e, se as variações destes resultados são devidas exclusivamente a fatores aleatórios (Santos, 1998).

A Equação 3.6 apresenta o teste F para a regressão:

$$F_{\delta; p-1; n-p} = \frac{MQ_R}{MQ_r} \quad (3.6)$$

onde:

$\delta$  : nível de significância desejado;

$p$  : número de parâmetros do modelo;

$n$  : número total de observações (ensaios);

$MQ_R$  : média quadrática da regressão;

$MQ_r$  : média quadrática dos resíduos.

Para uma melhor visualização a Tabela 3.3 apresenta a análise de variância para o ajuste do modelo pelo método dos mínimos quadrados (Barros *et al.*, 1995).

Biblioteca Universitária  
UFSC

**Tabela 3.3 – Análise de variância para o ajuste de um modelo pelo método dos mínimos quadrados**

Fonte de variação	Soma quadrática	Número de graus de liberdade	Média quadrática
Regressão	$SQ_R = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	$p - 1$	$MQ_R = \frac{SQ_R}{p - 1}$
Resíduos	$SQ_r = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_i - \hat{y}_i)^2$	$n - p$	$MQ_r = \frac{SQ_r}{n - p}$
Total	$SQ_T = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2$	$n - 1$	

% variação explicada:  $SQ_R / SQ_T$ ;

$\bar{y}$ : média global das observações;

$y$ : valor da observação;

$\hat{y}$ : valor estimado pelo modelo.

### 3.1.2. Análises Estatísticas

As análises estatísticas dos resultados obtidos nos planejamentos experimentais completos e em estrela foram realizadas utilizando-se o software Statistica 5.0<sup>®</sup> (Statistica, 1995).

### 3.1.3. Determinação as Condições Ótimas do Processo

A verificação das condições ótimas para a produção de acetoína foi realizada através da determinação dos valores codificados das variáveis, os quais fazem com que a função (modelo empírico) alcance seu valor máximo. Para esta constatação é necessário obedecer a condição representada pela Equação 3.7.

$$y'(x_1, x_2, x_3) = 0 \quad (3.7)$$

onde:  $y'$ : derivada da função em estudo;  $x_1, x_2, x_3$ : variáveis independentes.

### 3.2. Microrganismo

O microrganismo utilizado para a realização de todos os ensaios fermentativos foi a levedura *Hanseniaspora guilliermondii* CCT 3800 (Figura 3.1), obtida da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello” (Campinas, SP).



**Figura 3.1 – *Hanseniaspora guilliermondii* CCT 3800 (x1000)**

### 3.3. Manutenção da Levedura

O meio de cultura YMA (Yeast Malt Extract Agar), descrito na Tabela 3.4, foi utilizado para manutenção e repique da cepa em tubo inclinado.

**Tabela 3.4 – Composição do meio YMA (Yeast Malt Extract Agar)**

<b>Componentes</b>	<b>Concentração (g/l)</b>
Extrato de levedura (Micromed)	3,0
Extrato de malte (Oxoid Ltda.)	3,0
Bactopeptona (Micromed)	5,0
Glicose (Vetec Química fina)	10,0
Agar (Reagen)	20,0

\*Yeast Morphology Agar (DIFCO, 1984)

O pH foi ajustado em 5,0 com solução de 0,5% de ácido cítrico (Reagen) conforme descrito por Moritz (1998).

O meio foi introduzido em tubos de ensaio com tampa e esterilizado a 121°C por 15 minutos em autoclave. Após a esterilização, o meio ainda quente é inclinado sob a bancada em um ângulo de aproximadamente 30° até completo resfriamento.

A levedura foi inoculada e incubada por 24 horas a 28°C em estufa bacteriológica. Após o crescimento, os tubos contendo os microrganismos foram conservados a 4°C em refrigerador. A repicagem foi realizada a cada dois meses.

### 3.4. Ensaio Fermentativos

O meio de cultivo utilizado para os ensaios fermentativos é descrito na Tabela 3.5.

**Tabela 3.5 – Composição do meio YM (Yeast Malt Extract)**

<b>Componentes</b>	<b>Concentração (g/l)</b>
Extrato de levedura (Micromed)	3,0
Extrato de malte (Oxoid Ltda.)	3,0
Bactopeptona (Micromed)	5,0
Glicose (Vetec Química fina)*	

\*utilizada de acordo com o ensaio descrito na tabela (3.1)



Inicialmente foi preparado um inóculo com a cultura estoque, com o objetivo de adaptar a levedura às condições de operação de cada ensaio.

O preparo do inóculo foi realizado transferindo-se duas alçadas de células da cultura estoque para o frasco Erlenmeyer, contendo o caldo de cultivo previamente esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos.

O frasco foi tampado com algodão para permitir a aeração adequada e incubado em banho termostaticado agitado a uma frequência de aproximadamente 100  $\text{min}^{-1}$ . O movimento giratório faz com que a força centrífuga desloque o fluido formando uma camada aerada por difusão através da superfície líquida. As temperaturas de incubação utilizadas são descritas na Tabela 3.1 de acordo com o ensaio.

A evolução celular de um inóculo foi acompanhada por turbidimetria e gravimetria (descritos no Item 3.5.2), visando determinar o período em que os microrganismos alcançam a fase exponencial de crescimento (Figura 3.2). As condições de cultura utilizadas foram baseadas nas descritas por Moritz (1998).

Após 15 horas de incubação o inóculo foi transferido para os frascos de fermentação em uma fração de 10% para não alterar de forma considerável a concentração dos nutrientes do meio de cultivo.

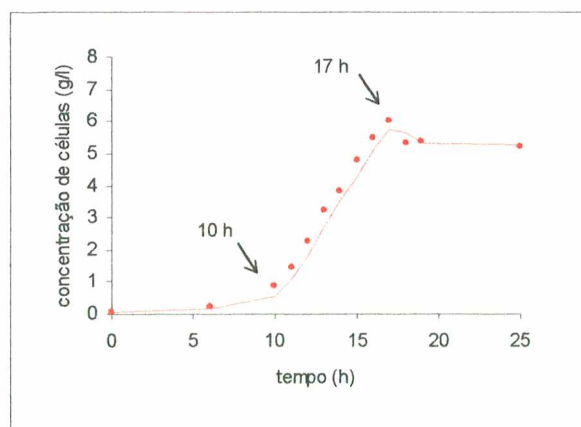


Figura 3.2 – Crescimento celular do inóculo de *Hanseniaspora guilliermondii* (40g/l de glicose; pH de 5,5 e temperatura de 30°C)

Os frascos utilizados na fermentação eram do tipo Erlenmeyer aletados com volume de 1000 ml, contendo 500 ml do caldo de cultivo previamente esterilizado e nas condições descritas na Tabela 3.1.

Os processos foram acompanhados durante 24 horas, sendo avaliados pH, concentração celular, concentração de glicose, acetoina, etanol e acetato de etila.

### **3.5. Métodos Analíticos**

#### **3.5.1. Amostragem**

Durante os ensaios fermentativos, foram retiradas alíquotas de aproximadamente 5 ml da suspensão celular, em intervalos de tempo de 2 horas na fase inicial do processo, diminuindo para 1 hora no decorrer da fermentação.

As amostragens foram realizadas em condições assépticas utilizando-se pipetas esterilizadas e bico de Bunsen.

#### **3.5.2. Determinação da concentração celular**

A concentração celular durante as fermentações foi determinada por dois métodos: indiretamente por turbidimetria e diretamente por gravimetria (Leveau & Bouix, 1984).

As medidas de absorvância foram realizadas a um comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 550 nm em espectrofotômetro modelo E225D (CELM) com cubetas de vidro cilíndricas de 1 cm de diâmetro. Os valores obtidos foram convertidos em concentração celular (massa de matéria seca por unidade de volume) utilizando-se uma curva de calibração (Figura 3.3), determinada para cada ensaio.

A curva de calibração foi construída, coletando-se 20 ml de suspensão celular no final da fermentação, filtrada em filtro Millipore com membrana de 0,8  $\mu\text{m}$  seca a peso constante em estufa a 105°C e previamente tarada. Após secagem até peso constante, a membrana contendo as células foi pesada, e a biomassa determinada pela diferença de peso seco. Esta etapa foi realizada em triplicata. A massa seca obtida dividida pelo volume filtrado (20 ml) forneceu a concentração de células na suspensão (g/l).

Simultaneamente foram coletados aproximadamente 20 ml do fermentado e realizadas diluições 1:8; 1:10; 1:15; 1:20. Cada diluição teve sua absorbância lida a 550nm. A concentração celular obtida foi, então, dividida por cada uma das diluições.

As curvas de calibração plotadas correlacionando-se a concentração celular (g/l) com a absorbância ( $\lambda = 550\text{nm}$ ) apresentaram limites de linearidade na faixa utilizada, onde os coeficientes de determinação ( $r^2$ ) variaram entre 0,9832 e 0,9995. As curvas de calibração obtidas para cada ensaio encontram-se em anexo.

É importante salientar que, para a determinação da concentração celular nos ensaios deve-se considerar a diluição utilizada em cada leitura, mantendo-se a absorbância dentro do limite de linearidade.

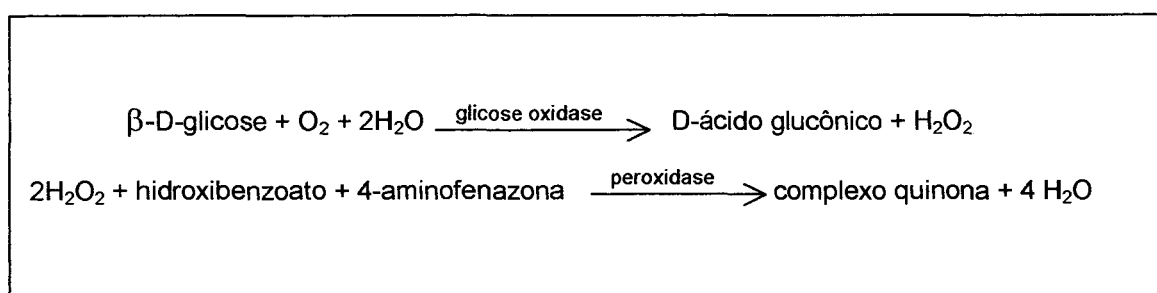
### **3.5.3. Dosagem de glicose**

A determinação da concentração de glicose foi realizada utilizando-se o teste enzimático colorimétrico Enz Color (Biodiagnóstica Indústria Química Clínica Ltda.), cujos reagentes são descritos na Tabela 3.6.

**Tabela 3.6 – Reagentes utilizados no teste enzimático colorimétrico Enz Color**

Reagente	Composição
Glicose Enz Color	0,1 mmol/l de 4-aminofenazona; 5 mmol/l de hidroxibenzoato; 5.000 U/l de glicose oxidase; 500 U/l de peroxidase; tampão e estabilizador.
Padrão de glicose	1,0 g/l de solução de glicose

O método (Figura 3.4) é baseado na formação de ácido glucônico e peróxido de hidrogênio a partir da glicose em uma reação catalisada pela enzima glicose oxidase. Os produtos formados nesta reação reagem com o hidroxibenzoato e a aminofenazona sob a ação catalítica da enzima peroxidase, formando um complexo quinona de cor vermelha, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose na amostra.

**Figura 3.4 – Reações ocorridas no método enzimático colorimétrico para determinação da concentração de glicose**

Como a relação entre os valores de absorvância e de concentração de glicose seguem uma tendência linear até uma concentração de 4g/l de glicose, as amostras foram diluídas em uma proporção de 1:40. Aliquotas de 20 µl das diluições e do padrão foram adicionadas à 2ml do reagente “Glicose Enz Color”, homogeneizadas e incubadas durante 10 minutos à 37 °C. A absorvância da coloração obtida foi lida contra

o branco do reagente, a um comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 500 nm, em espectrofotômetro modelo E225D (CELM) com cubetas de vidro cilíndricas de 1 cm de diâmetro.

A concentração de glicose foi determinada através da Equação 3.8.

$$\text{conc. glicose (g/l)} = \frac{\text{absorbância da amostra}}{\text{absorbância do padrão}} * \text{diluição} \quad (3.8)$$

#### 3.5.4. Determinação da concentração de acetoína, etanol e acetato de etila

As amostras coletadas durante os ensaios foram centrifugadas a 15000  $\text{min}^{-1}$  a uma temperatura de 4 °C durante 5 minutos, em centrífuga modelo 2K15 (SIGMA Laboratory Centrifuges) para posterior análise cromatográfica.

A concentração de acetoína, etanol e acetato de etila foi determinada por cromatografia gasosa, utilizando-se cromatógrafo CG-90-DIC equipado com detector de ionização de chama (DIC ar-hidrogênio) e coluna de sílica fundida ( $\varnothing$  0,53 mm x 30 m) modelo Supercowax-10.

Os parâmetros utilizados no desenvolvimento das análises (vazão do gás de arraste e temperatura da coluna) foram avaliados a fim de obter uma melhor separação dos componentes.

A temperatura da coluna e a vazão do gás de arraste, nitrogênio, que apresentaram melhores resultados foram 80°C e 7ml/min, respectivamente. Estes valores foram utilizados para todas as análises cromatográficas.

Como gases de chama foram utilizados hidrogênio a 75 ml/min e ar a 300 ml/min. As temperaturas do injetor e detector utilizadas foram: 185 e 230°C, respectivamente. O volume injetado manualmente foi de 1  $\mu\text{l}$ . A integração e os

cromatogramas (anexo) foram obtidos através de uma placa interface AD/DA (MICROQUÍMICA Indústria e Comércio Ltda.).

Não foi possível a determinação de diacetil, já que o componente era detectado com mesmo tempo de retenção que o etanol.

As curvas de calibração foram obtidas utilizando-se soluções padrão de acetoina (Merck), etanol (Biotec Reagentes Analíticos) e acetato de etila (Grupo Química) nas faixas de 50 a 450 mg/l; 0,5 a 4,0 g/l; 0,5 a 4,0 g/l, respectivamente. Correlacionou-se a concentração da substância em análise com a área absoluta dos picos gerados.

As curvas de calibração obtidas para cada um dos compostos analisados encontram-se em anexo.

### 3.6. Metodologia utilizada nos cálculos

A seguir serão descritos os cálculos utilizados para a determinação dos fatores de conversão, produtividade, e velocidade específica máxima de crescimento, de acordo com Leveau & Bouix (1984).

#### 3.6.1. Fatores de conversão

O fator de conversão de substrato (glicose) em células é expresso pela Equação 3.10.

$$Y_{x/s} (g/g) = \frac{(X_{\max} - X_o)}{(S_o - S_f)} \quad (3.10)$$

onde:

$X_{\max}$  : valor máximo de concentração celular (g/l);

$X_0$  : valor inicial de concentração celular (g/l);

$S_f$  : valor final de concentração de glicose (g/l);

$S_0$  : valor inicial de concentração de glicose (g/l).

O fator de conversão de substrato (glicose) em produto (acetoína, etanol ou acetato de etila) é descrito pela Equação 3.11.

$$Y_{P/S} (g \cdot g^{-1}) = \frac{P_{\max}}{(S_0 - S_f)} \quad (3.11)$$

onde:

$P_{\max}$  : valor máximo de produto formado (g/l).

### 3.6.2. Produtividade total

A produtividade em células é definida pela Equação 3.12.

$$P_x (g \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}) = \frac{X_{\max}}{t} \quad (3.12)$$

onde:

$t$ : tempo de fermentação (h), quando a concentração celular é máxima.

A produtividade em produto (acetoína, etanol e acetato de etila) é definida pela Equação 3.13.

$$P_p \text{ (g.l}^{-1}\text{.h}^{-1}\text{)} = \frac{P_{\max}}{t} \quad (3.13)$$

onde:

t : tempo de fermentação (h) quando a concentração de produto é máxima.

### 3.6.3. Velocidades específicas de crescimento

A partir das curvas de concentração celular determinou-se as velocidades específicas de crescimento microbiano para cada ensaio de acordo com a Equação 3.14.

$$\mu_x = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (3.14)$$

Traçando-se curvas em coordenadas semi-logarítmicas,  $\ln X = f(t)$ , obtêm-se uma fase (crescimento exponencial), onde a distribuição dos pontos formam uma reta, de coeficiente angular igual à velocidade específica máxima de crescimento.



# **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira parte deste capítulo serão descritos os resultados obtidos do planejamento fatorial completo ( $2^3$ ) adicionado do planejamento em estrela e ponto central, totalizando dezesseis experimentos. Também serão apresentadas as estimativas dos parâmetros dos modelos empíricos, sua validade estatística e a determinação do ponto ótimo. A seguir serão apresentados os resultados da cinética de crescimento, produção de acetoína, acetato de etila e etanol por *Hanseniaspora guilliermondii*.

### 4.1. Planejamento Experimental

Conforme descrito na metodologia (Item 3.1.1) supôs-se que três fatores exercem influência na produção de acetoína por *H. guilliermondii*: concentração inicial de glicose, temperatura e pH inicial.

A partir daí desenvolveu-se um planejamento experimental completo adicionado do planejamento em estrela e ponto central. As respostas foram obtidas em termos de concentração máxima em acetoína, conversão substrato em produto e produtividade, para as variáveis independentes descritas na Tabela 3.1.

Os resultados são apresentados na Tabela 4.1. A amplitude das respostas na faixa estudada foi de 108 a 367 mg/l para concentração máxima em acetoína ( $C_{\text{acetoína}}$ ), de 3,5 a 7,7 mg/g para conversão substrato em acetoína ( $Y_{\text{acet/s}}$ ) e 5,7 a 23,1 mg/l.h para produtividade em acetoína ( $P_{\text{acetoína}}$ ).

**Tabela 4.1 – Resultados do planejamento fatorial  $2^3 +$  estrela, para avaliar a concentração máxima em acetoína ( $C_{\text{acetoína}}$ ), conversão substrato em produto ( $Y_{\text{acet/s}}$ ) e produtividade ( $P_{\text{acetoína}}$ ).**

Experimento	G	T	pH	$C_{\text{acetoína}}$ (mg/l)	$Y_{\text{acet/s}}$ (g/g)	$P_{\text{acetoína}}$ (g/l.h)
1	-1	-1	-1	140	0,0044	0,0058
2	1	-1	-1	342	0,0068	0,0142
3	-1	1	-1	186	0,0067	0,0143
4	1	1	-1	300	0,0077	0,0231
5	-1	-1	1	229	0,0076	0,0127
6	1	-1	1	338	0,0073	0,0141
7	-1	1	1	115	0,0035	0,0068
8	1	1	1	272	0,0055	0,0145
9	-1,682	0	0	108	0,0063	0,0057
10	1,682	0	0	334	0,0058	0,0158
11	0	-1,682	0	344	0,0070	0,0144
12	0	1,682	0	237	0,0048	0,0103
13	0	0	-1,682	367	0,0073	0,0153
14	0	0	1,682	338	0,0069	0,0169
15	0	0	0	317	0,0065	0,0132
16	0	0	0	354	0,0073	0,0177

\* Ensaios realizados em ordem aleatória

Através das Tabelas 4.2, 4.3 e 4.4 pode-se observar as estimativas dos efeitos principais e de interação das variáveis independentes em relação às respostas em concentração máxima de acetoína, conversão substrato em produto e produtividade em acetoína.

**Tabela 4.2 – Análise dos efeitos das variáveis independentes sobre a resposta em concentração máxima de acetoína ( $C_{\text{acetoína}}$ )**

Variáveis do processo	Efeito sobre $C_{\text{acetoína}}$	Desvio padrão
Glicose – $x_1$	141,00*	18,67
Glicose – $(x_1)^2$	-98,21*	20,56
Temperatura – $x_2$	-52,17*	18,67
Temperatura – $(x_2)^2$	-48,87*	20,56
Glicose x pH – $x_1 \cdot x_3$	-12,62	24,39
Temperatura x pH – $x_2 \cdot x_3$	-46,03	24,39

\* efeitos significativos em um intervalo de 95% de confiança

**Tabela 4.3 – Análise dos efeitos das variáveis independentes sobre a resposta em conversão substrato em acetoína ( $Y_{acet/s}$ )**

Variáveis do processo	Efeito sobre $Y_{acet/s}$	Desvio padrão
Glicose – $x_1$	0,00063	0,00040
Glicose – $(x_1)^2$	-0,00068	0,00044
Temperatura – $x_2$	-0,00095*	0,00040
Temperatura – $(x_2)^2$	-0,00078	0,00044
pH – $x_3$	-0,00033	0,00040
Glicose x pH – $x_1 \cdot x_3$	-0,00039	0,00052
Temperatura x pH – $x_2 \cdot x_3$	-0,00226*	0,00052

\* efeitos significativos em um intervalo de 95% de confiança

**Tabela 4.4 – Análise dos efeitos das variáveis independentes sobre a resposta em produtividade em acetoína ( $P_{acetoína}$ )**

Variáveis do processo	Efeito sobre $P_{acetoína}$	Desvio padrão
Glicose – $x_1$	0,00636*	0,00132
Glicose – $(x_1)^2$	-0,00344*	0,00146
Temperatura – $(x_2)^2$	-0,00233	0,00146
Glicose x temperatura – $x_1 \cdot x_2$	0,00169	0,00172
Glicose x pH – $x_1 \cdot x_3$	-0,00202	0,00172
Temperatura x pH – $x_2 \cdot x_3$	-0,00570*	0,00172

\* efeitos significativos em um intervalo de 95% de confiança

Das três variáveis estudadas pode-se observar que apenas a concentração inicial de glicose e a temperatura, em suas formas linear e quadrática mostraram-se significativas a um nível de 95% de confiança, para a concentração máxima em acetoína (Tabela 4.2).

Para a conversão substrato em acetoína, mostraram-se significativos o efeito linear da temperatura e a interação temperatura e pH (Tabela 4.3).

Quando a resposta é a produtividade em acetoína, os efeitos da concentração inicial de glicose em sua forma linear e quadrática e a interação temperatura e pH, apresentaram-se significativos (Tabela 4.4).

Modelos empíricos foram ajustados aos resultados de cada resposta, sendo os coeficientes de regressão, juntamente com os desvios padrão mostrados na Tabelas 4.5, 4.6 e 4.7.

Os parâmetros do modelo foram obtidos para as variáveis codificadas.

