

JULIANA RIBEIRO MARIOTTO

**Produção de acetoína e 2,3-butanodiol por *Bacillus
polymyxa***

Florianópolis
2007



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Produção de acetoína e 2,3-butanodiol por *Bacillus polymyxa*

JULIANA RIBEIRO MARIOTTO
Engenheira Química - FURB

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

Orientador: Prof. Dr. Agenor Furigo Jr.

Florianópolis, dezembro de 2007

*À Deus e aos meus pais
pela vida e oportunidade*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Angela e Sérgio Mariotto, pelo amor, apoio, dedicação e por estarem sempre presentes em todos os momentos.

À toda minha família que mesmo distantes sempre estiveram torcendo por mim.

Ao meu namorado Régis, pelo carinho, incentivo e por estar presente em todos os momentos.

Aos meus amigos Camila, Ana Cláudia, Juliana, Karin, Anderson, Felix, Gheise e Fernanda pela amizade, apoio e compreensão.

À minha amiga de mestrado Vera e minhas “colegas de trabalho” Chalana e Morgana, pela amizade, incentivo e às noites mal dormidas no laboratório durante as fermentações.

À todos os amigos do Engebio e redondezas: Jaciane, Gisanara, Francielo, Ricardo, Andréia, Beatriz Interlandi, Franciny, Felipe, Beatriz Salomão, Manuela, Sabrina, Américo, Mônica, Derce, Carminatti, Fernanda, Denise, pela amizade e apoio dados para realização deste trabalho.

Ao professor Agenor pela orientação e confiança.

Ao eficaz Edevilson, pelo apoio, atenção e amizade.

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

À CAPES, pelo apoio financeiro.

RESUMO

O presente trabalho tem como objetivo estudar a influência da fonte de nitrogênio, pH e transferência de oxigênio no crescimento da bactéria *Bacillus polymyxa*, consumo de substrato e formação dos aromas acetoina e 2,3-butanodiol. Estas substâncias são responsáveis pelo aroma de produtos lácticos, além de atuarem como potencializadores de outros aromas. Os cultivos foram realizados em três etapas diferentes, utilizando o meio de cultura Phosphate Ammonium Yeast (PAY) e glicose como fonte de carbono. Na primeira etapa, desenvolvida em frascos aletados, utilizou-se três diferentes fontes de nitrogênio, extrato de levedura, sulfato de amônio e uréia, sendo que a proporção deste componente no meio de cultura foi a mesma para os todos os ensaios realizados. Na segunda etapa, também em frascos aletados, o volume do meio de cultura (400, 500 e 600 mL) e o pH (4,5, 5,5 e 6,5) foram modificados, realizando o controle deste último parâmetro durante todo o cultivo, ou somente ajustando-o no início do processo. E a terceira etapa foi executada em biorreator de 4L, visando uma ampliação de escala. A concentração celular foi determinada associando dois métodos diferentes, a turbidimetria e a gravimetria. A glicose foi quantificada utilizando o kit glicose-PP (Gold Analisa) e a concentração dos aromas foi determinada através da cromatografia gasosa. Os resultados obtidos nos ensaios realizados em frascos agitados mostraram que o extrato de levedura é a melhor fonte de nitrogênio, obtendo-se 9,8 g/L de concentração celular, 24,2 g/L de 2,3-butanodiol e 15,0 g/L de acetoina, além de concentrações residuais de glicose muito próximas de zero. Este ensaio também apresentou os melhores resultados na segunda etapa de experimentos, onde se estudou a influência do pH e da transferência de oxigênio, sendo este último avaliado através da modificação do volume do meio de cultura. As condições de cultivo utilizadas neste ensaio foram pH inicial de 6,5 e volume de meio de cultura de 400 mL. Com o controle do pH, resultados semelhantes de biomassa e produtos foram obtidos, 9,8 g/L de células, 19,9 g/L de 2,3-butanodiol e 13,7 g/L de acetoina, mostrando que o controle deste parâmetro não afeta significativamente a formação dos aromas. No entanto, maiores velocidades de crescimento foram obtidas com o controle dos diferentes pHs estudados, além de favorecer o consumo da glicose. O ensaio realizado em biorreator mostrou que a aeração contínua prejudica a formação dos produtos, atingindo concentrações de 3,5 g/L de 2,3-butanodiol e 4,3 g/L de acetoina. Elevada produção de células foi alcançada, 7,6 g/L, indicando que o oxigênio favorece o crescimento do

microrganismo no início do cultivo. A partir de um determinado período do processo, este componente não deve ser desejado, pois a formação dos produtos ocorre por processo fermentativo, e a presença deste afeta consideravelmente a concentração final dos aromas.