**Tabela 4.5 – Coeficientes de regressão (codificados) para o modelo estimado para concentração máxima de acetoina ( $C_{\text{acetoina}}$ )**

	<b>Coeficientes de regressão</b>	<b>Desvio da padrão</b>
Média	332,70*	16,55
Glicose – $x_1$	70,50*	9,33
Glicose – $(x_1)^2$	-49,10*	10,28
Temperatura – $x_2$	-26,09*	9,33
Temperatura – $(x_2)^2$	-24,44*	10,28
Glicose x pH – $x_1 \cdot x_3$	-6,31	12,20
Temperatura x pH – $x_2 \cdot x_3$	-23,02	12,20

\* Efeito significativo em um intervalo de 95% de confiança

**Tabela 4.6 – Coeficientes de regressão (codificados) para o modelo estimado para conversão substrato em produto ( $Y_{\text{acet/S}}$ )**

	<b>Coeficientes de regressão</b>	<b>Desvio da padrão</b>
Média	0,00697*	0,00036
Glicose – $x_1$	0,00031	0,00020
Glicose – $(x_1)^2$	-0,00034	0,00022
Temperatura – $x_2$	-0,00048*	0,00020
Temperatura – $(x_2)^2$	-0,00039	0,00022
pH – $x_3$	-0,00016	0,00020
Glicose x pH – $x_1 \cdot x_3$	-0,00020	0,00026
Temperatura x pH – $x_2 \cdot x_3$	-0,00113*	0,00026

\* Efeito significativo em um intervalo de 95% de confiança

**Tabela 4.7 – Coeficientes de regressão (codificados) para o modelo estimado para produtividade em acetoína ( $P_{\text{acetoína}}$ )**

	Coeficientes de regressão	Desvio padrão
Média	0,01588*	0,00117
Glicose – $x_1$	0,00318*	0,00066
Glicose – $(x_1)^2$	-0,00172*	0,00072
Temperatura – $(x_2)^2$	-0,00116	0,00072
Glicose x Temperatura – $x_1 \cdot x_2$	0,00084	0,00086
Glicose x pH – $x_1 \cdot x_3$	-0,00101	0,00086
Temperatura x pH – $x_2 \cdot x_3$	-0,00285*	0,00086

\* Efeito significativo em um intervalo de 95% de confiança

Considerando-se apenas os efeitos estatisticamente significativos, podemos escrever as equações finais para concentração máxima em acetoína ( $C_{\text{acetoína}}$ ), conversão substrato em produto ( $Y_{\text{acet/s}}$ ) e produtividade em acetoína ( $P_{\text{acetoína}}$ ):

$$C_{\text{acetoína}} = 332,70 + 70,50x_1 - 26,09x_2 - 49,10x_1^2 - 24,44x_2^2 \quad (4.1)$$

$$Y_{\text{acet/s}} = 0,00697 - 0,00048x_2 - 0,00113x_2x_3 \quad (4.2)$$

$$P_{\text{acetoína}} = 0,01588 + 0,00318x_1 - 0,00172x_1^2 - 0,00285x_2x_3 \quad (4.3)$$

onde:  $C_{\text{acetoína}}$ : mg/l;  $Y_{\text{acet/s}}$ : g/g;  $P_{\text{acetoína}}$ :  $\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ;  $x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$ : valores codificados de concentração inicial de glicose, temperatura e pH, respectivamente.

A avaliação do desempenho dos modelos foi realizada através do teste F de significância estatística (Tabelas 4.8, 4.9 e 4.10).

**Tabela 4.8 – Análise de variância para avaliar a significância estatística do modelo quadrático para concentração máxima em acetoína ( $C_{\text{acetoína}}$ )**

Fonte da variação	SQ	GL	MQ	$F_{\text{calculado}}$	$F_{\text{tabelado}}$
Regressão	110107,22	6	18351,20	15,42	3,37
Resíduos	10709,66	9	1189,96		
Total	120816,88	15			

\* variação explicada: 91,14%

nível de significância: 95%

SQ; soma quadrática; GL: graus de liberdade; MQ: média quadrática

**Tabela 4.9 – Análise de variância para avaliar a significância estatística do modelo para conversão substrato em produto ( $Y_{\text{acet/s}}$ )**

Fonte da variação	SQ	GL	MQ	$F_{\text{calculado}}$	$F_{\text{tabelado}}$
Regressão	0,0000177	7	0,00000253	4,6	3,5
Resíduos	0,0000044	8	0,00000055		
Total	0,0000221	15	0,00000147		

\* variação explicada: 79,94%

nível de significância: 95%

**Tabela 4.10 – Análise de variância para avaliar a significância estatística do modelo quadrático para produtividade em acetoína ( $P_{\text{acetoína}}$ )**

Fonte da variação	SQ	GL	MQ	$F_{\text{calculado}}$	$F_{\text{tabelado}}$
Regressão	0,0002556	6	0,000426	71	3,37
Resíduos	0,0000536	9	0,000006		
Total	0,0003093	15	0,000021		

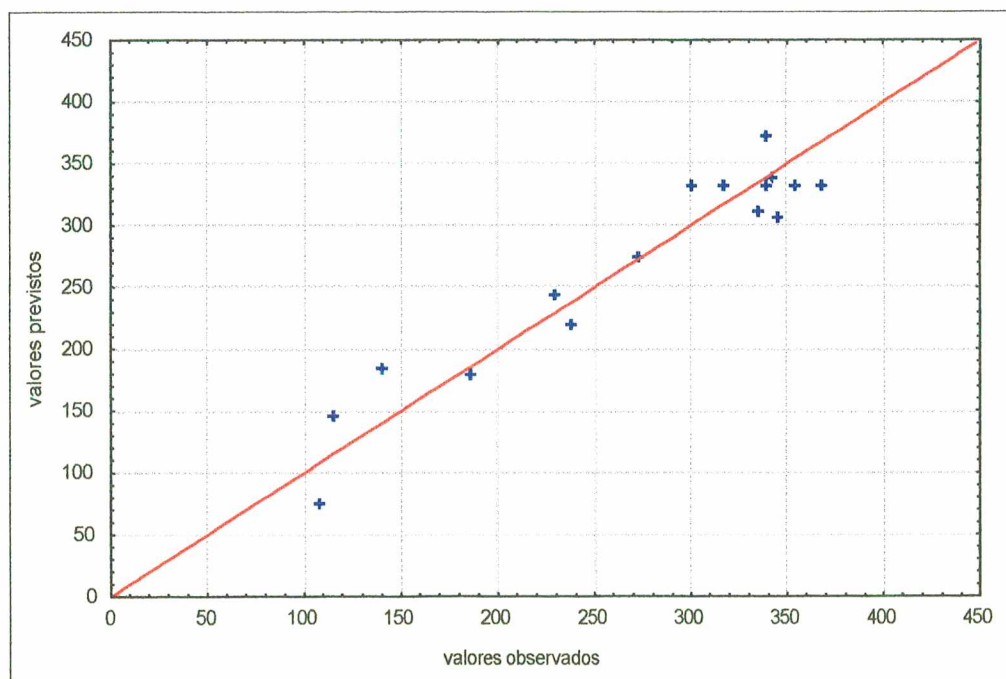
\* variação explicada: 82,65%

nível de significância: 95%

Analisando-se os resultados das Tabelas 4.8, 4.9 e 4.10 podemos observar que os valores de F calculados para os modelos são maiores que os valores de F tabelados, demonstrando que as regressões são estatisticamente significativas.

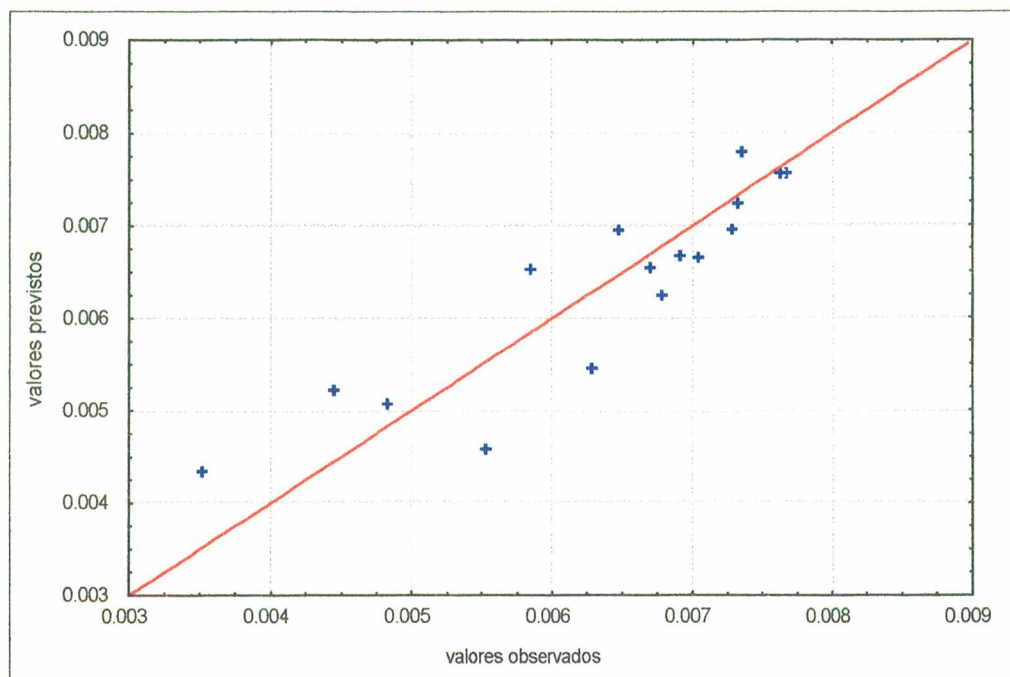
Segundo Barros Neto *et al.* (1995), para que a regressão não seja apenas estatisticamente significativa, mas também útil para fins preditivos, o valor de F calculado deve ser no mínimo 4 vezes maior que o F tabelado. Desta forma, o modelo para a conversão substrato em produto é apenas significativo e não preditivo. Já os outros dois casos podem ser considerados preditivos pois os valores de F calculados foram 4,6 e 21 vezes maiores que os valores de F tabelados para concentração máxima e produtividade em acetoína, respectivamente.

As Figuras 4.1, 4.2 e 4.3 apresentam os valores previstos por cada um dos modelos em função dos valores observados.

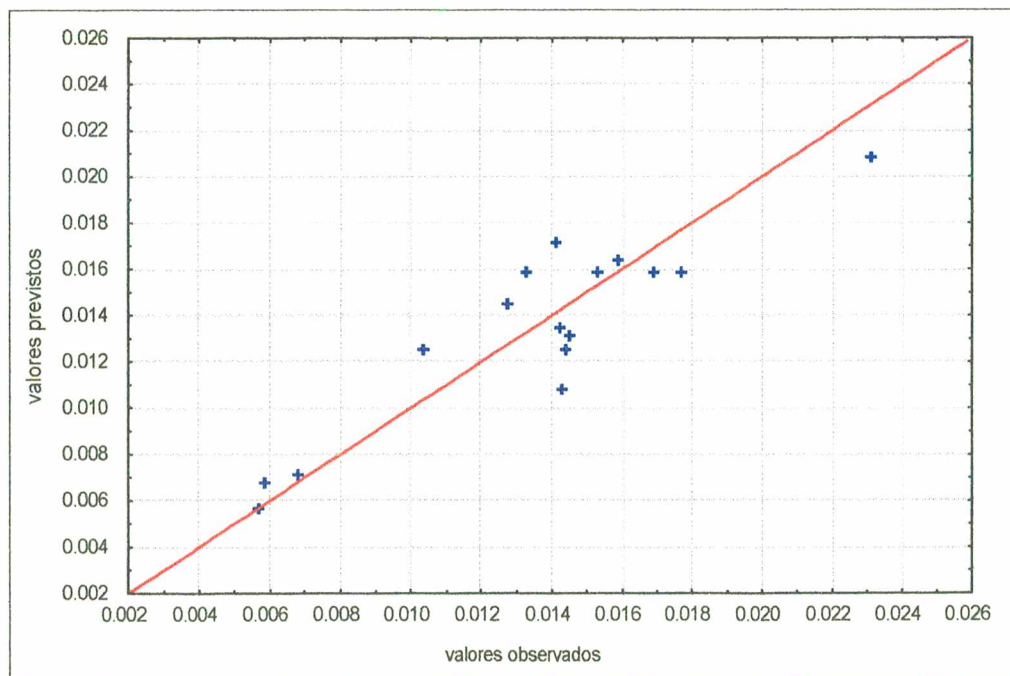


**Figura 4.1 – Valores previstos em função dos valores observados para o modelo da concentração máxima em acetoína**





**Figura 4.2 – Valores previstos em função dos valores observados para o modelo da conversão substrato em acetóina**



**Figura 4.3 – Valores previstos em função dos valores observados para o modelo da produtividade em acetóina**

Podemos verificar que existe alguma dispersão entre os dados previstos pelo modelo e os dados experimentais.

As Figuras 4.4, 4.5 e 4.6 apresentam as superfícies de resposta geradas pelo modelos em função das variáveis que apresentaram efeito, sendo que a variável não plotada, foi fixada no ponto central.

Analisando-se as superfícies de resposta podemos observar que em todos os casos, altas concentrações de glicose favoreceram a produção de acetoína. Tal fato pode ser atribuído à uma maior disponibilidade de piruvato, proveniente da glicólise, o que de acordo com Chuang & Collins (1968) proporciona uma maior produção de metabólitos secundários.

Valores extremos de pH (Figuras 4.5, 4.6b e 4.6c) inibiram o crescimento e favoreceram a produção de acetoína.

Nas Figuras 4.4, 4.5, 4.6a e 4.6c, podemos verificar que as temperaturas intermediárias favoreceram a produção de acetoína. De acordo com Romano & Suzzi (1992), a quantidade de acetoína produzida aumenta sensivelmente em fermentações realizadas a 30 °C, quando comparadas a ensaios realizados a temperaturas de 12, 18 e 24 °C, já que a velocidade de decomposição do  $\alpha$ -acetolactato aumenta.

Podemos observar ainda, que a interação entre os valores extremos de pH e temperatura (Figuras 4.5 e 4.6c) favoreceram a conversão da glicose em acetoína e a produtividade.

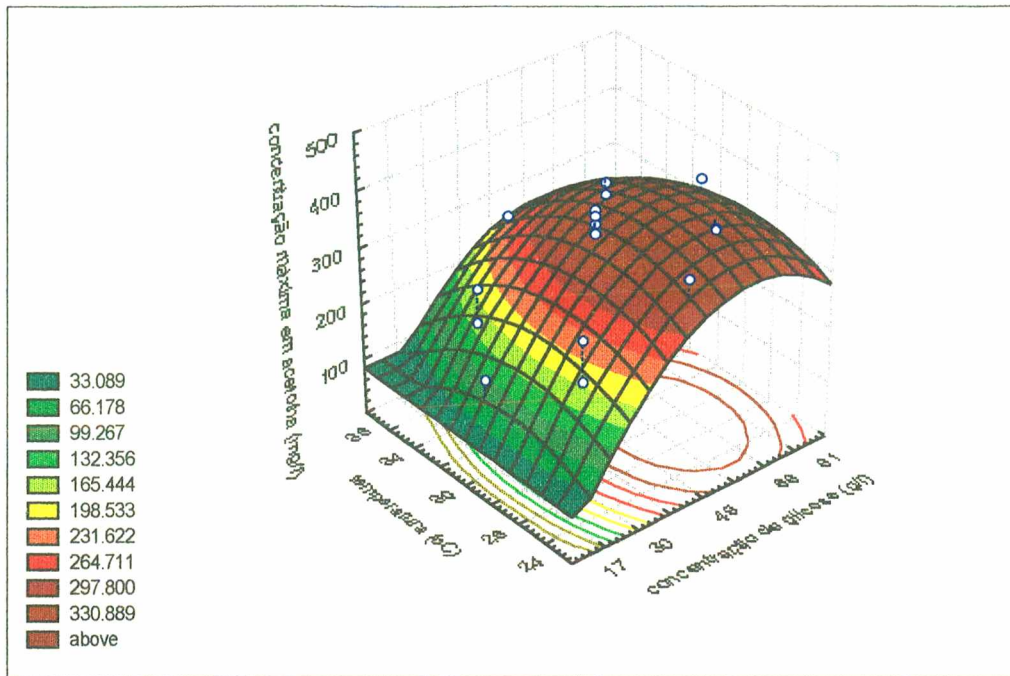


Figura 4.4 – superfície de resposta da concentração máxima em acetoina em função da concentração inicial de glicose e temperatura (pH=5,0)

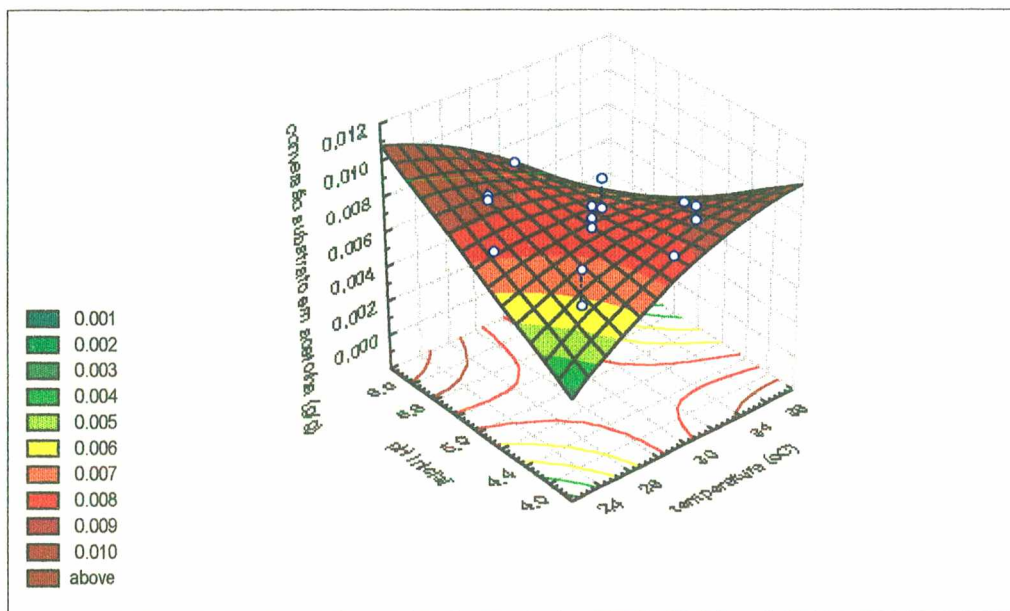


Figura 4.5 – superfície de resposta da conversão substrato em acetoina em função do pH inicial e temperatura (conc. de glicose = 49g/l)

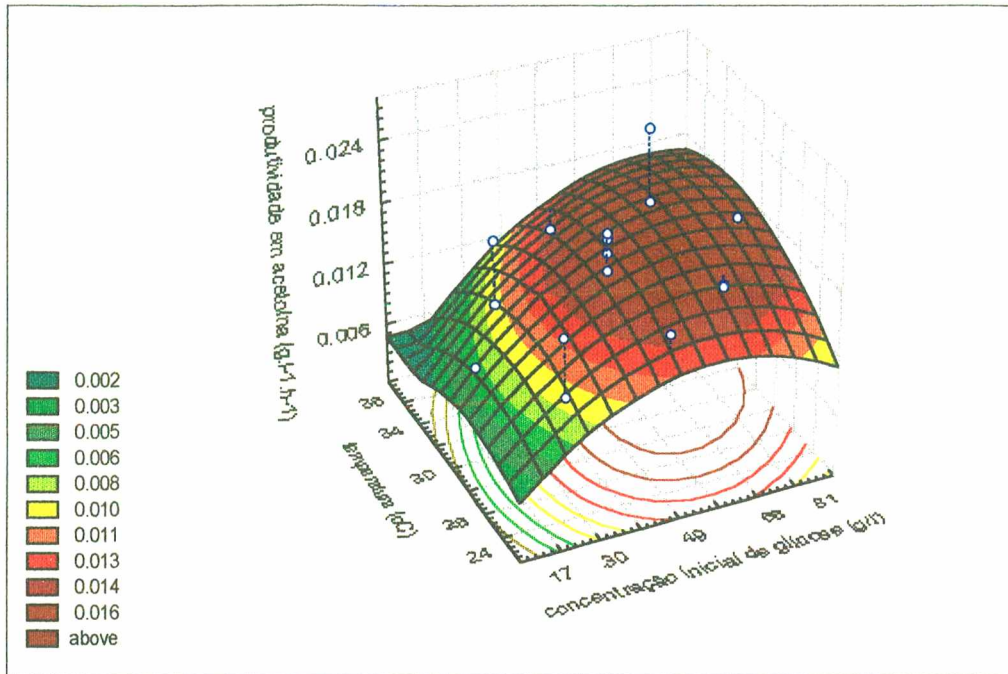


Figura 4.6a – superfície de resposta da produtividade em acetoina em função da concentração inicial de glicose e temperatura (pH = 5,0)

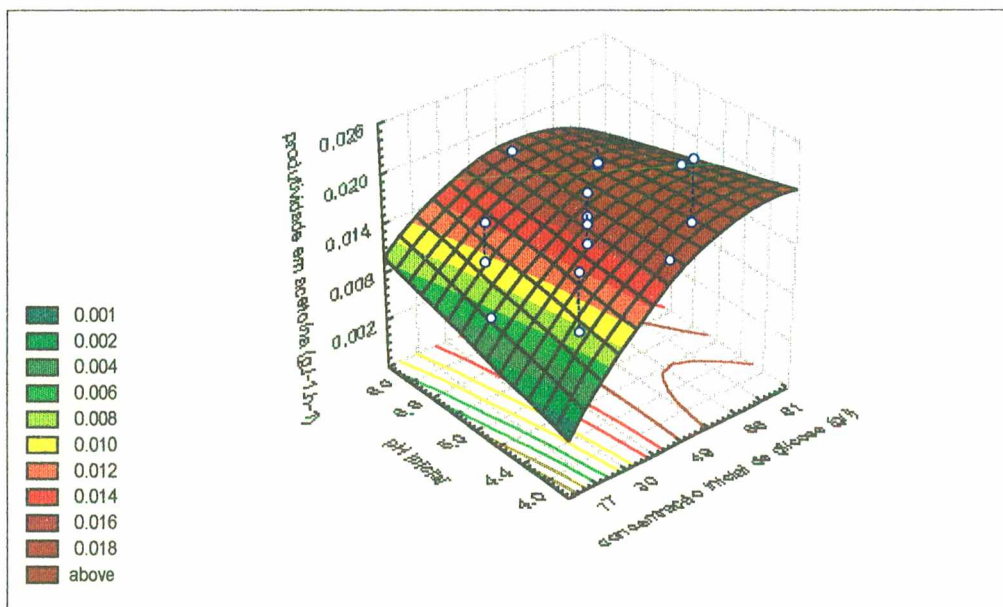


Figura 4.6b – superfície de resposta da produtividade em acetoina em função do pH e concentração inicial de glicose (temperatura = 30°C)

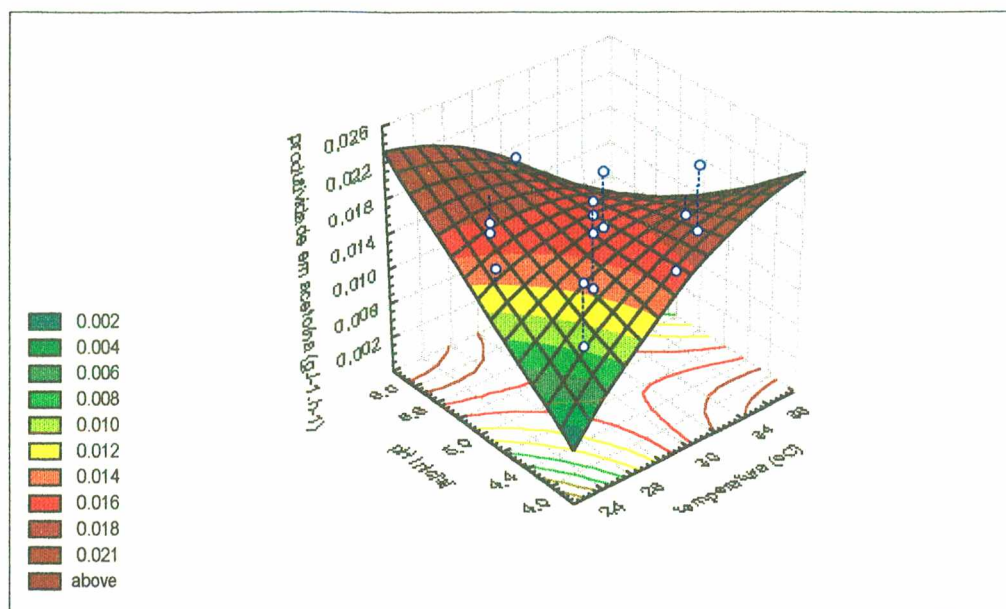


Figura 4.6c – superfície de resposta da produtividade em acetoina em função do pH e temperatura (conc. de glicose = 49g/l)

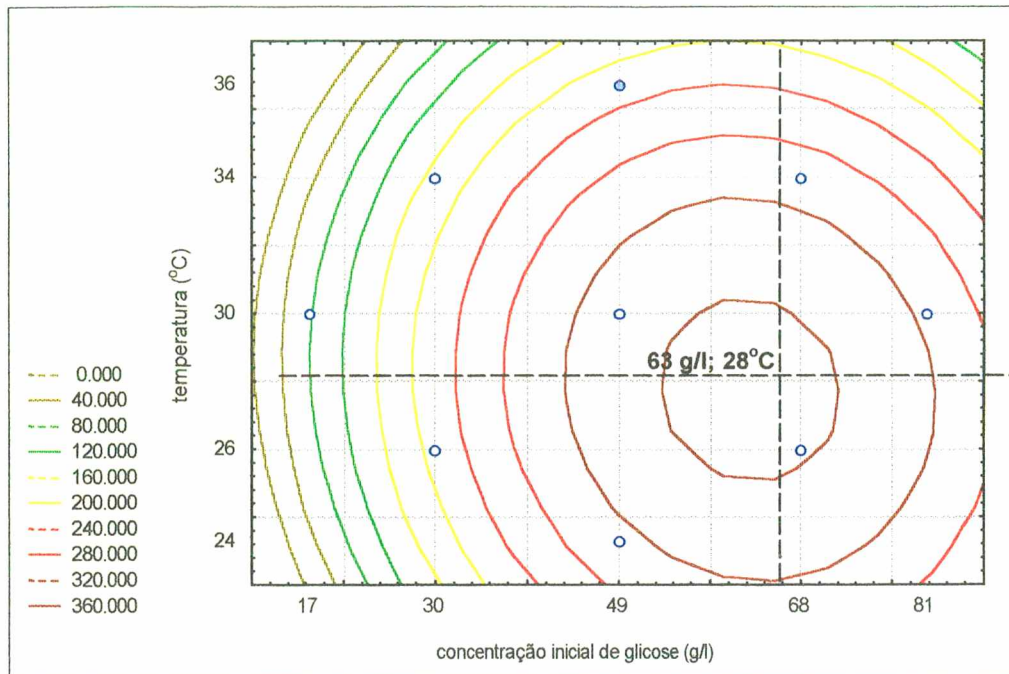
## 4.2. Otimização das condições de produção de acetoina

A otimização das condições de cultura foi realizada somente para as Equações 4.1 e 4.3, ou seja para as estimativas de concentração máxima e produtividade em acetoina, já que a modelo representativo da conversão substrato em acetoina (Equação 4.2) foi considerado não preditivo.

Para a avaliação das condições ótimas das variáveis estatisticamente significativas de cada modelo, determinou-se o ponto máximo da Equação 4.1 e da soma das Equações 4.1 e 4.3 em relação a cada uma destas variáveis.

Da Equação 4.1 foram obtidos os valores codificados 0,718 e -0,534, para concentração inicial de glicose e temperatura, respectivamente. Convertendo-se para valores reais, as condições obtidas são 63 g/l e 28°C, representadas no gráfico da

Figura 4.7. Estas condições proporcionam uma máxima concentração em acetoina correspondente a 365 mg/l.



**Figura 4.7 – Curvas de nível da concentração máxima em acetoina (mg/l) em relação à concentração inicial de glicose e temperatura.**

Da soma das Equações 4.1 e 4.3, obtém-se a Equação 4.4.

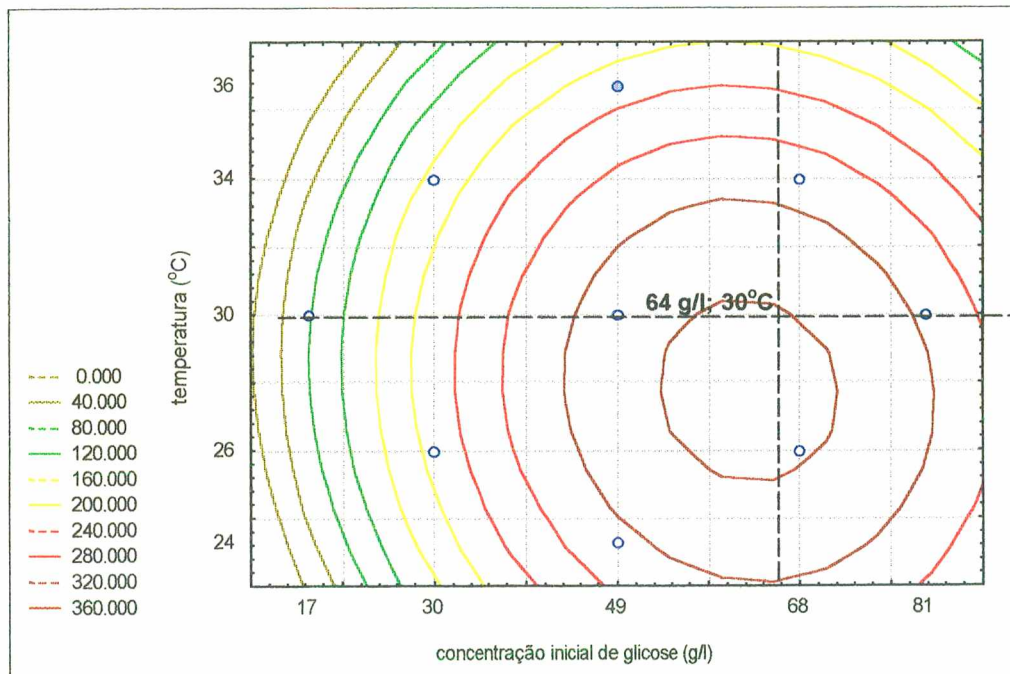
$$C_{\text{acetoina}} + \beta P_{\text{acetoina}} = 332,70 + 70,50x_1 - 26,09x_2 - 49,10x_1^2 - 24,44x_2^2 + 0,00158\beta + 0,00318\beta x_1 - 0,00172\beta x_1^2 - 0,00285\beta x_2x_3 \quad (4.4)$$

Observa-se que a Equação 4.3 foi multiplicada por um fator  $\beta$ , definido como  $10^4$ , já que a ordem de grandeza da Equação 4.1 é consideravelmente superior.

Da equação 4.4 foram determinadas as condições ótimas do processo, para que se tenha um valor máximo em concentração e produtividade de acetoina,

conjuntamente. Os valores codificados obtidos foram 0,771; 0,0 e -0,915 para concentração inicial de glicose, temperatura e pH, respectivamente.

Os valores reais obtidos para cada uma das variáveis foram 64 g/l, 30°C e 4,5, os quais estão representados nas Figuras 4.8 a 4.13.



**Figura 4.8 – Curvas de nível da concentração máxima em acetoina (mg/l) em relação à concentração inicial de glicose e temperatura.**

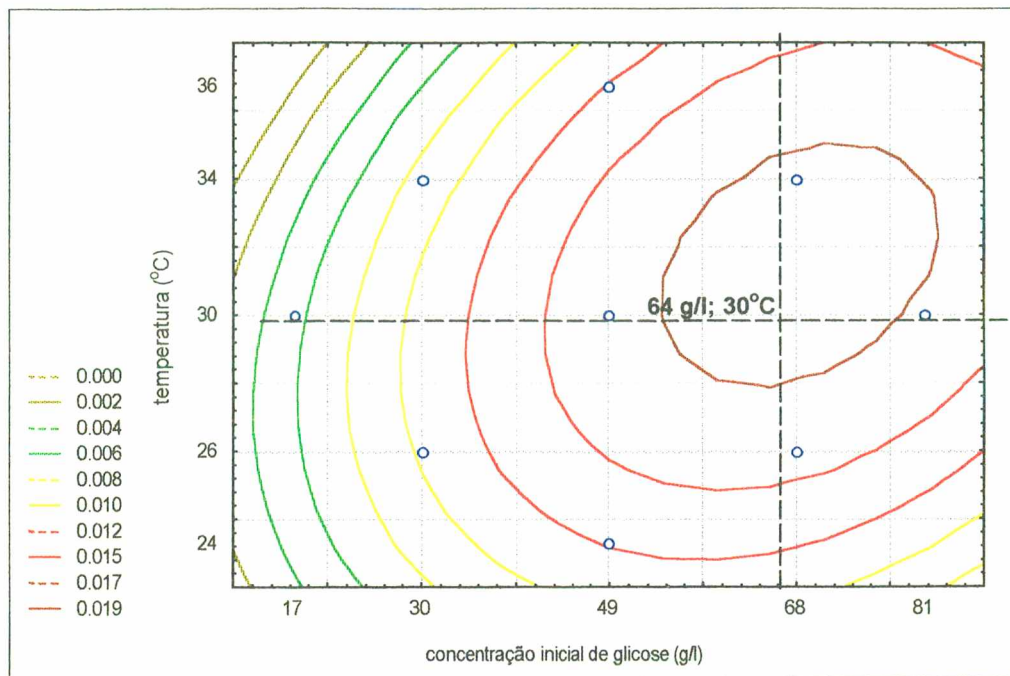


Figura 4.9 – Curvas de nível da produtividade em acetoina ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) em relação à concentração inicial de glicose e temperatura.

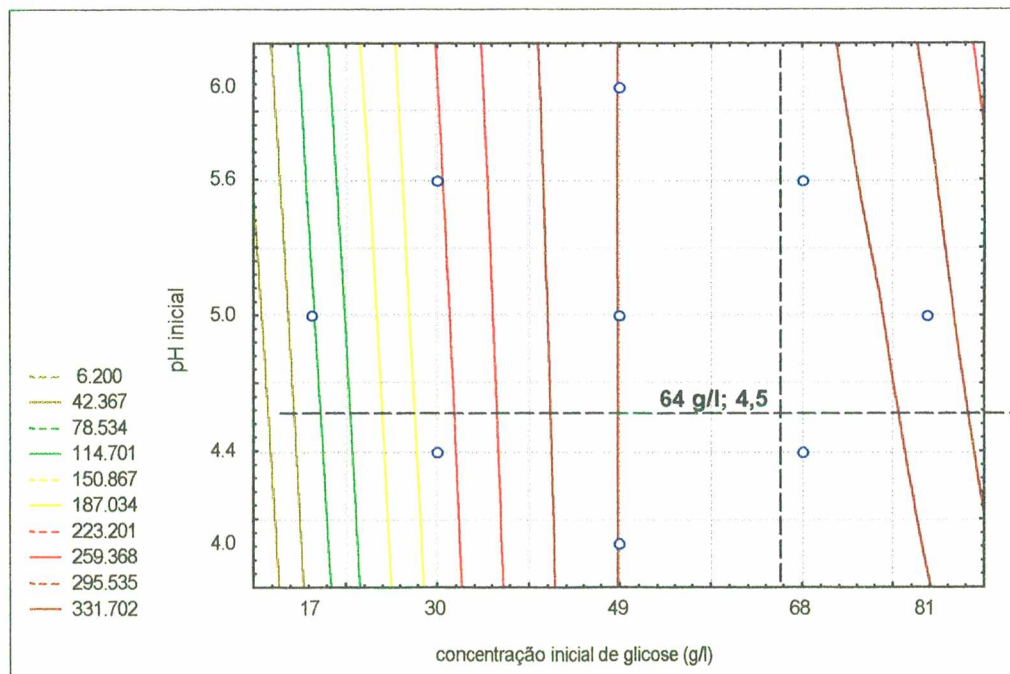


Figura 4.10 – Curvas de nível da concentração máxima em acetoina (mg/l) em relação à concentração inicial de glicose e pH.



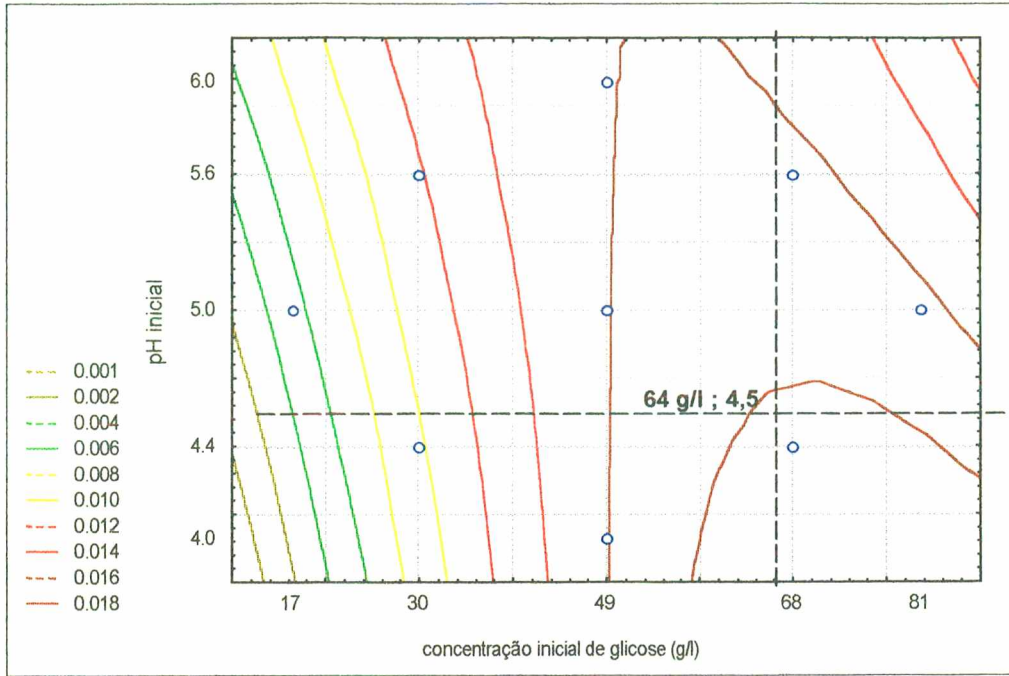


Figura 4.11 – Curvas de nível da produtividade em acetoína ( $\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) em relação à concentração inicial de glicose e pH

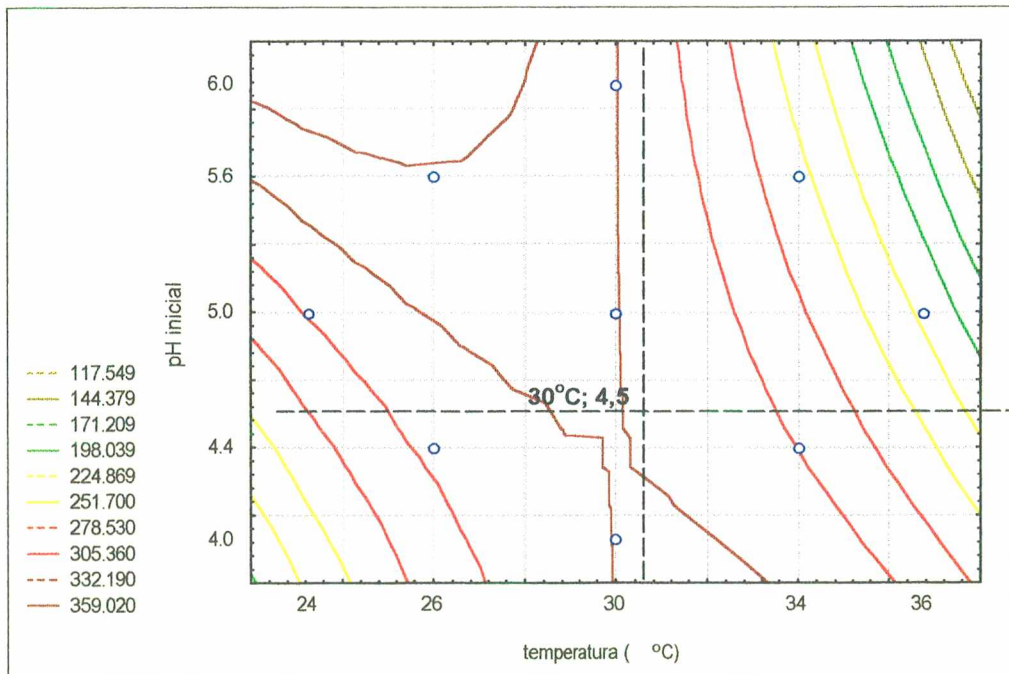
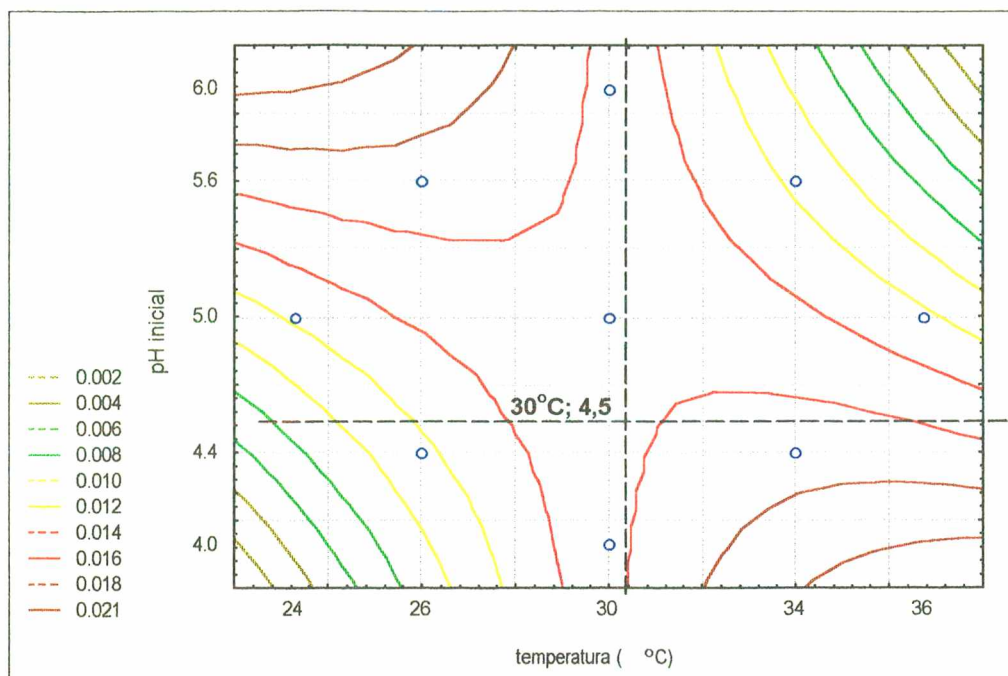


Figura 4.12 – Curvas de nível da concentração máxima em acetoína ( $\text{mg/l}$ ) em relação à temperatura e pH.



**Figura 4.13 – Curvas de nível da produtividade em acetoína ( $\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) em relação à temperatura e pH**

A resposta considerada de maior importância é a concentração máxima em acetoína, devido ao fato que na produção biotecnológica, o processo de separação é a etapa de maior custo e, quanto maior a concentração do produto a ser extraído do meio fermentativo, maior o rendimento do processo.

### **4.3. Cinética de crescimento, produção de acetoína, acetato de etila e etanol**

Os perfis de crescimento e produção de acetoína, acetato de etila e etanol para cada ensaio são apresentados nas Figuras 4.14 a 4.45.

Analisando-se as curvas podemos verificar que a fase de adaptação (fase lag) foi muito pequena para todos os ensaios fermentativos.

Podemos observar, ainda, que em todos os ensaios a produção de acetoína está associada ao crescimento da levedura, confirmando o que foi

anteriormente citado por Moritz (1998). A concentração máxima em células e em acetoína foi alcançada nas mesmas condições de cultura: concentração inicial de glicose igual a 49 g/l, temperatura de 30°C e pH 4,0 (Tabelas 4.11 e 4.12).

A concentração máxima de acetoína alcançada neste trabalho (Tabela 4.12) foi 84% maior que a encontrada por Romano *et al.* (1993), que citam que 48 cepas de *H. guilliermondii* produziram cerca de 200 mg/l de acetoína em mosto de uva. Esta diferença pode ser explicada pela falta de aeração do meio, já que o processo foi realizado sem agitação por 20 dias.

Em fermentador de bancada utilizando meio YM com 40 g/l de glicose e temperatura de 30°C, Moritz (1998) encontrou uma concentração máxima em acetoína de 334 mg/l, valor este semelhante ao alcançado neste trabalho (Tabela 4.12).

De acordo com a Tabela 4.11, os parâmetros máximos de crescimento celular foram encontrados a concentrações iniciais de glicose entre 30 e 49 g/l. Concentrações maiores de glicose disponibilizam piruvato para a produção de metabólitos secundários, aumentando os valores de conversão substrato em produto e produtividade (Tabela 4.12).

Quando a concentração de glicose é mínima, 17 g/l, o tempo necessário para o consumo total do substrato foi de aproximadamente 8 horas (Figura 4.22), porém as concentrações de acetoína e de células alcançadas foram baixas, 108 mg/l e 2,17 g/l, respectivamente.

Nas Figuras 4.15, 4.19 e 4.23 verificou-se que o tempo de 24 horas foi insuficiente para o consumo de todo o substrato, devido à alta concentração do mesmo, 68 g/l 68g/l e 81g/l, respectivamente. No entanto, a uma concentração de glicose idêntica às Figuras 4.15 e 4.19, em 24 horas, o substrato foi totalmente consumido

(Figura 4.17), demonstrando que o efeito sinérgico da alta temperatura (34°C) e baixo pH (4,4) induziu a uma maior velocidade de consumo de substrato pela levedura.

A conversão substrato em células e a velocidade específica máxima de crescimento da levedura (Tabela 4.11) alcançadas neste experimento confirmaram resultados anteriores. Moritz (1998), estudando concentrações iniciais de glicose de 15 e 40 g/l encontrou valores que variaram de 0,23 a 0,29 g/g e 0,44 a 0,72 h<sup>-1</sup>, para conversão substrato em células e velocidade específica máxima de crescimento, respectivamente.

As Tabela 4.11, 4.12 e 4.13 apresentam um resumo dos parâmetros cinéticos máximos encontrados durante a realização dos 16 ensaios.

**Tabela 4.11 – Parâmetros cinéticos máximos para o crescimento celular**

parâmetros cinéticos de crescimento celular	ensaio (figura)	concentração inicial de glicose (g/l)	Temperatura (°C)	pH inicial	
X <sub>máx</sub> (g/l)	11,2	13 (4.26)	49	30	4,0
μ <sub>máx</sub> (h <sup>-1</sup> )	0,52	5 (4.18)	30	26	5,6
Y <sub>x/s</sub> (g/g)	0,27	1 (4.14)	30	26	4,4
P <sub>x</sub> (g.l <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	0,62	13(4.26)	49	30	4,0

\* X<sub>máx</sub>: concentração celular máxima; μ<sub>máx</sub>: velocidade específica máxima de crescimento; Y<sub>x/s</sub>: conversão substrato em células; P<sub>x</sub>: produtividade em células.