ABSTRACT

This work aims to study the influence of the source of nitrogen, pH and the transfer of oxygen on the growth of the bacterium *Bacillus polymyxa*, consumption of substrate and production of the aromas acetoin and 2,3-butanediol. These substances are responsible for the aroma of lactic products, and serve as power of other flavorings. The fermentations have been conducted in three different stages, using the means of culture Yeast Ammonium Phosphate (PAY), and glucose as a source of carbon. In the first step, developed in erlenmeyers flasks with baffles is used for yeast extract, ammonium sulphate and urea as a source of nitrogen, and the proportion of this component in the means of culture was the same for all tests. In the second stage, also in erlenmeyers flasks with baffles, the volume of the means of culture (400, 500 and 600 mL) and pH (4.5, 5.5 and 6.5) were modified, making the control of the latter parameter throughout the fermentation, or only adjusted at the beginning of the process. And the third stage was performed at bioreactor of 4L, seeking an ampliation of scale. The cellular concentration was determined linking two different methods, turbidimetry and gravimetry. The glucose was measured using the kit glucose-PP (Gold Analisa) and the aromas concentrations were determined by gas chromatography. The results achieved in the flasks with baffles showed that the yeast extract is the best source of nitrogen, attaining 9.8 g/L of cellular concentration, 24.2 g/L of 2,3-butanediol and 15.0 g/L of acetoin, besides residual concentrations of glucose very close to zero. This test also showed the best results in the second stage of experiments, where were the influence of pH and the transfer of oxygen studied, the latter being evaluated by the volume change of the means of culture. The conditions of cultivation used were initial pH of 6.5 and volume of means of cultivation of 400 mL. With the control of pH, similar results were obtained, 9.8 g/L of cells, 19.9 g/L of 2,3-butanediol and 13.7 g/L of acetoin, showing that the control of this parameter does not affect significantly the formation of the products. However, higher rates were obtained with the control of different pHs studied, and encourage the consumption of glucose. The test performed in bioreactor showed that the continuous aeration affects the formation of the products, reaching concentrations of 3.5 g/L of 2,3-butanediol and 4.3 g/L of acetoin. High production of cells was achieved, 7.6 g/L, indicating that the oxygen promotes the growth of microorganism early in the cultivation. From a certain period of the process, this component

should not be desired, since the formation of the products occurs by process fermentative, and the presence of this affects considerably the final concentration of aromas.

SUMÁRIO

Índice de tabelas.....	xi
Índice de figuras.....	xii
Nomenclatura.....	xv
1 Introdução.....	1
2 Revisão bibliográfica.....	3
2.1 Aromas.....	3
2.1.1 Definição.....	3
2.1.2 Considerações gerais.....	4
2.1.3 Classificação.....	5
2.1.4 Produção biotecnológica.....	6
2.1.5 Microrganismos produtores de aromas.....	8
2.2 <i>Bacillus polymyxa</i>	10
2.3 Acetoína.....	11
2.4 2,3-Butanodiol.....	12
2.5 Biossíntese de acetoína e 2,3-butanodiol.....	13
2.6 Fatores que influenciam a produção de acetoína e 2,3-butanodiol.....	15
2.6.1 Temperatura.....	15
2.6.2 Aeração.....	15
2.6.3 Concentração inicial de substrato.....	16
2.6.4 Potencial hidrogeniônico (pH).....	17
2.6.5 Inóculo.....	18
2.7 Considerações finais.....	18
3 Material e métodos.....	20
3.1 Microrganismo.....	20
3.2 Meio de manutenção.....	20
3.3 Inóculo.....	21
3.4 Ensaio fermentativo.....	21
3.5 Métodos analíticos.....	25
3.5.1 Amostragem.....	25
3.5.2 Avaliação da contaminação.....	26