**Tabela 4.12 – Parâmetros cinéticos máximos para a produção em acetoína**

parâmetros cinéticos de produção de acetoína	ensaio (figura)	concentração inicial de glicose (g/l)	Temperatura (°C)	pH inicial	
P <sub>máx</sub> (mg/l)	367	13(4.26)	49	30	4,0
Y <sub>p/s</sub> (mg/g)	7,7	4 (4.17)	68	34	4,4
P <sub>p</sub> (mg.l <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	23,1	4 (4.17)	68	34	4,4

\* P<sub>máx</sub>: concentração máxima do produto; Y<sub>p/s</sub>: conversão substrato em produto; P<sub>p</sub>: produtividade em produto.

**Tabela 4.13 – Parâmetros cinéticos máximos para a produção de etanol**

Parâmetros cinéticos de Produção de etanol	ensaio (figura)	Concentração inicial de glicose (g/l)	temperatura (°C)	pH inicial	
$P_{\text{máx}}$ (g/l)	9,57	14 (4.43)	49	30	6,0
$Y_{p/s}$ (g/g)	0,28	9 (4.38)	17	30	5,0
$P_p$ (g.l <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	0,58	3(4.32)	30	34	4,4

Nas condições experimentais do ensaio 2 (Figura 4.31), concentração de glicose inicial igual a 68g/l, temperatura de 26°C e pH de 4,4, todos os parâmetros cinéticos de produção de acetato de etila foram máximos. Sendo, 1,3 g/l; 0,026 g/g e 0,054 g/l.h a concentração máxima em acetato de etila, conversão substrato em produto e produtividade, respectivamente.

Nas Figuras 4.29 a 4.45 e Tabela 4.13, podemos verificar que ocorreu uma alta produção de etanol em quase todos os ensaios. De acordo com Nakashimada *et al.* (1998) tal fato pode ser atribuído à uma baixa taxa de aeração, já que esta era fornecida apenas pela agitação dos frascos, e também devido às altas concentrações de substrato (glicose) utilizadas. Já no ensaio 9 (Figura 4.38), onde utilizou-se a menor concentração de glicose, 17 g/l, foi obtida a menor concentração máxima de etanol, 4,9 g/l, pois a limitação da fonte de carbono fez com que a rota preferencial utilizada pelas leveduras levasse ao crescimento celular.

Moritz (1998), encontrou concentrações menores em etanol, já que seus ensaios foram realizados em fermentador de bancada, com agitação e aeração.

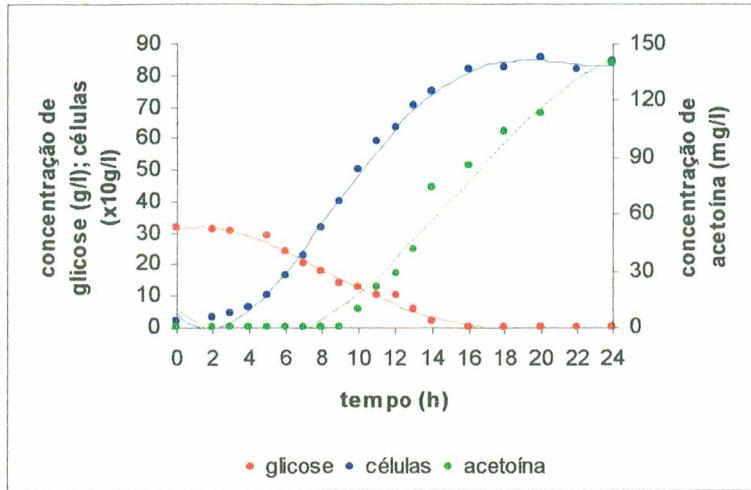


Figura 4.14 – Consumo de glicose, produção de acetoina e células do ensaio 1: concentração inicial de glicose igual a 30 g/l; temperatura de 26°C e pH inicial de 4,4

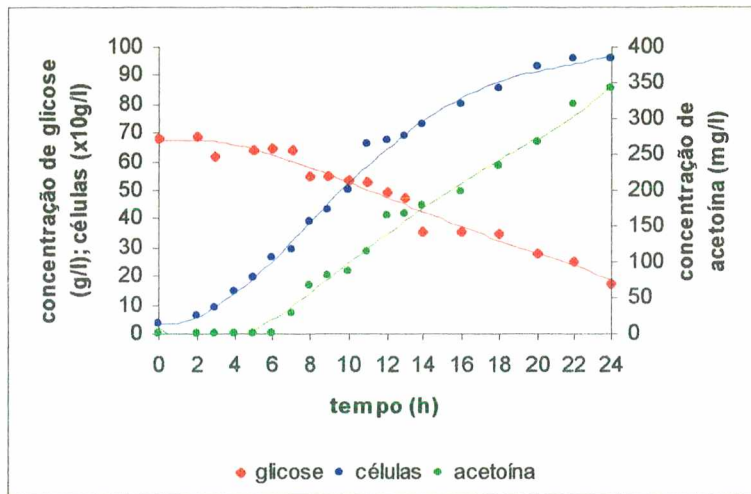


Figura 4.15 – Consumo de glicose, produção de acetoina e células do ensaio 2: concentração inicial de glicose igual a 68 g/l; temperatura de 26°C e pH inicial de 4,4

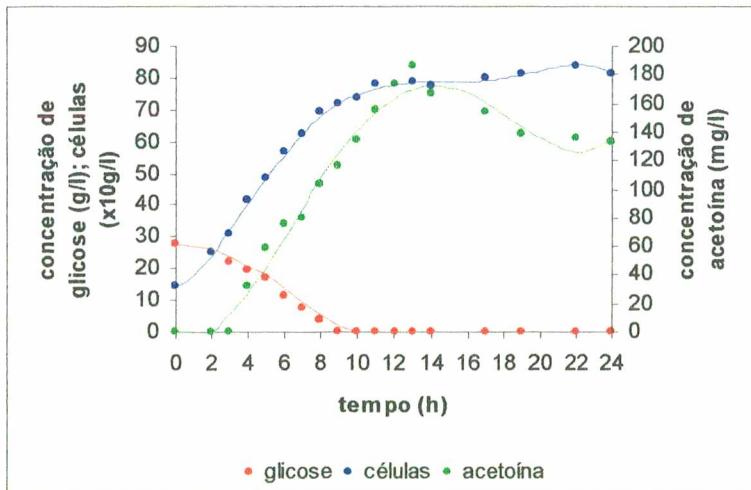


Figura 4.16 – Consumo de glicose, produção de acetoina e células do ensaio 3: concentração inicial de glicose igual a 30 g/l; temperatura de 34°C e pH inicial de 4,4

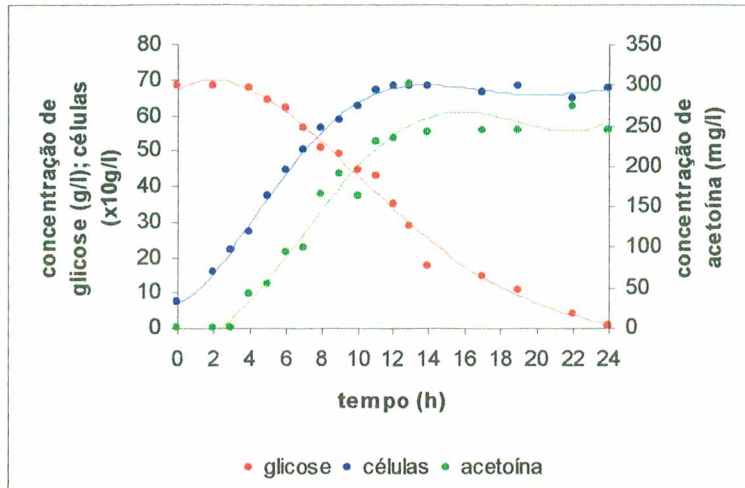


Figura 4.17 – Consumo de glicose, produção de acetoina e células do ensaio 4: concentração inicial de glicose igual a 68 g/l; temperatura de 34°C e pH inicial de 4,4

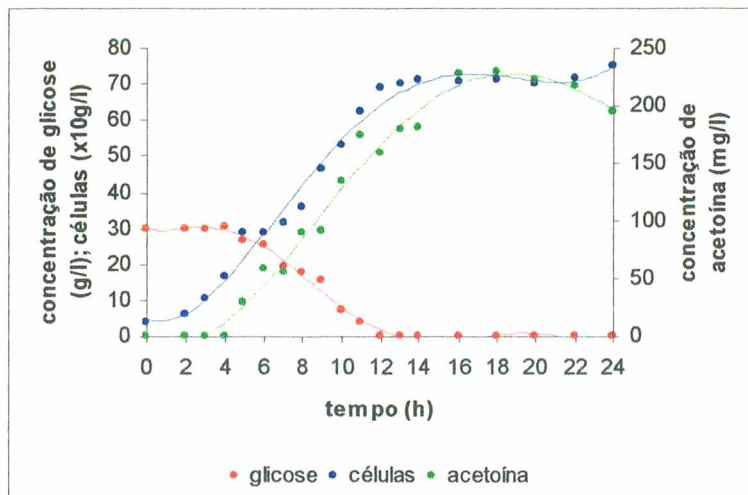


Figura 4.18 – Consumo de glicose, produção de acetoina e células do ensaio 5: concentração inicial de glicose igual a 30 g/l; temperatura de 26°C e pH inicial de 5,6

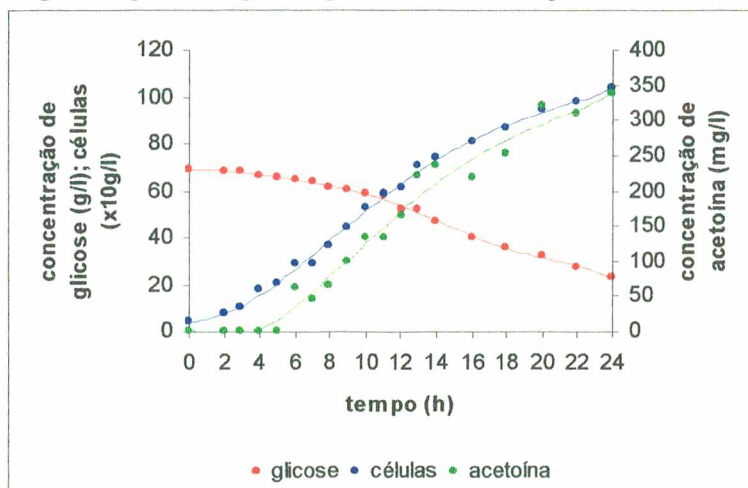


Figura 4.19 – Consumo de glicose, produção de acetoina e células do ensaio 6: concentração inicial de glicose igual a 68 g/l; temperatura de 26°C e pH inicial de 5,6

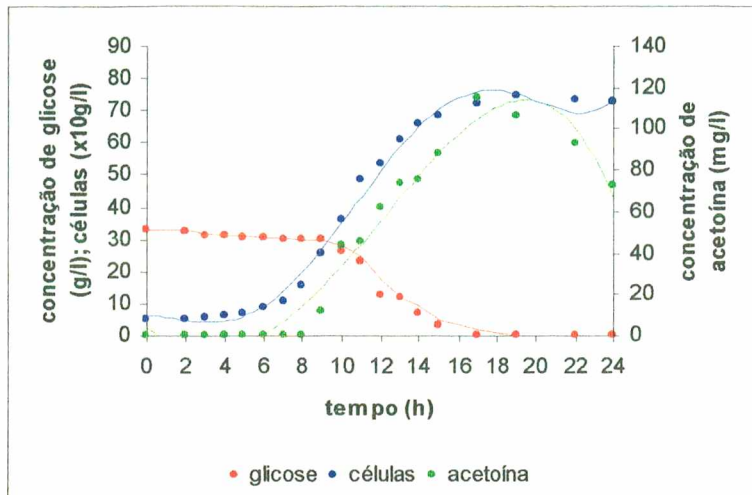


Figura 4.20 – Consumo de glicose, produção de acetoina e células do ensaio 7: concentração inicial de glicose igual a 30 g/l; temperatura de 34°C e pH inicial de 5,6

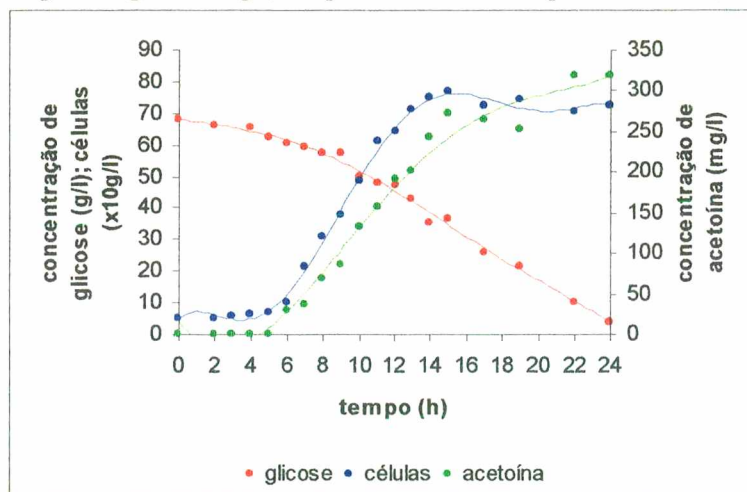


Figura 4.21 – Consumo de glicose, produção de acetoina e células do ensaio 8: concentração inicial de glicose igual a 68 g/l; temperatura de 34°C e pH inicial de 5,6

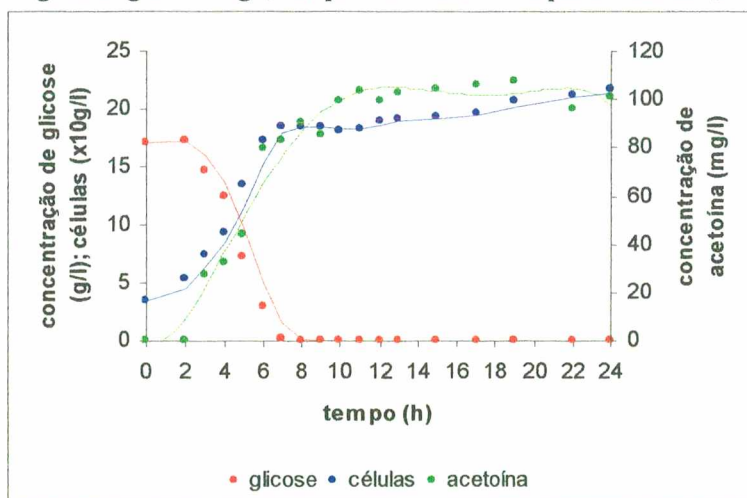


Figura 4.22 – Consumo de glicose, produção de acetoina e células do ensaio 9: concentração inicial de glicose igual a 17 g/l; temperatura de 30°C e pH inicial de 5,0



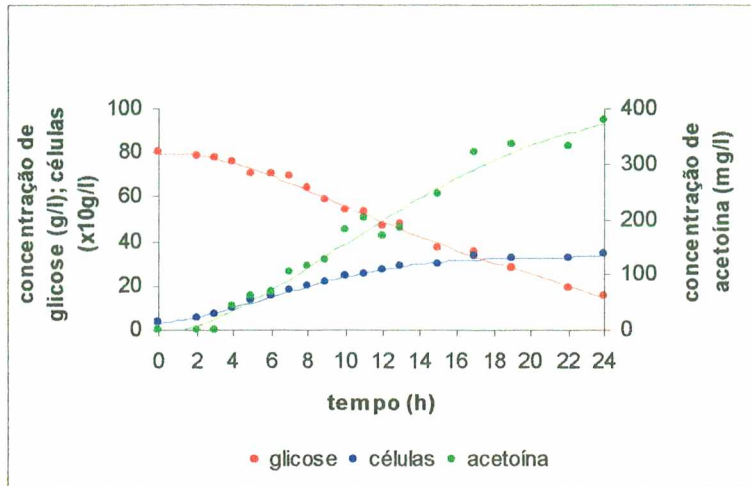


Figura 4.23 – Consumo de glicose, produção de acetoina e células do ensaio 10: concentração inicial de glicose igual a 81 g/l; temperatura de 30°C e pH inicial de 5,0

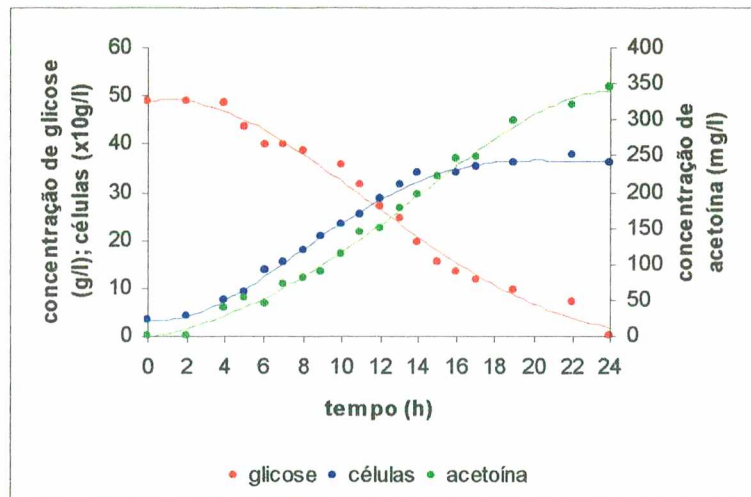


Figura 4.24 – Consumo de glicose, produção de acetoina e células do ensaio 11: concentração inicial de glicose igual a 49 g/l; temperatura de 24°C e pH inicial de 5,0

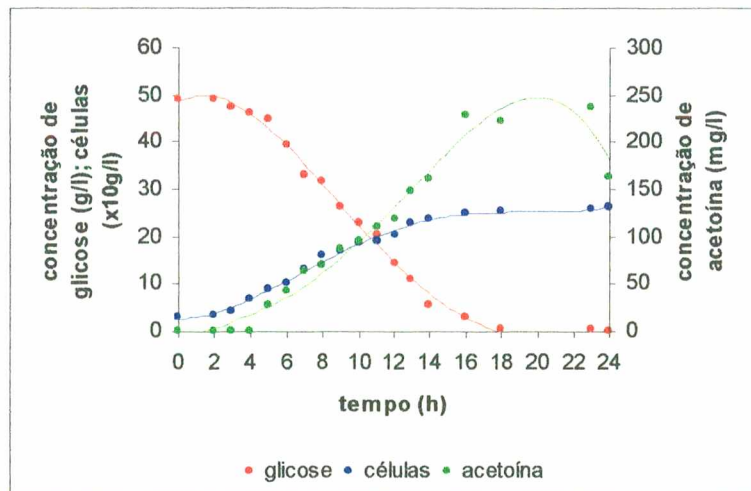


Figura 4.25 – Consumo de glicose, produção de acetoina e células do ensaio 12: concentração inicial de glicose igual a 49 g/l; temperatura de 36°C e pH inicial de 5,0

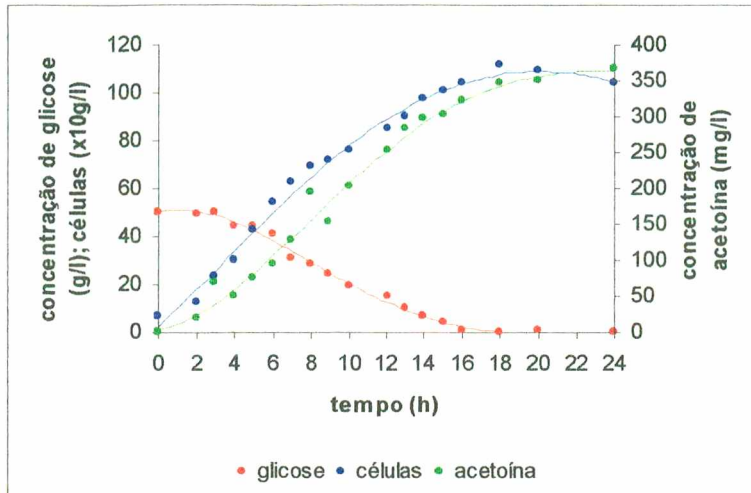


Figura 4.26 – Consumo de glicose, produção de acetoina e células do ensaio 13: concentração inicial de glicose igual a 49 g/l; temperatura de 30°C e pH inicial de 4,0

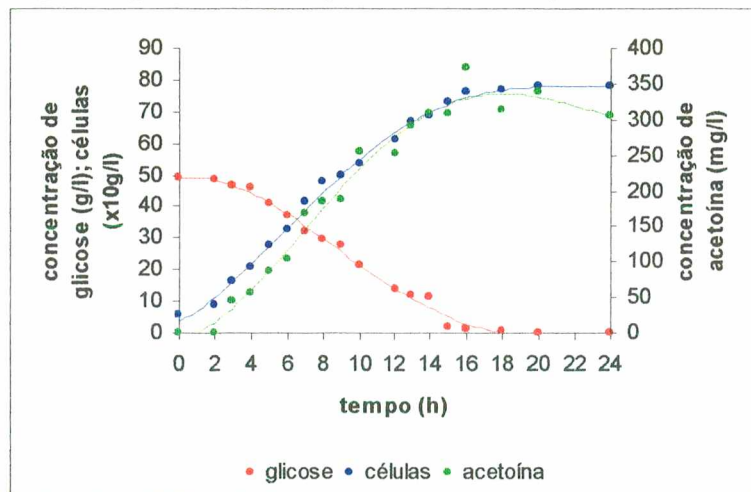


Figura 4.27 – Consumo de glicose, produção de acetoina e células do ensaio 14: concentração inicial de glicose igual a 49 g/l; temperatura de 30°C e pH inicial de 6,0

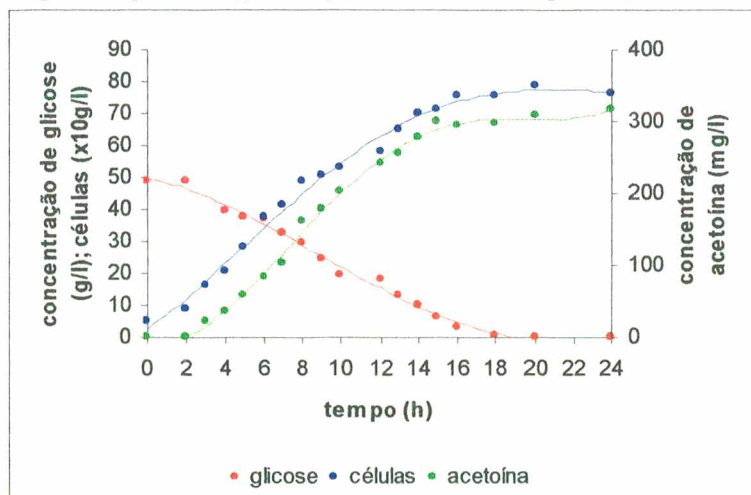


Figura 4.28 – Consumo de glicose, produção de acetoina e células do ensaio 15: concentração inicial de glicose igual a 49 g/l; temperatura de 30°C e pH inicial de 5,0

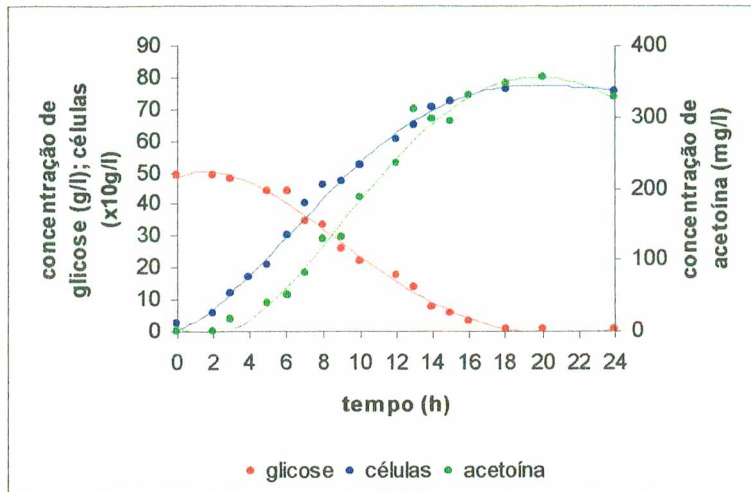


Figura 4.29 – Consumo de glicose, produção de acetoina e células do ensaio 16: concentração inicial de glicose igual a 49 g/l; temperatura de 30°C e pH inicial de 5,0

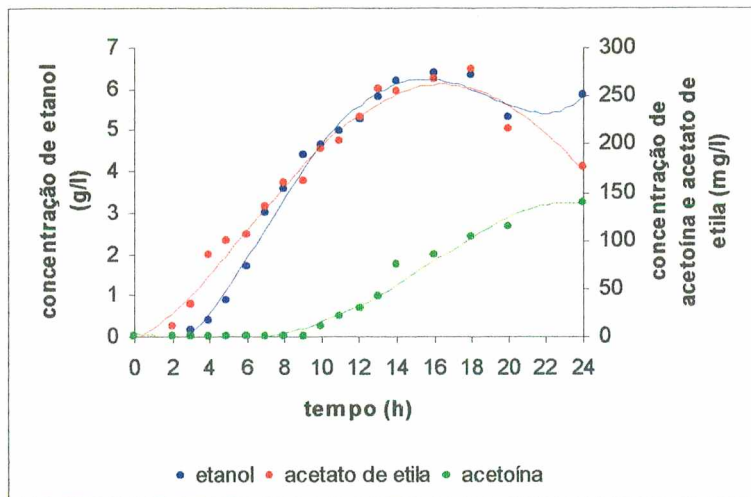


Figura 4.30 – Produção de acetoina, acetato de etila e etanol no ensaio 1: concentração inicial de glicose igual a 30 g/l; temperatura de 26°C e pH inicial de 4,4.