3.5.3	Determinação da concentração celular	26
3.5.4	Determinação da concentração de glicose	27
3.5.5	Determinação dos produtos	28
4	Resultados e discussões	29
4.1	Influência da fonte de nitrogênio	29
4.2	Influência do pH e da transferência de oxigênio	34
4.2.1	Planejamento experimental fatorial (Anexo V)	45
4.3	Ampliação de escala	50
5	Conclusão.....	54
6	Sugestões	56
7	Referências Bibliográficas.....	57
8	Anexos	64

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1. Microrganismos produtores dos aromas de interesse: acetoina e 2,3-butanodiol....	9
Tabela 3.1. Composição do Meio AN para manutenção do microrganismo.....	20
Tabela 3.2. Composição do Meio YM utilizada para a preparação do inóculo.....	21
Tabela 3.3. Composição do Meio PAY utilizado nos ensaios fermentativos.....	22
Tabela 3.4. Modificação do Meio PAY, utilizando duas fontes de nitrogênio diferentes.....	22
Tabela 3.5. Identificação dos ensaios realizados.	23
Tabela 4.1. Máximas concentrações celulares e velocidades de crescimento constante, obtidas nos ensaios realizados a 37°C, 150 rpm, com e sem o controle do pH ao longo do cultivo.	36
Tabela 4.2. Concentrações residuais e velocidade de consumo de glicose, obtidas nos ensaios realizados a 37°C, 150 rpm, com e sem o controle do pH ao longo do cultivo.	39
Tabela 4.3. Fator de conversão substrato em células obtidas nos ensaios realizados a 37°C, 150 rpm, com e sem o controle do pH ao longo do cultivo.	40
Tabela 4.4. Concentrações máximas de acetoina e 2,3-butanodiol, obtidas nos ensaios realizados a 37°C, 150 rpm, com e sem o controle do pH ao longo do cultivo.	41
Tabela 4.5. Resultados obtidos do planejamento fatorial com controle do pH.	46
Tabela 4.6. Tabela de análise de variância para a concentração máxima de 2,3-butanodiol obtida nos ensaios realizados com o controle de pH.	46
Tabela 4.7. Efeito das variáveis independentes (entrada) sobre a concentração de 2,3-butanodiol e os coeficientes de regressão do modelo linear, para os ensaios realizados com o controle do pH.	48
Tabela 4.8. Resultados obtidos no biorreator e no Ensaio 3, realizado com o controle do pH 6,5 em frascos agitados.....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Bactéria <i>B. polymyxa</i> CCT 512.	11
Figura 2.2. Mecanismo de formação da acetoina e 2,3-butanodiol.	14
Figura 3.2. Ensaio realizado em shaker.	24
Figura 3.3. Biorreator New Brunswick Scientific CO INC, modelo BIOFLO III.....	25
Figura 4.1. Crescimento microbiano para os ensaios conduzidos com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando o meio PAY com 50 g/L de glicose, 150 rpm, 37°C, pH inicial de 6,5 e volume de meio de cultura de 400 mL. (a) Ensaio realizado com 13,1 g/L de extrato de levedura, (b) Ensaio realizado com 2,85 g/L de uréia (◆) e 6,24 g/L de sulfato de amônio (■).....	29
Figura 4.2. Velocidade específica de crescimento ao longo do tempo para os ensaios conduzidos com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando o meio PAY com 50 g/L de glicose, 150 rpm, 37°C, pH inicial de 6,5 e volume de meio de cultura de 400 mL. Extrato de levedura (◆), uréia (■) e sulfato de amônio (▲).	30
Figura 4.3. Consumo de glicose para os ensaios conduzidos com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando o meio PAY com 50 g/L de glicose, 150 rpm, 37°C, pH inicial de 6,5 e volume de meio de cultura de 400 mL. Extrato de levedura (◆), uréia (■) e sulfato de amônio (▲).....	31
Figura 4.4. Produção de acetoina para os ensaios conduzidos com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando o meio PAY com 50 g/L de glicose, 150 rpm, 37°C, pH inicial de 6,5 e volume de meio de cultura de 400 mL. Extrato de levedura (◆), uréia (■) e sulfato de amônio (NP).....	32
Figura 4.5. Produção de 2,3-butanodiol para os ensaios conduzidos com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando o meio PAY com 50 g/L de glicose, 150 rpm, 37°C, pH inicial de 6,5 e volume de meio de cultura de 400 mL. Extrato de levedura (◆), uréia (■) e sulfato de amônio (▲).....	33