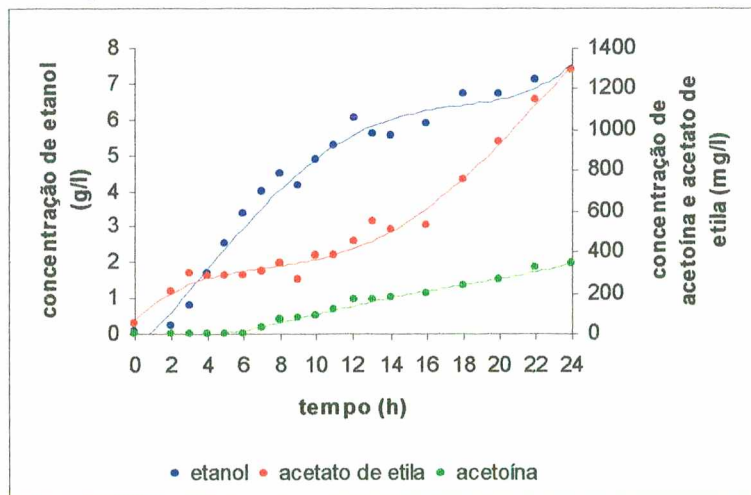


Figura 4.31 – Produção de acetoina, acetato de etila e etanol no ensaio 2: concentração inicial de glicose igual a 68 g/l; temperatura de 26°C e pH inicial de 4,4.

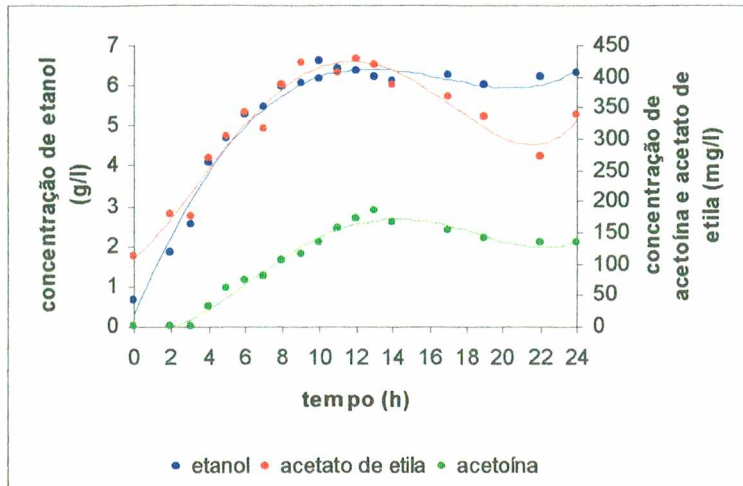


Figura 4.32 – Produção de acetoina, acetato de etila e etanol no ensaio 3: concentração inicial de glicose igual a 30 g/l; temperatura de 34°C e pH inicial de 4,4.

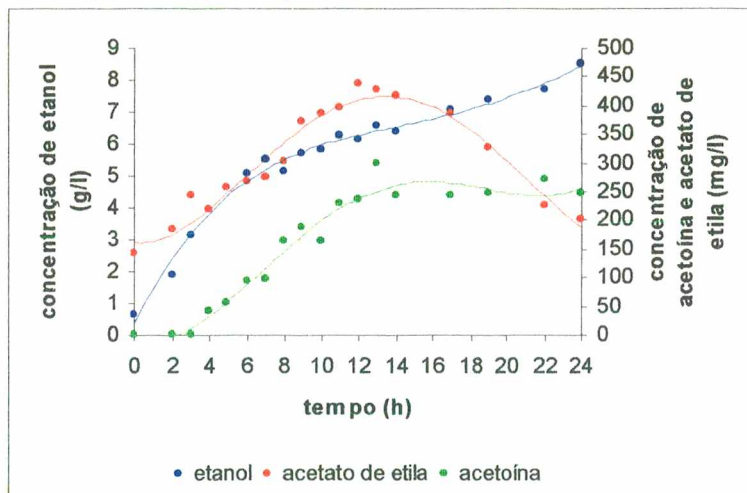


Figura 4.33 – Produção de acetoina, acetato de etila e etanol no ensaio 4: concentração inicial de glicose igual a 68 g/l; temperatura de 34°C e pH inicial de 4,4.

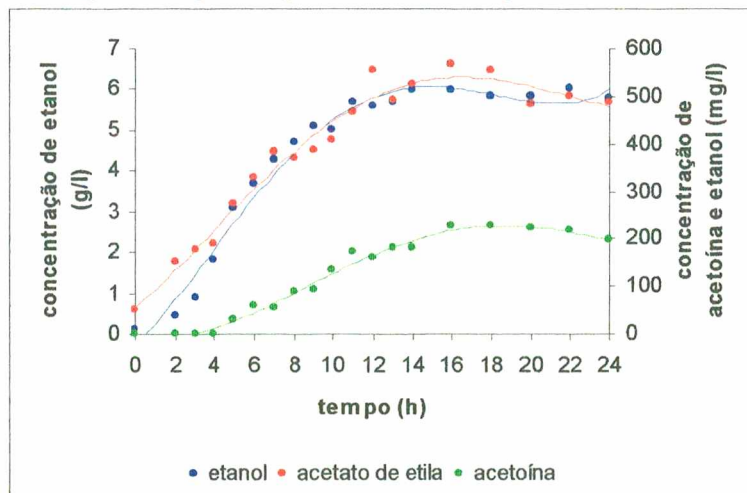


Figura 4.34 – Produção de acetoina, acetato de etila e etanol no ensaio 5: concentração inicial de glicose igual a 30 g/l; temperatura de 26°C e pH inicial de 5,6.

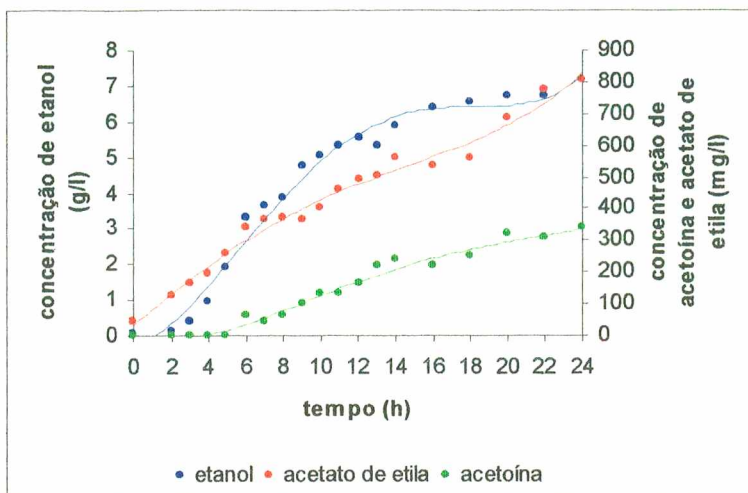


Figura 4.35 – Produção de acetoina, acetato de etila e etanol no ensaio 6: concentração inicial de glicose igual a 68 g/l; temperatura de 26°C e pH inicial de 5,6.

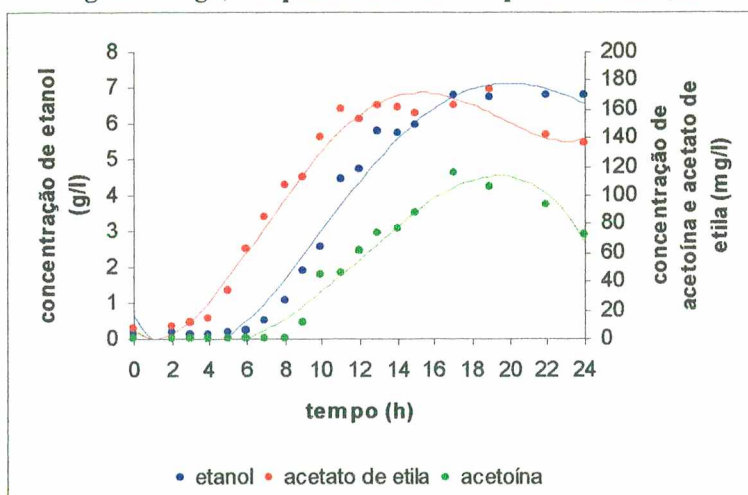


Figura 4.36 – Produção de acetoina, acetato de etila e etanol no ensaio 7: concentração inicial de glicose igual a 30 g/l; temperatura de 34°C e pH inicial de 5,6.

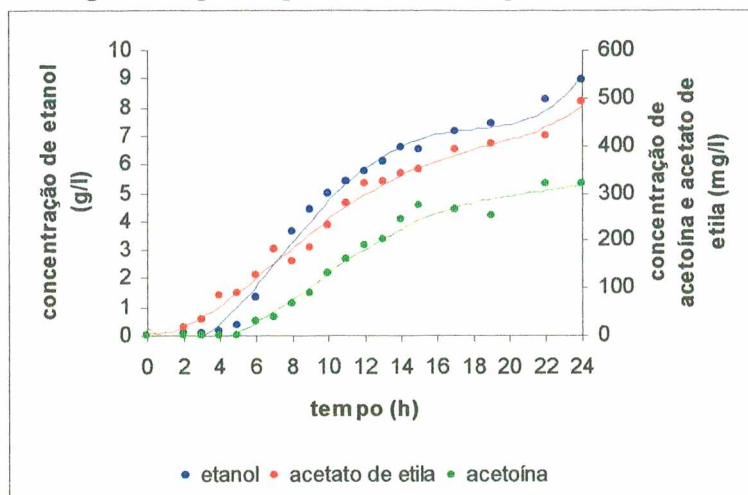


Figura 4.37 – Produção de acetoina, acetato de etila e etanol no ensaio 8: concentração inicial de glicose igual a 68 g/l; temperatura de 34°C e pH inicial de 5,6.

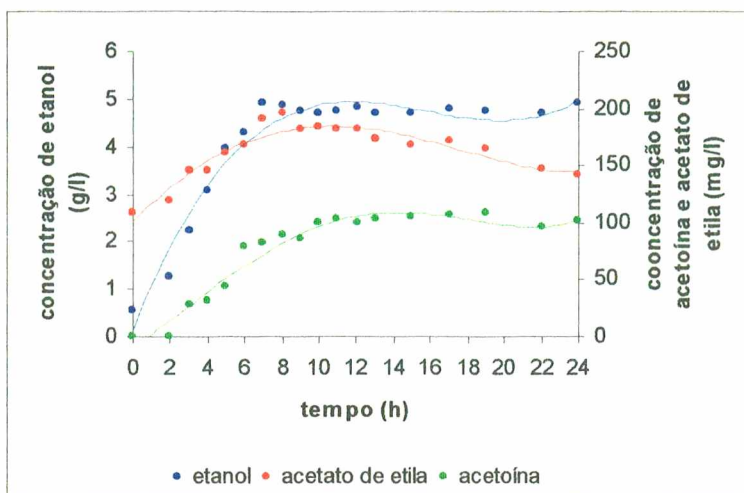


Figura 4.38 – Produção de acetoína, acetato de etila e etanol no ensaio 9: concentração inicial de glicose igual a 17 g/l; temperatura de 30°C e pH inicial de 5,0.

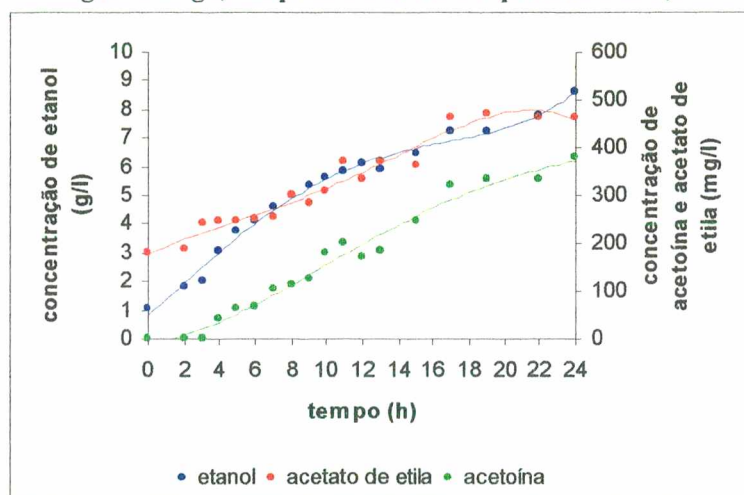


Figura 4.39 – Produção de acetoína, acetato de etila e etanol no ensaio 10: concentração inicial de glicose igual a 81 g/l; temperatura de 30°C e pH inicial de 5,0.

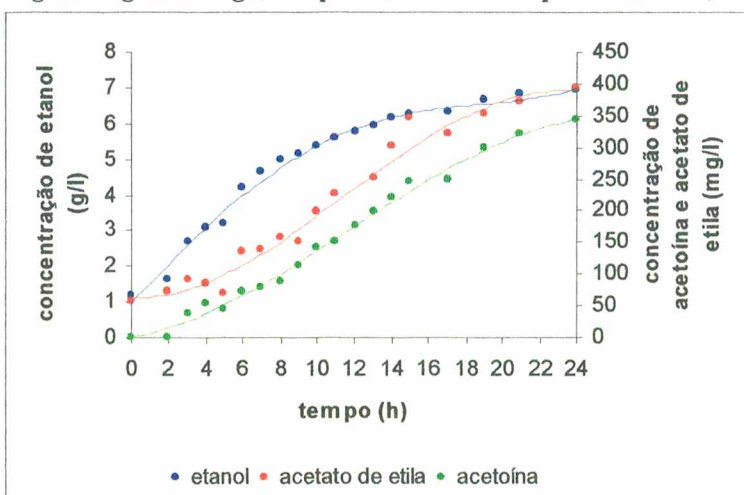


Figura 4.40 – Produção de acetoína, acetato de etila e etanol no ensaio 11: concentração inicial de glicose igual a 49 g/l; temperatura de 24°C e pH inicial de 5,0.

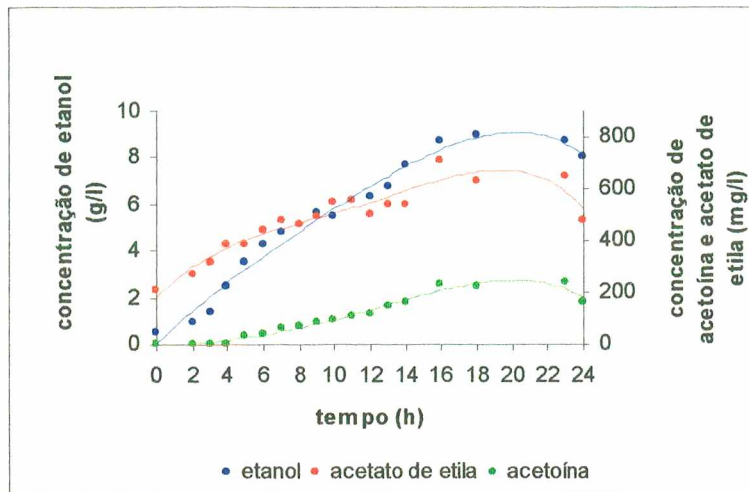


Figura 4.41 – Produção de acetoina, acetato de etila e etanol no ensaio 12: concentração inicial de glicose igual a 49 g/l; temperatura de 36°C e pH inicial de 5,0.

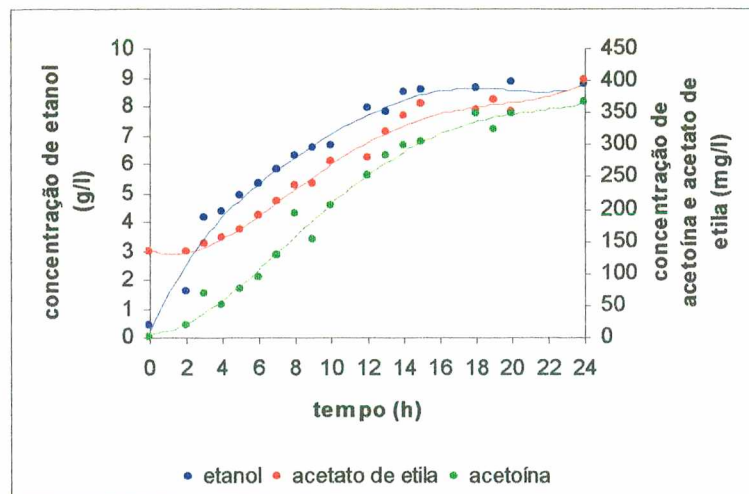


Figura 4.42 – Produção de acetoina, acetato de etila e etanol no ensaio 13: concentração inicial de glicose igual a 49 g/l; temperatura de 30°C e pH inicial de 4,0.

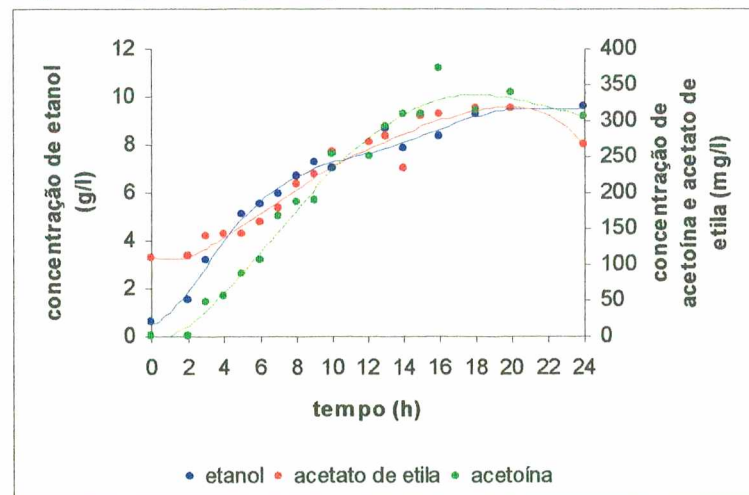


Figura 4.43 – Produção de acetoina, acetato de etila e etanol no ensaio 14: concentração inicial de glicose igual a 49 g/l; temperatura de 30°C e pH inicial de 6,0.

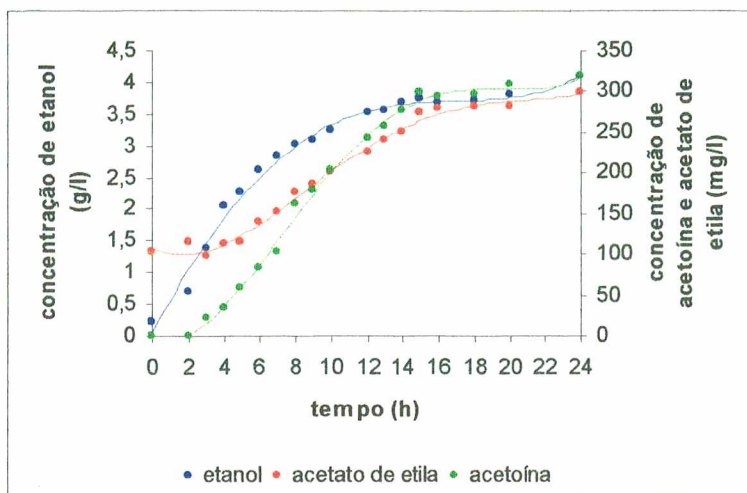


Figura 4.44 – Produção de acetoína, acetato de etila e etanol no ensaio 15: concentração inicial de glicose igual a 49 g/l; temperatura de 30°C e pH inicial de 5,0.

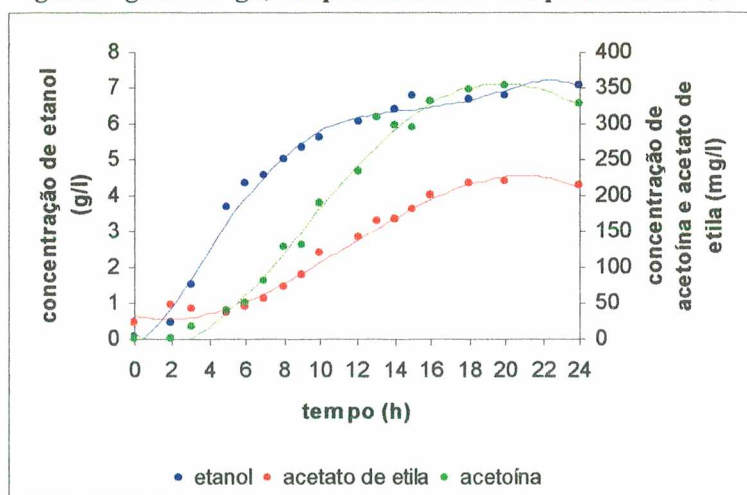


Figura 4.45 – Produção de acetoína, acetato de etila e etanol no ensaio 16: concentração inicial de glicose igual a 49 g/l; temperatura de 30°C e pH inicial de 5,0.



# **CONCLUSÕES**

## 5. CONCLUSÕES

A partir do trabalho desenvolvido estudaram-se algumas variáveis relevantes na produção biotecnológica de acetoína por *Hanseniaspora guilliermondii*: concentração inicial de glicose, temperatura e pH. Em função dos resultados obtidos foi possível chegar às seguintes conclusões:

- ✓ O planejamento experimental indicou como variáveis significativas a concentração inicial de glicose e a temperatura para a resposta em concentração máxima de acetoína.
- ✓ Os efeitos da temperatura e de interação temperatura e pH mostraram-se significativos para a resposta conversão substrato em acetoína.
- ✓ Para a resposta produtividade em acetoína, apresentaram-se significativos os efeitos da concentração inicial de glicose e da interação entre o pH e a temperatura.
- ✓ Os modelos empíricos construídos para a representar a concentração máxima em acetoína, a conversão substrato em produto e a produtividade apresentaram significância estatística.
- ✓ Somente os modelos para a concentração máxima e a produtividade em acetoína foram considerados preditivos.

- ✓ A otimização das condições de cultura apontou uma concentração inicial de 63 g/l de glicose e uma temperatura de 28°C para a obtenção de concentrações máximas em acetoína.
- ✓ Da otimização conjunta da produtividade e concentração de acetoína chegou-se às condições de concentração inicial de glicose igual a 64 g/l, temperatura de 30°C e pH 4,5.
- ✓ A concentração máxima obtida experimentalmente em acetoína foi de 367 mg/l.
- ✓ A concentração máxima obtida pelo modelo foi de 365 mg/l.
- ✓ A produção de acetoína está associada ao crescimento da levedura.
- ✓ As altas concentrações produzidas de etanol foram devidas à baixa aeração.
- ✓ A levedura em estudo produz concentrações consideráveis de acetato de etila.
- ✓ Não foi possível a determinação do diacetil pelo método cromatográfico utilizado.

# **SUGESTÕES**

## 6. SUGESTÕES

Os resultados observados neste trabalho sugerem algumas investigações futuras:

- A utilização de uma outra coluna cromatográfica para obter uma melhor separação dos compostos em estudo, principalmente acetoína e diacetil;
- A utilização de outros meios de cultura, talvez resíduos ricos em açúcares, a fim de diminuir o custo de produção de acetoína;
- A realização dos ensaios em fermentador de bancada com aeração, já que este é um fator fundamental na produção de acetoína;
- A verificação da influência da concentração de oxigênio dissolvido na produção de acetoína;
- A realização dos ensaios com pH controlado, utilizando-se sondas no fermentador;
- A avaliação do processo fermentativo em batelada alimentada.

# **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- ANTONIANI, C. & GUGNONI, S. (1941). L'acetilmetilcarbinolo nei vini. *Ann. Chim. Appl.* 31: 927-943. Em: ROMANO, P. & SUZZI, G. (1996). Origin and production of acetoin during wine yeast fermentation – a Review. **Applied and Environmental Microbiology**. 62 (2): 309-315.
- ANTONIANI, C. (1951). Ciò che si sa e ciò che si ignora sul chimismo della fermentazione alcolica. *Riv. Vitic. Enol. (Conegliano)*. 4: 183-196. Em: ROMANO, P. & SUZZI, G. (1996). Origin and production of acetoin during wine yeast fermentation – a Review. **Applied and Environmental Microbiology**. 62 (2): 309-315.
- ARMSTRONG, D. W.; MARTIN, S. M. and YAMAZAKI, H. (1984). Production of ethyl acetate from dilute ethanol solutions by *Candida utilis*. **Biotechnology and Bioengineering**, 26: 1038-1041.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S. and BRUNS, R. E. (1995). **Planejamento e Otimização de Experimentos**. Editora da UNICAMP, Campinas, 299p.
- BASSIT, N.; BOQUIEN, C.; PICQUE, D. and CORRIEU, G. (1993). Effect of initial oxygen concentration on diacetyl and acetoin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*. **Applied and Environmental Microbiology**, 59 (6): 1893-1897.
- BERGER, R. G. (1995). **Aroma Biotechnology**, Ed. Springer - Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 240p.
- BOUMERDASSI, H.; MONNET, C.; DESMAZEAUD, M. and CORRIEU, G. (1997). Isolation and properties of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CNRZ 483 mutants producing diacetyl and acetoin from glucose. **Applied and Environmental Microbiology**, 63(6): 2293-2299.

- BOX, G. E. P. ; HUNTER, W. G. and HUNTER, J. S. (1978). **Statistics for Experimenters**. An introduction to design, data analysis and model building, N. Y., Wiley.
- BURGER, M.; GLENISTER, P. and LAUTCABACH, A. (1958). Diacetyl studies. III. Further studies on the prevention and removal of diacetyl in beer., Proceedings of the Annual Meeting of the American Society of Brewing Chemists. Jones Press, Inc. Minneapolis, 80-85. Em: ROMANO, P. & SUZZI, G. (1996). Origin and production of acetoin during wine yeast fermentation – a Review. **Applied and Environmental Microbiology**. 62 (2): 309-315.
- CACHÓN, R. & DIVIÉS, C. (1993). A descriptive model for citrate utilization by *Lactococcus lactis* ssp *lactis* by *diacetylactis*. **Biotechnology Letters**, 15 (8): 837-842.
- CHEETHAM, P. (1993). The use of biotransformations for the production of flavours and fragrances. **Trends in Biotechnology**. 11: 478-488.
- CHRISTEN, P. & MUNGUIA, A. L. (1994). Enzymes and food flavor – a Review. **Food Biotechnology**. 8(2&3): 167-190.
- CHRISTEN, P. & RAIMBAULT, M. (1991). Optimization of culture medium for aroma production by *Ceratocystis fimbriata*. **Biotechnology Letters**.13(7): 521-526.
- CHUANG, L. & COLLINS, E. (1968). Biosynthesis of diacetyl in bacteria and yeast. **Journal of Bacteriology**, 95(4): 2083-2089.
- COLLINS, E. (1972). Biosynthesis of flavour compounds by microorganisms. **Journal of Dairy Science**. 55(7): 1022-1028.



- CROWELL, E. A. & GUYMON, J. F. (1963). Influence of aeration and suspended material on higher alcohols, acetoin and diacetyl during fermentation. *An. J. Enol. Vitic.*, 14: 214-222. Em: ROMANO, P. & SUZZI, G. (1996). Origin and production of acetoin during wine yeast fermentation – a Review. **Applied and Environmental Microbiology**. 62 (2): 309-315.
- DE MAN, J. (1959). The formation of diacetyl and acetoin from  $\alpha$  - acetolactic acids. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas. Belg.*, 78: 480. Em: ROMANO, P. & SUZZI, G. (1996). Origin and production of acetoin during wine yeast fermentation – a Review. **Applied and Environmental Microbiology**. 62 (2): 309-315.
- DE MAS, C; JANSEN, N. B. and TSAO, G. T. (1988). Production of optically active 2,3-butanediol by *Bacillus polymyxa*. **Biotechnology and Bioengineering**., 31: 366-377.
- DEIANA, P. ; CECCHI, L. ; LODI, R. ; BERARDI, E. ; FARRIS, G. A. and FATICHENTI, F. (1990). Some aspects of diacetyl and acetoin production by *Debaromyces hansenii*. **Italian Journal Food Science**., 1: 35-42.
- DENEUVILLE, F. (1991). **Génie Fermentaire**. Biosciences et Techniques. Biotechnologies. VI. Optimization des cultures., doin éditeurs, Paris, 307p.
- DIFCO, Manual** (1984). Medios de cultivo deshidratados y reactivos para microbiología., DIFCO Laboratories, 10<sup>a</sup> ed.
- DITTRICH, H. H. and ESCHENBRUCH, R. (1968). Die acetoin synthese der hefe bei anaerob / aerob- Weschel und  $\text{NH}_4^+$  - Zusatz. *Arch. Mikrobiol.*, 63: 63 - 69. Em: ROMANO, P. & SUZZI, G. (1996). Origin and production of acetoin during wine yeast fermentation – a Review. **Applied and Environmental Microbiology**. 62 (2): 309-315.
- DUBOIS, P. (1994). Les arômes des vins et leurs défauts. *Rev. Fr. Enol.* 145 : 27 - 40.

- FABRE, C. (1995). Nouveaux procedes de production d'arômes naturels par bioconversion. Toulouse: L'Institut National des Sciences Apliquees de Toulouse. **These (Doctorat espevialité biologie et genetique moleculaires et cellulaires – biotehnologie)**, 202p.
- GATFIELD, I. L.; HAARMAN & REIMER. (1995). Enzymatic and microbial generation of flavors. **Perfurmer & Flavorist**. 20: 5-14.
- GEIGER, E. and PIENDL, A. (1975). Technological factors in the formation of acetolactate and acetohydroxybutyrate during fermentation. *Brew. Dig.*, 67: 50- 63. Em: ROMANO, P. & SUZZI, G. (1996). Origin and production of acetoin during wine yeast fermentation – a Review. **Applied and Environmental Microbiology**. 62 (2): 309-315.
- HARVEY, R. J. and COLLINS, E. B. (1962). Citrate transport system of *Streptococcus diacetylactis*. *J. Bacteriol.*, 83: 1005. Em: COLLINS, E. (1972). Biosynthesis of flavour compounds by microorganisms. **Journal of Dairy Science**. 55(7): 1022-1028.
- HARVEY, R. J. and COLLINS, E. B. (1963). Roles of citrate and acetoin in the metabolism of the *Streptococcus diacetylactis*. *J. Bacteriol.*, 86: 1301. Em: COLLINS, E. (1972). Biosynthesis of flavour compounds by microorganisms. **Journal of Dairy Science**. 55(7): 1022-1028.
- HAUKELI, A. D. & LIES, S. (1972). Production of diacetyl, 2-acetolactate and acetoin by yeasts during fermentation. **Journal of the Institute of Brewing**, 78: 229 - 232.
- HEIDLAS, J. and TRESSL, R. (1990). Purification and properties of two oxidoreductases catalyzing the enantioseletive reduction of diacetyl and other ketones from baker's yeast. *Eur. J. Biochem.*, 188: 165-174.
- HUGHES, C. (1994). **Guía de Aditivos**, Editorial Acribia S.A, Zaragoza, 190p.

- INOUE, T. (1974). Influence of temperature on formation of acetohydroxy acids by brewer's yeast. Rep. Res. Lab. Kirin. Brew. Co. Ltd., 17: 25-27. Em: ROMANO, P. & SUZZI, G. (1996). Origin and production of acetoin during wine yeast fermentation – a Review. **Applied and Environmental Microbiology**. 62 (2): 309 - 315.
- INOUE, T.; MURAYAMA, M.; KAJINO, K.; Kamiya, T.; MITSUI, S. & MAWATARI, M. (1991). Direct spontaneous conversion of acetolactate into non-diacetyl substance in fermenting wort, Proceedings of European Brewing Convention, 23<sup>rd</sup> Congress, IRL Press, Oxford, p. 369.
- JANSEN, N. B; TSAO, G. T. (1983). Bioconversion of pentoses to 2,3 - butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. **Ad. Biochem. Eng. Biotechnology Bioeng.**, 27: 85-99.
- JUNI, E. (1952). Mechanisms of the formation of acetoin by yeast and mammalian tissues. J. Biol. Chem., 195: 727 - 734. Em: ROMANO, P. & SUZZI, G. (1996). Origin and production of acetoin during wine yeast fermentation – a Review. **Applied and Environmental Microbiology**. 62 (2): 309-315.
- LEGEAY, O.; RATOMAHEMINA, R. and GALZY P. (1989). Study of diacetyl reductase in a polyploid brewing strain of *Saccharomyces carlsbergensis*. Agric. Biol. Chem., 16: 423-427.
- LEVEAU, J. Y. & BOUIX, M. (1984) III. Cinéticas Microbianas. Em: SCRIBAN, R. **Biotecnologia**. Editora Manole Ltda., 490p.
- MACEDO, G. A. (1997). Síntese de ésteres de aroma por lipases microbianas em meio livre de solvente orgânico. **Tese de Doutorado (Ciência de Alimentos)**, UNICAMP, Campinas, SP.
- Merck Index, The** (1983). Merck & Co. Inc., 10<sup>th</sup> ed., New Jersey.

- MILLER, M. W. & PHAFF, H. (1958). A comparative study of the apiculate yeasts. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 10: 113-141. Em: ROMANO, P.; SUZZI, G.; ZIRONI, R. and COMI, G. (1993). Biometric study of acetoin production in *Hanseniaspora guilliermondii* and *Kloeckera apiculata*. **Applied and Environmental Microbiology**. 59(6): 1838-1841.
- MORITZ, D. (1998). Estudo do crescimento de três leveduras produtoras de aromas. **Dissertação de Mestrado (Biotecnologia)**, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC.
- NAKASHIMADA, Y.; KANAI, K. and NISHIO, N. (1998). Optimization of dilution rate, pH and oxygen supply on optical purity of 2,3 - butanediol produced by *Paenibacillus polymyxa* in chemostat culture. **Biotechnology Letters.**, 20(12): 1133-1138.
- NAVARRO, C. (1996). Otimização de um meio de cultura para produção de *Candida utilis* a partir de glicerol. **Dissertação de Mestrado (Engenharia Química)**. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC.
- NORDSTRÖM, K. (1964). *Sven. Kem. Tidskr.*, 76 (9). Em: ARMSTRONG, D. W.; MARTIN, S. M. and YAMAZAKI, H. (1984). Production of ethyl acetate from dilute ethanol solutions by *Candida utilis*. **Biotechnology and Bioengineering.**, 26: 1038-1041.
- PASTORE, G.; SATO, H.; YANG, T.; PARK, Y. & MIN, D. (1994). Production of fruity aroma by newly isolated yeast. **Biotechnology Letters**. 16(4); 389-392.
- REZANKA, T; LÍBALOVÁ, D; VOTRUBA, J. and VIDEN, I. (1994). Identification of odours compounds from *Streptomyces avermetilis*. **Biotechnology Letters**. 16 (1): 75-78.

- ROMANO, P. & SUZZI, G. (1992). The effect of *Saccharomyces cerevisiae* strains on the formation of acetaldehyde and acetoin during fermentation. **Proceedings of Technical Meeting of the European Brewing Convention**, Zoeterxolvole, The Netherlands, 231-247.
- ROMANO, P. & SUZZI, G. (1996). Origin and production of acetoin during wine yeast fermentation – a Review. **Applied and Environmental Microbiology**. 62 (2): 309-315.
- ROMANO, P.; SUZZI, G.; COMI, G.; ZIRONI, R. and MAIFRENI, M. (1997). Glycerol and other fermentation products of apiculate wine yeasts. **Journal of Applied Microbiology**., 82: 615-618.
- ROMANO, P.; SUZZI, G.; ZIRONI, R. and COMI, G. (1993). Biometric study of acetoin production in *Hanseniaspora guilliermondii* and *Kloeckera apiculata*. **Applied and Environmental Microbiology**. 59(6): 1838-1841.
- ROSINI, G. & CIANI, M. (1992). I livieti basso produttori di etanolo. **Proceedings of the X Congresso Nazionale della Società Italiana di Alcologia**. Editrici Compositori, Bologna, Italy.
- SANDINE, W. E.; ELLIKER, P. R. and PACK, M. Y. (1965). Use of diacetyl reductase to remove diacetyl from beer. *M.B.A.A. Tech. Quart.*, 2 : 155. Em: COLLINS, E. (1972). Biosynthesis of flavour compounds by microorganisms. **Journal of Dairy Science**. 55(7): 1022-1028.
- SANTOS, F. (1998). Obtenção de cebola seca utilizando pré - tratamento por desidratação osmótica em mistura de solutos. **Dissertação de Mestrado (Engenharia Química)**, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC.
- SCHWARZ, J. G. and HANG, Y. D. (1994). Purification and characterization of diacetyl reductase from *Kluyveromyces marxianus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 18: 272 - 276.

- SEITZ, E. W.; SANDINE, W. E.; ELLIKER, P. R. and DAY, E. A. (1963). Studies on diacetyl biosynthesis by *Streptomyces diacetylactis*. *Can. J. Microbiol.*, 9: 431 - 441.
- Em: ROMANO, P. & SUZZI, G. (1996). Origin and production of acetoin during wine yeast fermentation – a Review. **Applied and Environmental Microbiology**. 62 (2): 309-315.
- SIMÃO, A. M. (1986). **Aditivos para Alimentos sob o Aspecto Toxicológico**, Livraria Nobel S.A., 274p.
- SMITH, M. T. (1984). **Systematic discussion of the species. In the Yeast. A taxonomic study.**, Elsevier Science Publisher B. V., Amsterdam.
- SOMOGYI, L.; RHOMBERG, B. & TAKEI, N. (1996). Flavors and fragrances. <http://www~cmrc.sri.com/CIN/january-february96/article13.html>
- SOMOGYI, L; JANSHEKAR, H. & TAKEI, N. (1998). Aroma chemicals and the flavor and fragrance industry. *Chemical Economics Handbook*. <http://www~cmrc.sri.com/CIN/1998/april-june/article04.html>
- STATISTICA. (1995). **Statistica Guia do Usuário**. Versão 5.0, Statsoft, Capítulo 3.
- TABACHNICK, J. and JOSLYN, M. A. (1955). *J. Bacteriol.*, 65 (1). Em: ARMSTRONG, D. W.; MARTIN, S. M. and YAMAZAKI, H. (1984). Production of ethyl acetate from dilute ethanol solutions by *Candida utilis*. **Biotechnology and Bioengineering**, 26: 1038-1041.
- VERDUYN, C.; BREEDVELD, G. J.; SCHEFFERS, W. A. and VAN DIJKEN, J. P. (1988). Purification and properties of dihydroxyacetone reductase and 2,3-butanediol dehydrogenase from *Candida utilis* CBS 621. *Yeast*, 4: 127-133.
- VITOLLO, M. (1994). Enzimologia industrial para alimentos. **Boletim de Biotecnologia**.

WAINWRIGHT, T. (1973). Diacetyl – a Review. I. Analytical and biochemical considerations. II. Brewing experience. *J. Inst. Brew.*, 79: 451-470. Em: ROMANO, P. & SUZZI, G. (1996). Origin and production of acetoin during wine yeast fermentation – a Review. ***Applied and Environmental Microbiology***. 62 (2): 309 - 315.

WICKERHAM, L. J. (1951). Taxonomy of yeasts. I. Techniques of Classification. U. S. Department of Agriculture Technical Bulletin 1029. U.S. Department of Agriculture, Washington, D. C. Em: ROMANO, P.; SUZZI, G.; ZIRONI, R. and COMI, G. (1993). Biometric study of acetoin production in *Hanseniaspora guilliermondii* and *Kloeckera apiculata*. ***Applied and Environmental Microbiology***. 59 (6): 1838 - 1841.

# **ANEXOS**



## Tabelas geradoras das figuras 4.14 a 4.45

Tabela 1 – Cinética de crescimento e produção de metabólitos no ensaio 1

Tempo (h)	Conc. de glicose (g/l)	Conc. de células (x10g/l)	Conc. de acetoina (mg/l)	Conc. de acetato de etila (mg/l)	Conc. de etanol (g/l)
0	31	2	0	0	0
2	31	3	0	11	0
3	30	4	0	33	0
4		7	0	85	0
5	29	10	0	100	1
6	24	16	0	106	2
7	20	23	0	133	3
8	18	32	0	159	4
9	14	40	0	161	4
10	12	50	9	195	5
11	10	59	21	203	5
12	10	64	29	227	5
13	6	70	41	256	6
14	2	75	74	254	6
16	0	82	85	267	6
18	0	82	103	276	6
20	0	85	113	215	5
22	0	82			
24	0	84	140	176	6

\* concentração inicial de glicose: 30g/l; temperatura: 26°C; pH: 4,4

Tabela 2 – Cinética de crescimento e produção de metabólitos no ensaio 2

Tempo (h)	Conc. de glicose (g/l)	Conc. de células (x10g/l)	Conc. de acetoina (mg/l)	Conc. de acetato de etila (mg/l)	Conc. de etanol (g/l)
0	68	3	0	53	0
2	68	6	0	204	0
3	62	9	0	296	1
4		15	0	281	2
5	64	19	0	280	2
6	65	26	0	287	3
7	64	29	29	307	4
8	55	39	65	347	4
9	55	43	82	266	4
10	53	50	85	383	5
11	52	66	114	382	5
12	49	68	165	447	6
13	47	69	167	553	6
14	36	73	178	513	5
16	35	80	196	525	6
18	35	86	235	751	7
20	28	93	268	939	7
22	25	96	318	1148	7
24	18	96	342	1297	7

\* concentração inicial de glicose: 68g/l; temperatura: 26°C; pH: 4,4

**Tabela 3 – Cinética de crescimento e produção de metabólitos no ensaio 3**

Tempo (h)	Conc. de glicose (g/l)	Conc. de células (x10g/l)	Conc. de acetoina (mg/l)	Conc. de acetato de etila (mg/l)	Conc. de etanol (g/l)
0	28	15	0	113	0
2	25	25	0	178	2
3	22	31	0	176	2
4	20	42	33	267	4
5	17	48	60	303	5
6	11	57	75	343	5
7	7	62	80	315	5
8	4	69	104	388	6
9	0	72	116	421	6
10	0	74	134	423	6
11	0	78	156	406	6
12	0	78	173	428	6
13	0	79	186	419	6
14	0	77	166	386	6
17	0	80	154	367	6
19	0	81	139	335	6
22	0	84	135	271	6
24	0	81	133	339	6

\* concentração inicial de glicose: 30g/l; temperatura: 34°C; pH: 4,4

**Tabela 4 – Cinética de crescimento e produção de metabólitos no ensaio 4**

Tempo (h)	Conc. de glicose (g/l)	Conc. de células (x10g/l)	Conc. de acetoina (mg/l)	Conc. de acetato de etila (mg/l)	Conc. de etanol (g/l)
0	68	7	0	141	1
2	68	16	0	185	2
3		22	0	244	3
4	68	27	42	220	4
5	64	37	54	255	5
6	62	45	94	266	5
7	56	50	98	273	5
8	50	56	164	303	5
9	49	59	188	370	6
10	45	62	162	384	6
11	42	67	230	394	6
12	35	68	235	439	6
13	29	68	300	428	6
14	17	68	242	417	6
17	15	66	244	384	7
19	11	68	245	326	7
22	4	65	272	224	8
24	0	68	245	200	8

\* concentração inicial de glicose: 68g/l; temperatura: 34°C; pH: 4,4

**Tabela 5 – Cinética de crescimento e produção de metabólitos no ensaio 5**

Tempo (h)	Conc. de glicose (g/l)	Conc. de células (x10g/l)	Conc. de acetoina (mg/l)	Conc. de acetato de etila (mg/l)	Conc. de etanol (g/l)
0	30	4	0	49	0
2	30	6	0	150	0
3	30	10	0	177	1
4	30	16	0	190	2
5	27	28	29	274	3
6	25	29	59	326	4
7	19	32	56	382	4
8	18	36	90	369	5
9	15	46	92	387	5
10	7	53	134	407	5
11	4	62	174	466	6
12	0	69	158	553	6
13	0	70	179	493	6
14	0	71	181	525	6
16	0	70	228	565	6
18	0	71	229	553	6
20	0	70	223	483	6
22	0	72	217	500	6
24	0	75	195	486	5