Figura 4.6. Crescimento do microrganismo para os ensaios realizados com o meio PAY, contendo 50 g/L de glicose, a 37°C, 150 rpm e com o controle do pH ao longo de todo o cultivo. (◆) Ensaio 1: pH 4,5 e volume do meio de cultura de 400 mL; (■) Ensaio 2: pH 4,5 e volume do meio de cultura de 600 mL; (▲) Ensaio 3: pH 6,5 e volume de meio de cultura de 400 mL; (×) Ensaio 4: pH 6,5 e volume do meio de cultura de 600 mL; (+) Ensaio 5: pH 5,5 e volume de meio de cultura de 500 mL.....35

Figura 4.7. Crescimento do microrganismo para os ensaios realizados com o meio PAY, contendo 50 g/L de glicose, a 37°C, 150 rpm e com o ajuste do pH inicial. (◆) Ensaio 6: pH 4,5 e volume do meio de cultura de 400 mL; (■) Ensaio 7: pH 4,5 e volume do meio de cultura de 600 mL; (▲) Ensaio 8: pH 6,5 e volume de meio de cultura de 400 mL; (×) Ensaio 9: pH 6,5 e volume do meio de cultura de 600 mL; (+) Ensaio 10: pH 5,5 e volume de meio de cultura de 500 mL.35

Figura 4.8. Velocidade de crescimento específica para os ensaios realizados com o meio PAY, contendo 50 g/L de glicose, a 37°C, 150 rpm e com o controle do pH ao longo de todo o cultivo. (◆) Ensaio 1: pH 4,5 e volume do meio de cultura de 400 mL; (■) Ensaio 2: pH 4,5 e volume do meio de cultura de 600 mL; (▲) Ensaio 3: pH 6,5 e volume de meio de cultura de 400 mL; (×) Ensaio 4: pH 6,5 e volume do meio de cultura de 600 mL; (+) Ensaio 5: pH 5,5 e volume de meio de cultura de 500 mL.37

Figura 4.9. Velocidade de crescimento específica para os ensaios realizados com o meio PAY, contendo 50 g/L de glicose, 37°C, 150 rpm e com o ajuste do pH inicial. (◆) Ensaio 6: pH 4,5 e volume do meio de cultura de 400 mL; (■) Ensaio 7: pH 4,5 e volume do meio de cultura de 600 mL; (▲) Ensaio 8: pH 6,5 e volume de meio de cultura de 400 mL; (×) Ensaio 9: pH 6,5 e volume do meio de cultura de 600 mL; (+) Ensaio 10: pH 5,5 e volume de meio de cultura de 500 mL.37

Figura 4.10. Consumo de glicose para os ensaios realizados com o meio PAY, contendo 50 g/L de glicose, a 37°C, 150 rpm e com o controle do pH ao longo de todo o cultivo. (◆) Ensaio 3: pH 6,5 e volume de meio de cultura de 400 mL; (■) Ensaio 4: pH 6,5 e volume do meio de cultura de 600 mL; (▲) Ensaio 5: pH 5,5 e volume de meio de cultura de 500 mL.....38

- Figura 4.11. Consumo de glicose para os ensaios realizados com o meio PAY, contendo 50 g/L de glicose, a 37°C, 150 rpm e com o ajuste do pH inicial. (♦) Ensaio 6: pH 4,5 e volume do meio de cultura de 400 mL; (■) Ensaio 7: pH 4,5 e volume do meio de cultura de 600 mL; (▲) Ensaio 8: pH 6,5 e volume de meio de cultura de 400 mL; (×) Ensaio 9: pH 6,5 e volume do meio de cultura de 600 mL.....38
- Figura 4.12. Formação dos produtos nos ensaios realizados com o meio PAY, contendo 50 g/L de glicose, a 37°C, 150 rpm, e com o controle do pH ao longo do cultivo. (a) produção de acetoina: (♦) Ensaio 3, pH 6,5 e volume de meio de cultura de 400 mL; (b) produção de 2,3-butanodiol: (♦) Ensaio 3, (■) Ensaio 4, pH 6,5 e volume de meio de cultura de 600 mL, (▲) Ensaio 5, pH 5,5 e volume de meio de cultura de 500 mL.42
- Figura 4.13. Formação dos produtos nos ensaios realizados com o meio PAY, contendo 50 g/L de glicose, a 37°C, 150 rpm, e com o ajuste do pH inicial. (a) produção de acetoina: (♦) Ensaio 8, pH 6,5 e volume de meio de cultura de 400 mL; (■) Ensaio 10, pH 5,5 e volume de meio de cultura de 500 mL; (b) produção de 2,3-butanodiol: (♦) Ensaio 8, (■) Ensaio 9, pH 6,5 e volume de meio de cultura de 600 mL.42
- Figura 4.14. Concentração máxima de 2,3-butanodiol observada versus a concentração prevista pelo modelo linear obtido para os experimentos com controle de pH ao longo do cultivo.47
- Figura 4.15. Efeitos principais e de interação na produção de 2,3-butanodiol, nos ensaios realizados com controle do pH ao longo do cultivo.48
- Figura 4.16. Superfície de resposta do modelo linear obtido para a máxima concentração de 2,3-butanodiol, nos ensaios realizados com controle do pH.....49
- Figura 4.17. Ensaio realizado em biorreator: (♦) crescimento microbiano, (■) consumo de glicose, (▲) concentração de 2,3-butanodiol e (×) acetoina, cultivados a 37°C, com controle do pH 6,5, e em condições aeróbicas ao longo de todo o cultivo.....50
- Figura 4.18. Consumo de glicose para o ensaio realizado em biorreator, a 37°C, com controle do pH 6,5 e em condições aeróbicas: (♦) consumo de glicose durante o cultivo, (■) velocidade de consumo de glicose relacionada com o crescimento do microrganismo, (▲) velocidade de consumo de glicose relacionada com a formação dos produtos.51

NOMENCLATURA

AN	Agar Nutrient
ATCC	American Type Culture Collection (EUA)
b_0, b_1, b_2, b_3	Coefficientes de regressão
CCT	Coleção de Culturas Tropicais
j	Identificação da repetição
m	Número dos diferentes níveis
MQ_{ep}	Média dos quadrados do erro puro
MQ_{faj}	Média dos quadrados da falta de ajuste
MQ_R	Média dos quadrados da regressão
MQ_r	Média dos quadrados dos resíduos
n	Número total de observações
n_i	Número de repetições no nível i
p	Número de parâmetros do modelo
PAY	Phosphate Ammonium Yeast
S_{res}	Concentração de glicose residual (g/L)
S_0	Concentração inicial de glucose (g/L)
SQ_{ep}	Soma quadrática devido ao erro puro
SQ_{faj}	Soma quadrática devido à falta de ajuste
SQ_R	Soma quadrática devido à regressão
SQ_r	Soma quadrática residual
SQ_T	Soma quadrática em torno da média
V_S	Velocidade de consumo de glicose (g/L.h)
V_X	Velocidade de crescimento do microrganismo (g/L.h)

X	Concentração celular (g/L)
x_1	Volume do meio de cultura (mL)
x_2	pH do meio de cultura
y	Estimativa dos valores populacionais das respostas
\bar{y}	Média das respostas
\hat{y}	Valor estimado pelo modelo
y_{ij}	Respostas observadas
YM	Yeast Malt Extract
$Y_{P/S}$	Fator de conversão substrato em produto (g/g)
$Y_{P/X}$	Relação entre a formação de células e produtos (g/g)
$Y_{X/S}$	Fator de conversão substrato em células (g/g)
μ	Velocidade específica de crescimento celular (h^{-1})
v_1	Graus de liberdade da regressão
v_2	Graus de liberdade dos resíduos