\* concentração inicial de glicose: 30g/l; temperatura: 26°C; pH: 5,6

**Tabela 6 – Cinética de crescimento e produção de metabólitos no ensaio 6**

Tempo (h)	Conc. de glicose (g/l)	Conc. de células (x10g/l)	Conc. de acetoina (mg/l)	Conc. de acetato de etila (mg/l)	Conc. de etanol (g/l)
0	69	4	0	41	0
2	68	7	0	126	0
3	68	10	0	163	0
4	66	18	0	192	1
5	65	20	0	255	2
6	65	29	62	338	3
7	64	29	46	363	4
8	61	37	65	370	4
9	60	44	98	368	5
10	59	53	132	404	5
11	58	58	134	461	5
12	52	62	163	493	6
13	52	71	222	505	5
14	47	74	236	560	6
16	40	81	218	538	6
18	36	87	252	562	6
20	32	94	319	687	7
22	27	98	309	774	7
24	23	104	338	808	7

\* concentração inicial de glicose: 68g/l; temperatura: 26°C; pH: 5,6

**Tabela 7 – Cinética de crescimento e produção de metabólitos no ensaio 7**

Tempo (h)	Conc. de glicose (g/l)	Conc. de células (x10g/l)	Conc. de acetoina (mg/l)	Conc. de acetato de etila (mg/l)	Conc. de etanol (g/l)
0	33	5	0	7	0
2	32	5	0	8	0
3	31	6	0	11	0
4	31	6	0	14	0
5	30	7	0	33	0
6	30	8	0	63	0
7	29	11	0	84	0
8	28	15	0	107	1
9	27	25	11	112	2
10	26	36	44	140	3
11	23	49	45	160	4
12	12	54	62	152	5
13	12	61	74	162	6
14	7	65	76	161	6
15	3	68	88	157	6
17	0	72	115	162	7
19	0	74	106	173	7
22	0	73	93	142	7
24	0	72	72	135	7

\* concentração inicial de glicose: 30g/l; temperatura: 34°C; pH: 4,4

**Tabela 8 – Cinética de crescimento e produção de metabólitos no ensaio 8**

Tempo (h)	Conc. de glicose (g/l)	Conc. de células (x10g/l)	Conc. de acetoina (mg/l)	Conc. de acetato de etila (mg/l)	Conc. de etanol (g/l)
0	68	5	0	0	0
2	66	5	0	18	0
3		6	0	35	0
4	66	6	0	84	0
5	62	7	0	89	0
6	60	10	28	124	1
7	59	22	36	179	3
8	57	31	69	156	4
9	57	38	86	186	4
10	50	48	132	232	5
11	48	61	157	275	5
12	47	64	191	318	6
13	42	71	200	325	6
14	35	75	243	342	7
15	37	76	272	347	6
17	26	72	265	391	7
19	21	74	253	403	7
22	10	71	319	418	8
24	3	72	318	493	9

\* concentração inicial de glicose: 68g/l; temperatura: 34°C; pH: 5,6

**Tabela 9 – Cinética de crescimento e produção de metabólitos no ensaio 9**

Tempo (h)	Conc. de glicose (g/l)	Conc. de células (x10g/l)	Conc. de acetoina (mg/l)	Conc. de acetato de etila (mg/l)	Conc. de etanol (g/l)
0	17	3	0	108	0
2	17	5	0	120	1
3	15	7	27	145	2
4	12	9	32	144	3
5	7	14	44	161	4
6	3	17	79	168	4
7	0	18	82	190	5
8	0	18	90	196	5
9	0	18	85	182	5
10	0	18	99	183	5
11	0	18	103	182	5
12	0	19	99	181	5
13	0	19	102	172	5
15	0	19	105	167	5
17	0	20	106	171	5
19	0	21	108	164	5
22	0	21	96	147	5
24	0	22	101	142	5

\* concentração inicial de glicose: 17g/l; temperatura: 30°C; pH: 5,0

**Tabela 10 – Cinética de crescimento e produção de metabólitos no ensaio 10**

Tempo (h)	Conc. de glicose (g/l)	Conc. de células (x10g/l)	Conc. de acetoina (mg/l)	Conc. de acetato de etila (mg/l)	Conc. de etanol (g/l)
0	80	3	0	179	1
2	78	5	0	187	2
3	77	7	0	242	2
4	76	10	43	247	3
5	70	13	62	247	4
6	70	15	68	249	4
7	69	18	104	256	4
8	64	20	114	300	5
9	58	22	125	284	5
10	54	24	180	310	6
11	53	25	200	372	6
12	46	27	171	335	6
13	47	28	183	372	6
15	37	30	246	364	6
17	35	33	320	463	7
19	28	32	334	469	7
22	19	32	332	464	8
24	15	34	330	463	9

\* concentração inicial de glicose: 81g/l; temperatura: 30°C; pH: 5,0

**Tabela 11 – Cinética de crescimento e produção de metabólitos no ensaio 11**

Tempo (h)	Conc. de glicose (g/l)	Conc. de células (x10g/l)	Conc. de acetoina (mg/l)	Conc. de acetato de etila (mg/l)	Conc. de etanol (g/l)
0	49	3	0	56	1
2	49	4	0	74	2
4	48	7	39	91	3
5	43	9	54	84	3
6	40	13	44	70	3
7	40	15	71	136	4
8	38	18	80	139	5
9		20	88	159	5
10	35	23	113	150	5
11	31	25	142	199	5
12	27	29	150	226	6
13	24	32	177	177	6
14	19	34	197	251	6
15	15	33	220	303	6
16	13	34	246	346	6
17	11	35	247	322	6
19	10	36	298	354	7
22	7	38	321	372	7
24	0	36	344	394	7

\* concentração inicial de glicose: 49g/l; temperatura: 24°C; pH: 5,0

**Tabela 12 – Cinética de crescimento e produção de metabólitos no ensaio 12**

Tempo (h)	Conc. de glicose (g/l)	Conc. de células (x10g/l)	Conc. de acetoina (mg/l)	Conc. de acetato de etila (mg/l)	Conc. de etanol (g/l)
0	49	3	0	209	0
2	49	4	0	266	1
3	47	4	0	313	1
4	46	7	0	381	2
5	45	9	28	387	4
6	39	10	42	438	4
7	33	13	64	479	5
8	32	16	70	461	5
9	26	17	88	495	6
10	23	19	94	548	6
11	20	19	110	554	6
12	14	20	118	498	6
13	11	23	148	541	7
14	5	24	161	541	8
16	3	25	228	708	9
18	0	25	223	630	9
23	0	26	237	644	9
24	0	26	163	480	8

\* concentração inicial de glicose: 49g/l; temperatura: 36°C; pH: 5,0

**Tabela 13 – Cinética de crescimento e produção de metabólitos no ensaio 13**

Tempo (h)	Conc. de glicose (g/l)	Conc. de células (x10g/l)	Conc. de acetoina (mg/l)	Conc. de acetato de etila (mg/l)	Conc. de etanol (g/l)
0	50	6	0	132	0
2	50	12	19	134	2
3	50	24	70	147	4
4	44	30	49	155	4
5	44	42	74	168	5
6	41	54	94	190	5
7	31	62	128	212	6
8	29	69	194	237	6
9	24	72	152	239	6
10	19	76	203	272	7
12	15	85	252	278	8
13	10	90	283	318	8
14	7	97	297	344	8
15	4	101	303	362	8
16	0	104	323	368	8
18	0	112	347	352	9
20	0	109	349	351	9
24	0	104	367	400	9

\* concentração inicial de glicose: 49g/l; temperatura: 30°C; pH: 4,0

**Tabela 14 – Cinética de crescimento e produção de metabólitos no ensaio 14**

Tempo (h)	Conc. de glicose (g/l)	Conc. de células (x10g/l)	Conc. de acetoina (mg/l)	Conc. de acetato de etila (mg/l)	Conc. de etanol (g/l)
0	49	5	0	107	0
2	48	9	0	111	2
3	47	16	46	139	3
4	46	21	56	140	4
5	41	28	85	141	5
6	37	32	105	158	6
7	32	41	168	179	6
8	30	48	186	211	7
9	27	50	188	224	7
10	21	53	253	255	7
12	14	61	251	271	7
13	12	67	291	278	9
14	11	69	308	234	8
15	2	73	309	307	8
16	1	76	361	309	8
18	0	77	314	317	9
20	0	78	338	318	10
24	0	78	306	266	10

\* concentração inicial de glicose: 49g/l; temperatura: 30°C; pH: 6,0

**Tabela 15 – Cinética de crescimento e produção de metabólitos no ensaio 15**

Tempo (h)	Conc. de glicose (g/l)	Conc. de células (x10g/l)	Conc. de acetoina (mg/l)	Conc. de acetato de etila (mg/l)	Conc. de etanol (g/l)
0	49	5	0	102	0
2	48	9	0	116	1
3		16	23	97	1
4	40	21	35	114	2
5	37	28	59	114	2
6	37	38	84	138	3
7	33	41	102	152	3
8	29	49	161	175	3
9	24	50	178	186	3
10	19	53	203	200	3
12	18	58	243	226	4
13	13	65	257	240	4
14	10	70	277	251	4
15	6	71	300	274	4
16	3	76	294	279	4
18	1	75	297	281	4
20	0	79	307	282	4
24	0	76	317	298	4

\* concentração inicial de glicose: 49g/l; temperatura: 30°C; pH: 5,0

**Tabela 16 – Cinética de crescimento e produção de metabólitos no ensaio 16**

Tempo (h)	Conc. de glicose (g/l)	Conc. de células (x10g/l)	Conc. de acetoina (mg/l)	Conc. de acetato de etila (mg/l)	Conc. de etanol (g/l)
0	49	2	0	22	0
2	49	6	0	47	0
3	48	12	18	41	2
4		17			
5	44	21	39	36	4
6	44	30	49	44	4
7	35	40	82	57	4
8	34	46	128	72	5
9	26	47	131	89	5
10	22	52	188	118	6
12	18	60	235	141	6
13	14	65	310	163	6
14	8	71	297	166	6
15	6	72	293	179	7
16	3	74	330	200	7
18	0	76	347	215	7
20	0	80	354	219	7
24	0	76	327	213	7

\* concentração inicial de glicose: 49g/l; temperatura: 30°C; pH: 5,0



### Curvas de calibração para a determinação da concentração celular em cada ensaio

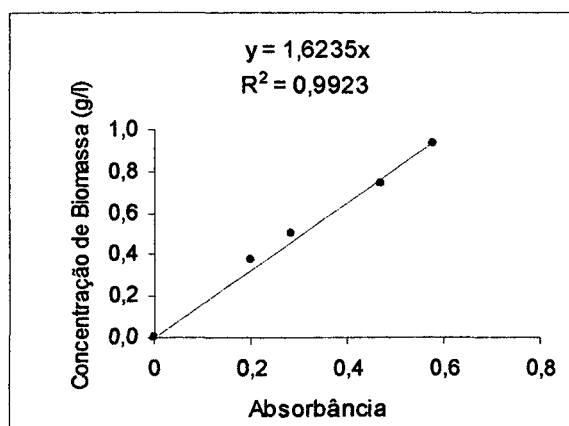


Figura 1 – Curva de calibração de concentração celular utilizada no ensaio 1

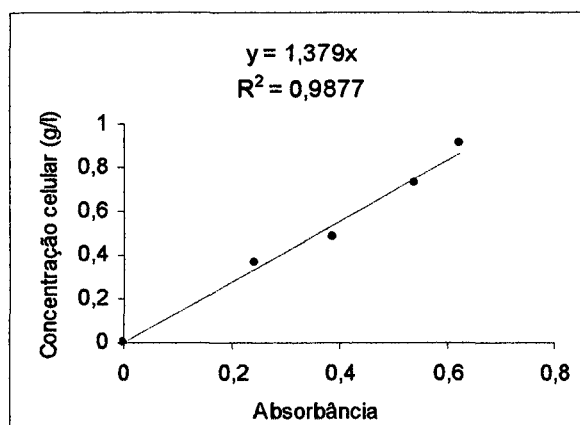


Figura 2 – Curva de calibração de concentração celular utilizada no ensaio 2

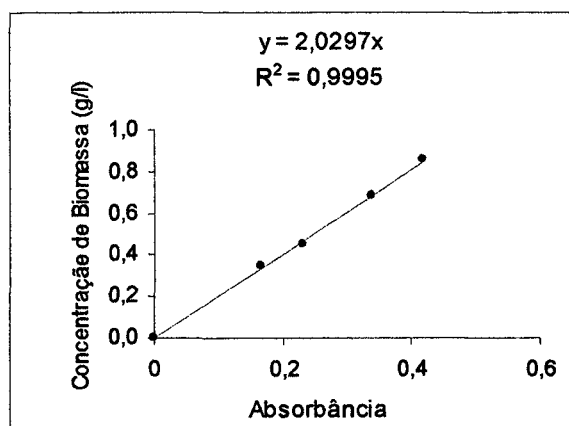
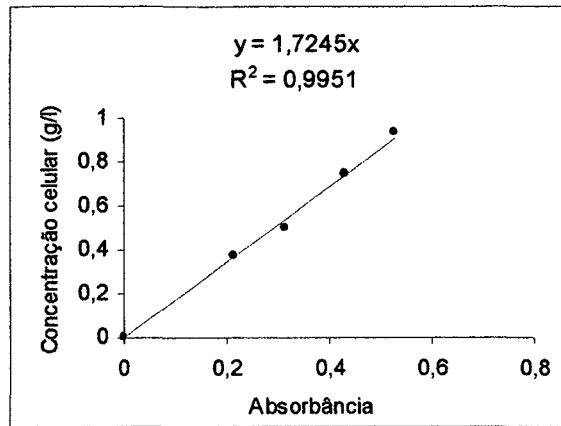
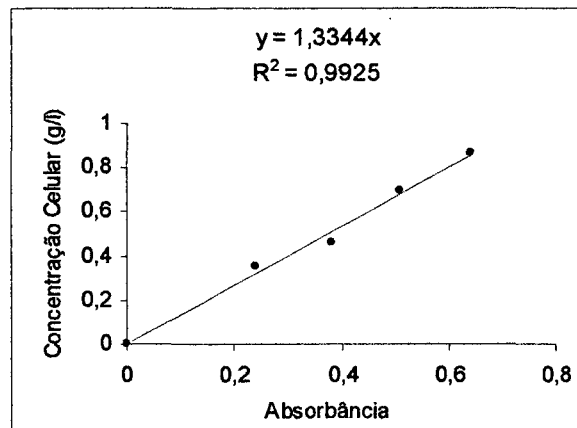


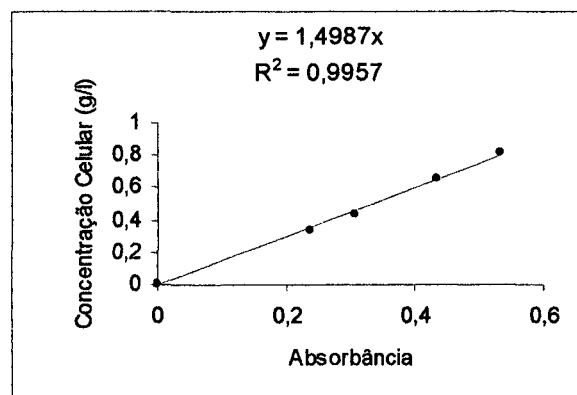
Figura 3 – Curva de calibração de concentração celular utilizada no ensaio 3



**Figura 4 – Curva de calibração de concentração celular utilizada no ensaio 4**



**Figura 5 – Curva de calibração de concentração celular utilizada no ensaio 5**



**Figura 6 – Curva de calibração de concentração celular utilizada no ensaio 6**

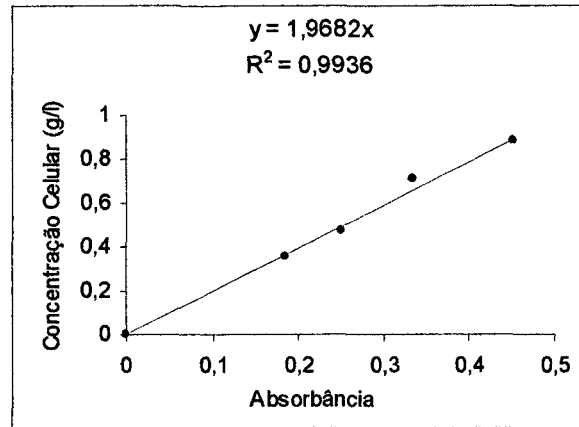


Figura 7 – Curva de calibração de concentração celular utilizada no ensaio 7

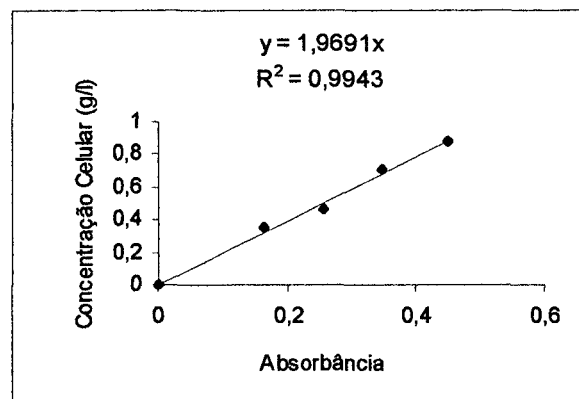


Figura 8 – Curva de calibração de concentração celular utilizada no ensaio 8

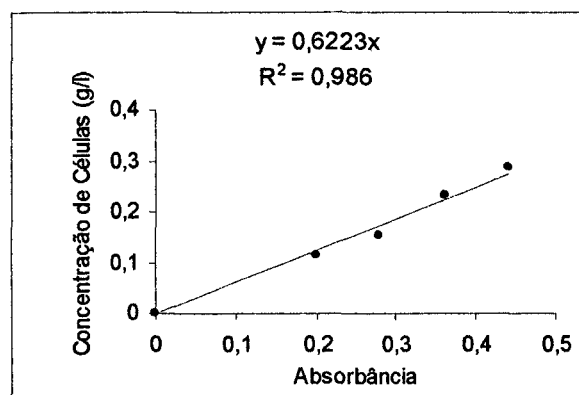
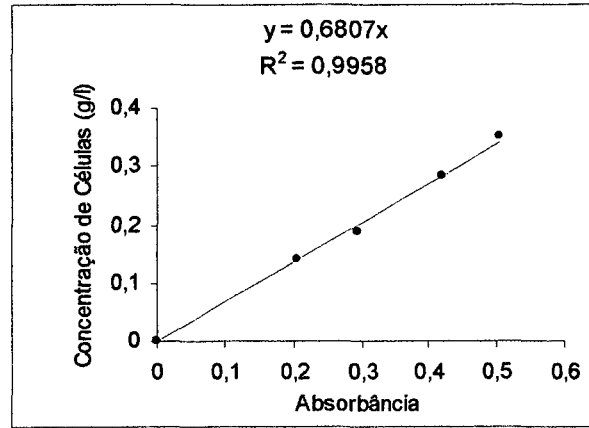
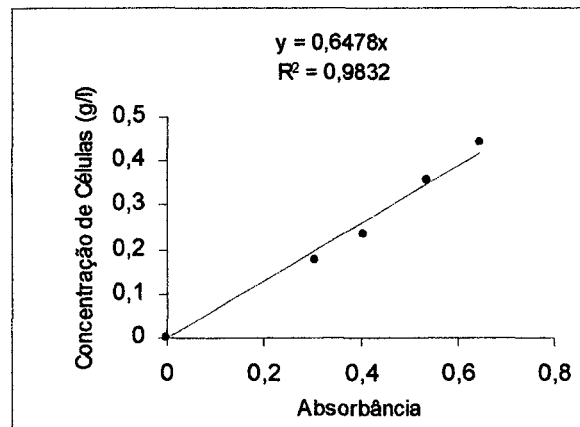


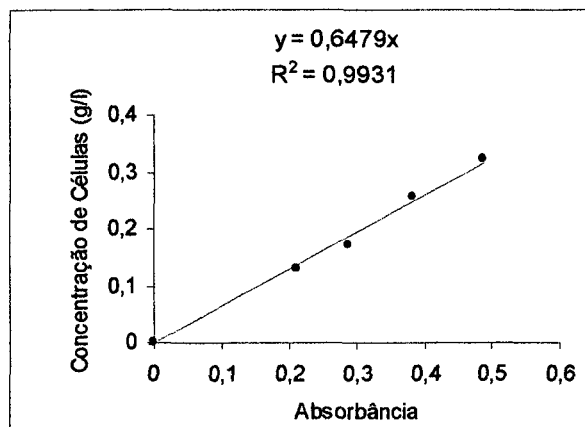
Figura 9 – Curva de calibração de concentração celular utilizada no ensaio 9



**Figura 10 – Curva de calibração de concentração celular utilizada no ensaio 10**



**Figura 11 – Curva de calibração de concentração celular utilizada no ensaio 11**



**Figura 12 – Curva de calibração de concentração celular utilizada no ensaio 12**

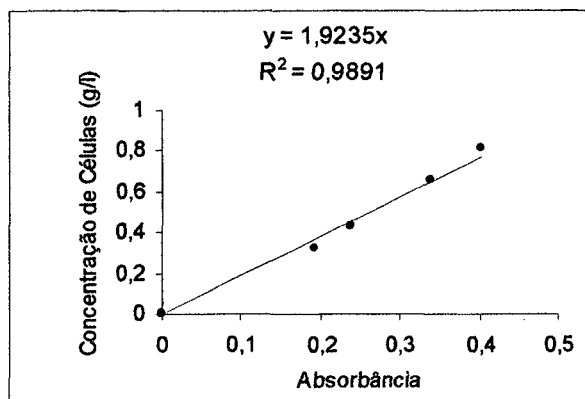


Figura 13 – Curva de calibração de concentração celular utilizada no ensaio 13

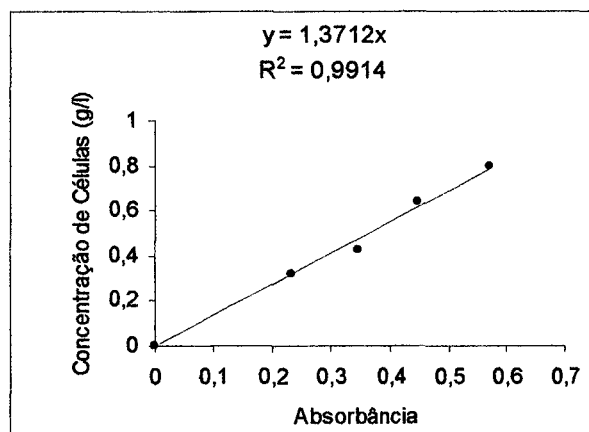


Figura 14 – Curva de calibração de concentração celular utilizada no ensaio 14

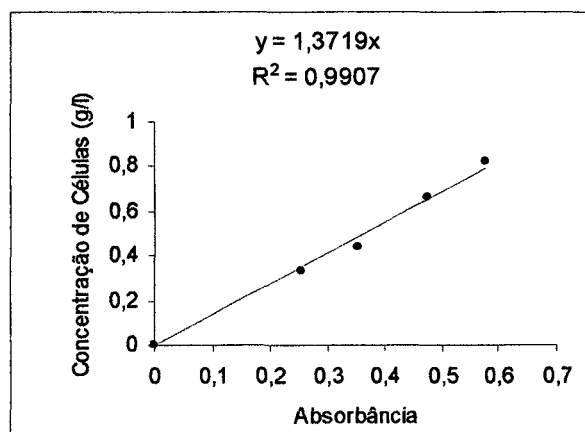
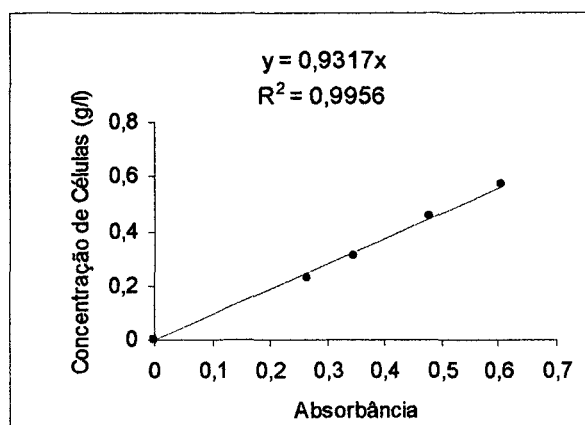