1 INTRODUÇÃO

As características nutricionais dos alimentos, bem como a sua importância, são conhecidas por todos. No entanto, seu consumo ocorre principalmente devido ao cheiro e ao sabor, que tornam os alimentos atrativos aos consumidores. Por isso, as indústrias acrescentam aos alimentos aditivos, chamados de aromas, para intensificar ou mascarar os sabores e os cheiros dos seus produtos, de forma a aumentar o interesse dos consumidores.

Os aromas podem ser produzidos por vias sintéticas ou biotecnológicas, sendo este último muito estudado nos dias atuais, devido às diversas vantagens que este processo apresenta. Dentre elas pode-se destacar a estereoseletividade, garantida pela alta especificidade dos biocatalisadores, e as influências externas que podem ser negligenciadas, como os fatores climáticos e problemas ambientais. Além disso, aromas produzidos por vias biotecnológicas são considerados mais saudáveis pelos consumidores do que aqueles produzidos por vias sintéticas, por ser um processo natural. Portanto, os aromas sintéticos derivados da petroquímica ou por outras fontes químicas, vêm sendo substituídos gradativamente pelos de origem enzimática ou microbiana.

Diversos grupos de pesquisas vêm estudando a produção de vários compostos naturais, que apresentam interesse comercial, por processos biotecnológicos. A acetoína e o 2,3-butanodiol são exemplos destes compostos. Estes dois aromas são potencializadores de alguns produtos lácticos, destacando-se o queijo e a manteiga, além de serem produtos comuns das fermentações alcoólicas, componentes importantes nos vinhos.

Na Universidade Federal de Santa Catarina, especificamente no Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, o Laboratório de Engenharia Bioquímica possui uma linha de pesquisa relacionada com a produção de aromas que teve início com os estudos desenvolvidos por MORITZ (1998), onde a produção de acetoína foi investigada utilizando três leveduras, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Kloeckera apiculata* e *Hansenula anomala*; e também por CARVALHO (1999), que estudou a produção de acetoína pela bactéria *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis*. Posteriormente, foram desenvolvidos novos estudos por TEIXEIRA (1999), MELLO (2001) e TEIXEIRA et al. (2002) ainda referentes à produção por *Hanseniaspora guilliermondii*. LUERCE (2002) e COSTELLI (2005) realizaram o estudo sobre a produção de acetoína pela bactéria *Bacillus polymyxa*.

Seguindo a linha de pesquisa presente na Universidade, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de determinar algumas condições ótimas para a produção dos aromas acetoina e 2,3-butanodiol, utilizando a bactéria *Bacillus polymyxa*, visto que em trabalhos anteriores os autores enfatizaram somente a produção da acetoina. Mesmo estudando a concentração do substrato e o pH do meio de cultura, os trabalhos anteriores carecem de informações que relacionam estes parâmetros com a aeração, que influencia diretamente a formação dos produtos de interesse. O substrato normalmente estudado refere-se somente à fonte de carbono, principal componente do meio de cultura para o desenvolvimento do microrganismo. No entanto, a mudança de outros componentes, como a fonte de nitrogênio, também se torna importante, pois afeta o crescimento microbiano e, conseqüentemente a formação dos produtos. Outros trabalhos presentes na literatura enfocam a formação de acetoina e 2,3-butanodiol, utilizando vários microrganismos e obtendo-se condições ótimas de cultivo muito diferentes. Além disso, a literatura carece de resultados experimentais utilizando a bactéria *Bacillus polymyxa*, bom produtor destes dois aromas.

Portanto, este trabalho tem como objetivo estudar a influência da fonte de nitrogênio, pH e transferência de oxigênio no crescimento do microrganismo *Bacillus polymyxa*, consumo de glicose e produção dos aromas de interesse, acetoina e 2,3-butanodiol. Para tanto, os ensaios foram realizados em três etapas diferentes. Na primeira etapa estudou-se a influência da fonte de nitrogênio e na segunda avaliou-se a influência do pH e da transferência de oxigênio. Nestas duas etapas utilizaram-se frascos de Erlenmeyers agitados para a realização dos ensaios. A terceira etapa foi conduzida em um biorreator, com a finalidade de ampliar a escala do processo e, conseqüentemente, aumentar a formação dos produtos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aromas

2.1.1 Definição

Os aromas são aditivos indispensáveis nas indústrias de alimentos, bebidas e cosméticos. No caso dos alimentos, embora estes apresentem ótimas características nutricionais, eles são consumidos devido às suas características organolépticas: aroma, sabor e textura. Durante o processamento ou armazenamento de alguns alimentos, principalmente os enlatados e congelados, pode ocorrer a alteração de algumas características organolépticas, sendo necessária a adição de substâncias químicas para tornar o produto mais atrativo ao consumidor. Segundo Simão (1986), citado por TEIXEIRA (1999), 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.

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Resolução nº 104, de 14 de maio de 1999), os aromas são substâncias ou misturas de substâncias com propriedades odoríferas e/ou sápidas, capazes de conferir ou intensificar o aroma e/ou sabor dos alimentos. Excluem-se desta definição:

- substâncias que conferem exclusivamente sabor doce, salgado ou ácido;
- substâncias e produtos alimentícios com propriedades odoríferas e ou sápidas consumidas sem transformação, com ou sem reconstituição;
- matérias de origem vegetal ou animal que possuam propriedades aromatizantes intrínsecas, quando não sejam utilizadas exclusivamente como fonte de aromas.

A definição de aroma e fragrância são diferentes, embora sejam compostos orgânicos de odores geralmente agradáveis. A diferença entre eles é conceitual, e refere-se à aplicação: aromas são de uma forma geral usados em alimentos e bebidas, enquanto fragrâncias são usadas em perfumes e cosméticos (CARVALHO, 1999).

2.1.2 Considerações gerais

Os alimentos são consumidos principalmente pela sua aparência e textura, sendo que os aromas apresentam também uma importância especial. Temperos são adicionados aos alimentos não por seu valor nutricional, mas por seu gosto e aroma (BAUER et al., 1997). A sensação de odor é causada por muitas moléculas pequenas complexas e hidrofóbicas de muitas classes químicas, que ocorrem em traços de concentrações e são detectadas pelas células do epitélio olfativo no interior da cavidade nasal. Os mensageiros químicos não voláteis do sentido do sabor interagem com receptores localizados na língua e conferem quatro sensações básicas: doce, azedo, salgado e amargo. Também percebidos dentro da cavidade oral, mas transmitidos ao 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 6.200 registros de aproximadamente 400 diferentes fontes alimentares. A sensibilidade da espectroscopia clássica (ressonância magnética nuclear de alta resolução) contribuiu para a caracterização estrutural de componentes dos aromas. Apesar destas realizações, a descoberta de novos aromas está se tornando cada vez mais difícil. Extrapolando o número de precursores de aromas, 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).

Essa grande variedade de aromas, bem como a sua complexidade, pode ser explicada através de suas estruturas. Uma pequena mudança na estrutura química destes compostos, geralmente resulta em uma grande alteração nas propriedades organolépticas, em termos de intensidade, qualidade e limiar de detecção. Moléculas com a mesma funcionalidade química básica, como aldeídos e cetonas, podem apresentar, freqüentemente, características organolépticas diferentes (CHEETHAM, 1993).

Devido aos receptores olfativos específicos, as moléculas de aromas podem ser percebidas em concentrações extremamente baixas, e diferenças significantes de limiar de detecção (“Threshold”) são observadas. Os valores de concentração de “Threshold” podem variar de um fator de 10^6 a 10^7 , dependendo da molécula. Portanto, os aromas são utilizados em concentrações totalmente diferentes, o que resulta na necessidade de produção em escalas variando de poucos quilogramas a várias toneladas por ano. Outra característica importante das moléculas utilizadas como aromas é o seu tamanho, geralmente muito pequenas, com massa molecular em torno de 200. Massas moleculares maiores de 300 são exceções (BAUER et al., 1997).