Figura 15 – Curva de calibração de concentração celular utilizada no ensaio 15



**Figura 16 – Curva de calibração de concentração celular utilizada no ensaio 16**

### Determinação da velocidade específica máxima de crescimento para cada ensaio

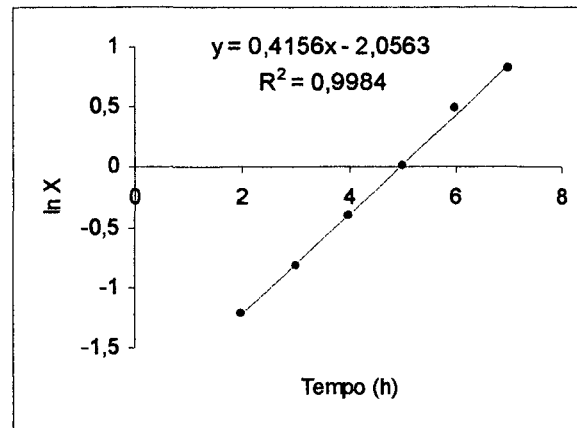


Figura 17 – Velocidade específica máxima de crescimento da levedura no ensaio 1

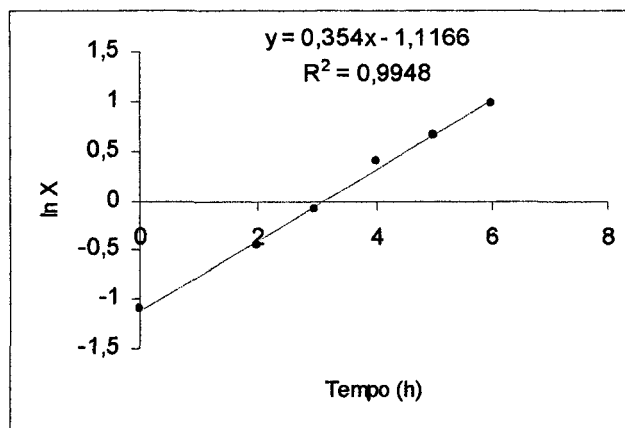


Figura 18 – Velocidade específica máxima de crescimento da levedura no ensaio 2

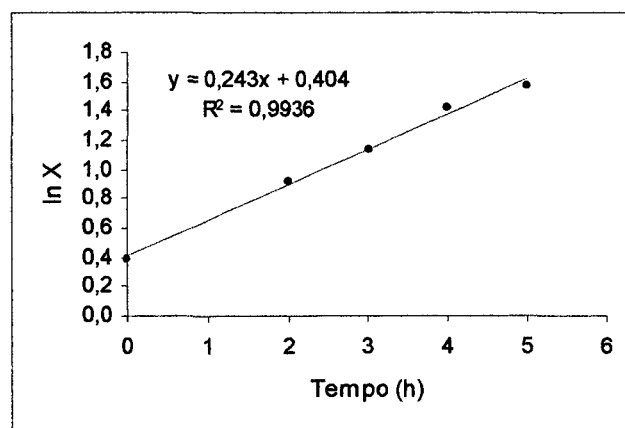


Figura 19 – Velocidade específica máxima de crescimento da levedura no ensaio 3

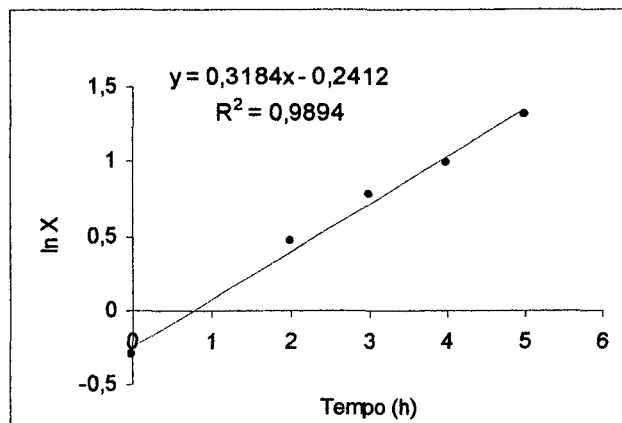


Figura 20 – Velocidade específica máxima de crescimento da levedura no ensaio 4

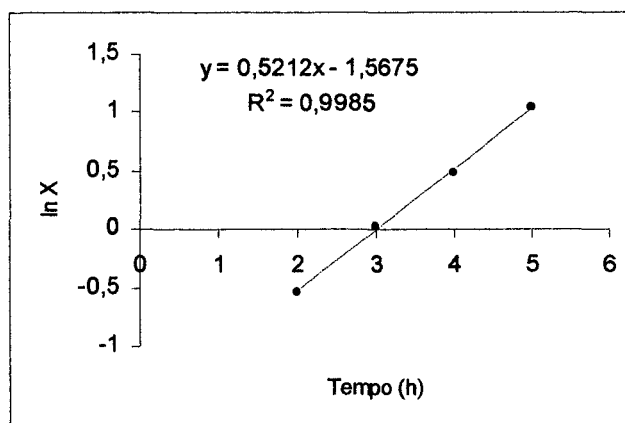


Figura 21 – Velocidade específica máxima de crescimento da levedura no ensaio 5

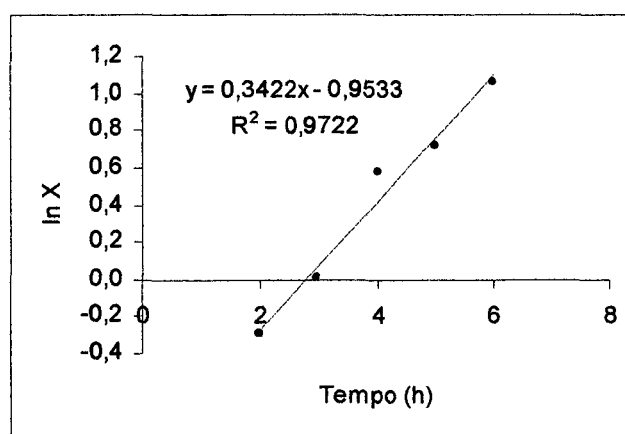


Figura 22 – Velocidade específica máxima de crescimento da levedura no ensaio 6



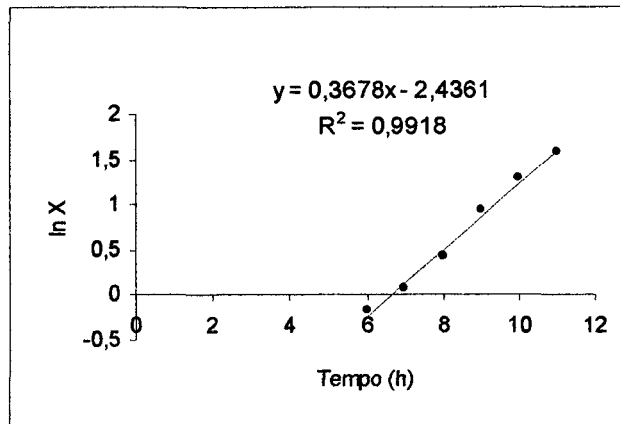


Figura 23 – Velocidade específica máxima de crescimento da levedura no ensaio 7

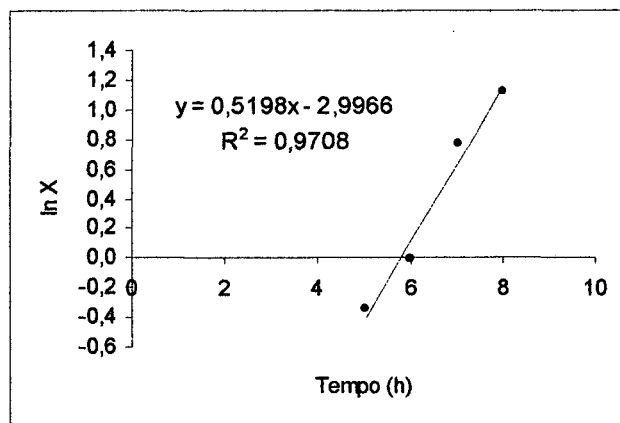


Figura 24 – Velocidade específica máxima de crescimento da levedura no ensaio 8

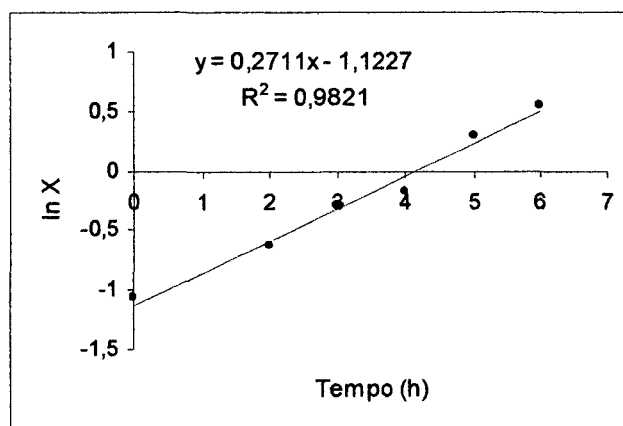


Figura 25 – Velocidade específica máxima de crescimento da levedura no ensaio 9

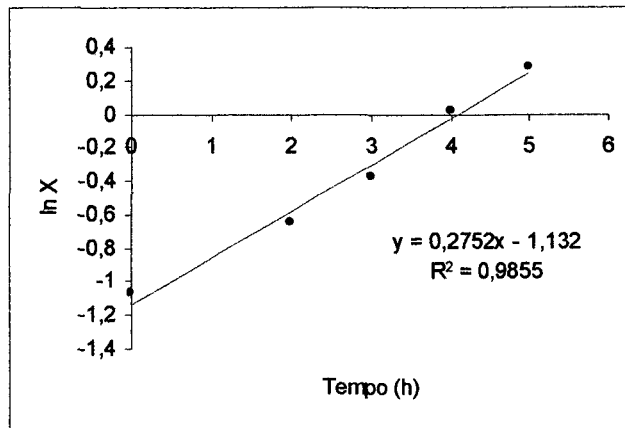


Figura 26 – Velocidade específica máxima de crescimento da levedura no ensaio 10

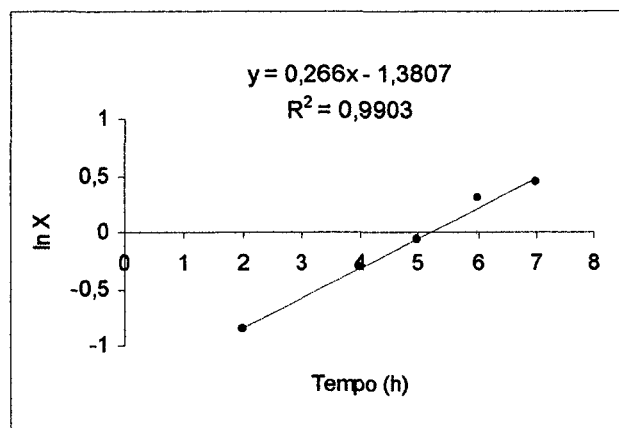


Figura 27 – Velocidade específica máxima de crescimento da levedura no ensaio 11

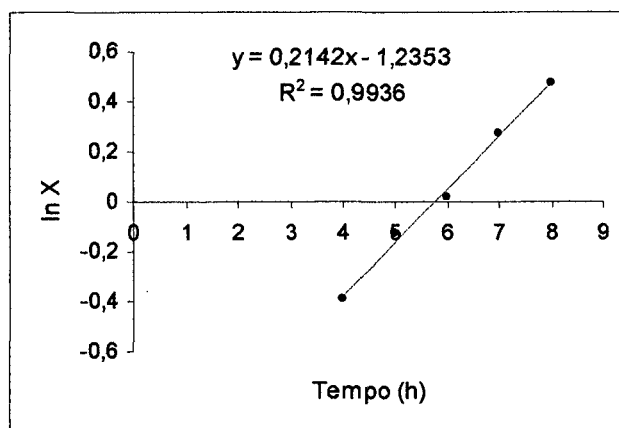
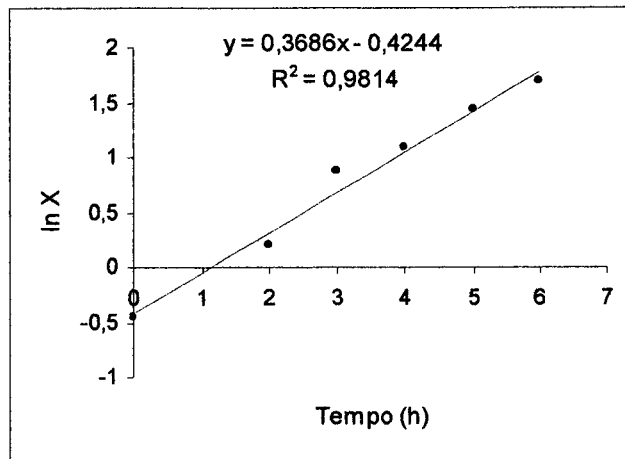
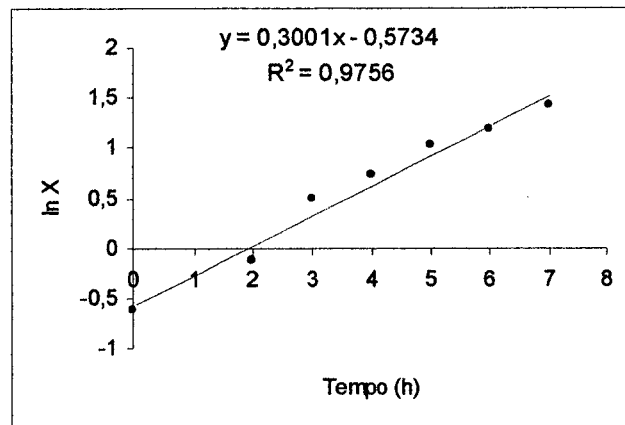


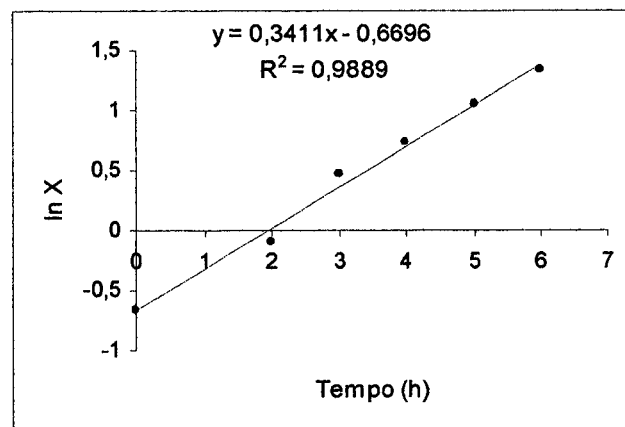
Figura 28 – Velocidade específica máxima de crescimento da levedura no ensaio 12



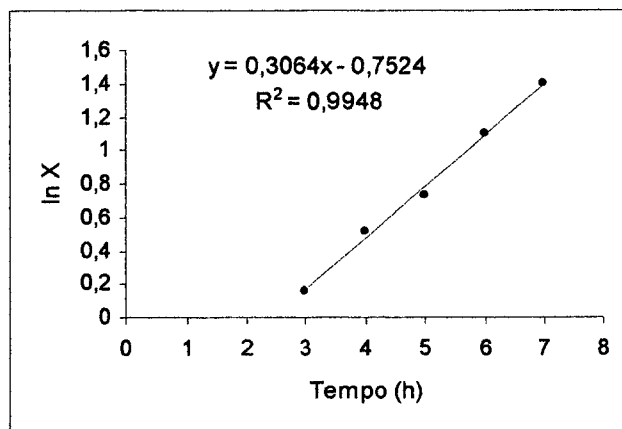
**Figura 29 – Velocidade específica máxima de crescimento da levedura no ensaio 13**



**Figura 30 – Velocidade específica máxima de crescimento da levedura no ensaio 14**

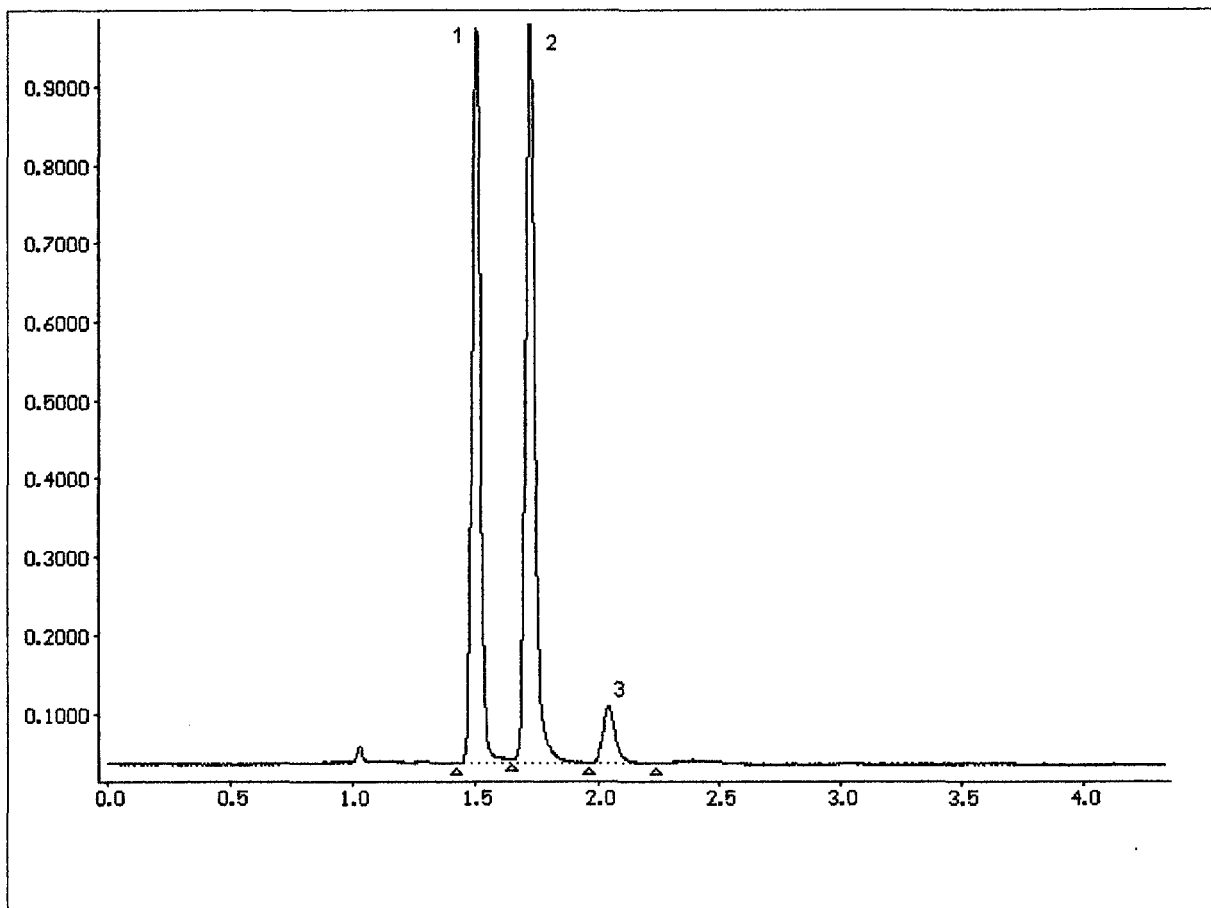


**Figura 31 – Velocidade específica máxima de crescimento da levedura no ensaio 15**

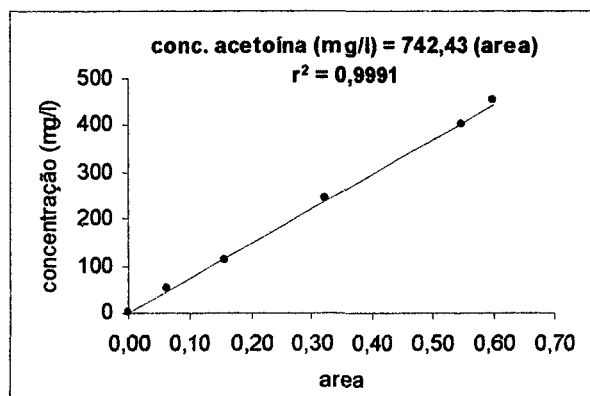


**Figura 32 – Velocidade específica máxima de crescimento da levedura no ensaio 16**

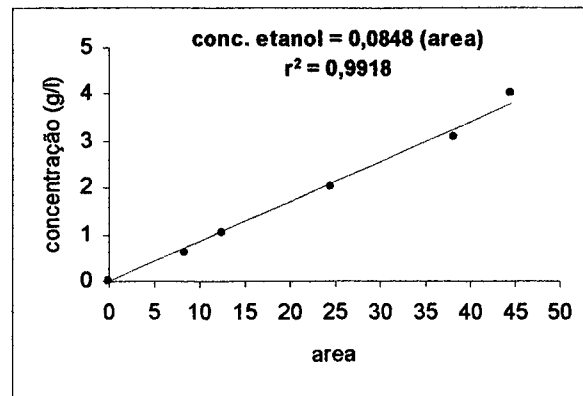
### Determinação dos produtos pelo método de cromatografia gasosa



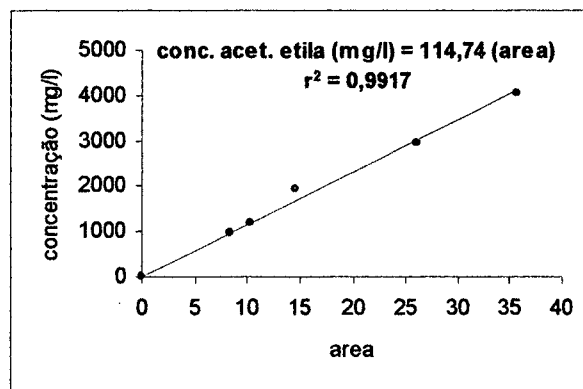
**Figura 33 – Cromatograma dos metabólitos determinados : 1- acetato de etila; 2- etanol; 3- acetoína**



**Figura 34 – Curva de calibração para a análise da concentração de acetoína**



**Figura 35 - Curva de calibração para a análise da concentração de etanol**



**Figura 36 - Curva de calibração para a análise da concentração de acetato de etila**