Nos alimentos, algumas alterações do aroma podem ser necessárias, visando o melhoramento de suas características, tornando o produto mais atrativo ao consumidor. Existem quatro formas básicas de alterar as características organolépticas de um alimento: permitindo que microrganismos, adicionados ou já presentes, atuem sobre o alimento; adicionando substâncias que modifiquem suas propriedades como, por exemplo, as lipases; processando o alimento de determinada forma, como as frituras; e pela adição direta de substâncias que causem as características desejadas, água ou leite aromatizado (CARVALHO, 1999).

2.1.3 Classificação

Conforme a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Resolução nº 104, de 14 de maio de 1999), os aromas são classificados como naturais e sintéticos.

2.1.3.1 Aroma natural

São obtidos exclusivamente por métodos físicos, microbiológicos ou enzimáticos, a partir de matérias-primas aromatizantes naturais. Entende-se por aromatizantes naturais, os produtos de origem animal ou vegetal, aceitáveis para consumo humano, que contenham substâncias odoríferas e/ou sápidas, seja em seu estado natural ou após um tratamento adequado, como: torrefação, cocção, fermentação, enriquecimento, tratamento enzimático ou outros.

2.1.3.2 Aromas sintéticos

São os compostos quimicamente definidos obtidos por processos químicos. Os aromatizantes sintéticos compreendem:

- aromatizantes idênticos ao natural: são substâncias quimicamente definidas obtidas por síntese e aquelas isoladas por processos químicos a partir de matérias-primas de origem animal, vegetal ou microbiana que apresentam uma estrutura química idêntica às substâncias presentes nas referidas matérias-primas naturais, processadas ou não.
- aromatizantes artificiais: são compostos químicos obtidos por síntese, que ainda não tenham sido identificados em produtos de origem animal, vegetal ou microbiana, utilizados por suas propriedades aromáticas, em seu estado primário ou preparados para o consumo humano.

2.1.4 Produção biotecnológica

Durante a Segunda Guerra Mundial, pesquisas intensas foram efetuadas visando o desenvolvimento da produção fermentativa do 2,3-butanodiol, o qual pretendia-se utilizar na manufatura da borracha e certos solventes. Porém, com o rápido desenvolvimento da indústria petroquímica por volta de 1950, substituiu-se completamente as tecnologias fermentativas. Atualmente, o uso de biomassa de plantas renováveis para a fabricação de produtos químicos tem sido objeto de crescentes interesses em muitos países. Este fato é ocasionado pelo renascimento do interesse em processos fermentativos que possuem aplicações industriais (SEREBRENNIKOV, 1995).

Uma vasta gama de compostos orgânicos naturais de origem vegetal, produtos do metabolismo primário e secundário, é biologicamente ativa, e apresenta diversas finalidades, tanto na terapêutica médica, para prevenir ou curar doenças, como na indústria de cosméticos e de alimentos, como aromatizantes ou antioxidantes (PLETSCH, 1998).

A indústria original de aromas e fragrâncias foi influenciada por quatro 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; TEIXEIRA, 1999).

Outra forte influência está relacionada com as exigências dos consumidores, que ampliaram seus conhecimentos sobre as características nutricionais dos produtos, bem como dos aditivos acrescentados aos mesmos. Por isso, a busca dos consumidores por produtos naturais vem crescendo, pois estes são considerados mais saudáveis do que os de origem sintética. Portanto, os processos biotecnológicos merecem um importante destaque na produção de diversos compostos, visto que, por serem processos biológicos e, conseqüentemente naturais, são preferidos pelos consumidores.

A biotecnologia oferece três estratégias para a produção de compostos: os processos fermentativos, no qual o crescimento da biomassa e a biossíntese do produto ocorrem em biorreatores; a micropropagação, através da qual clones selecionados pelas suas características fenotípicas e livres de patógenos são propagados em condições assépticas e rigorosamente controlados; e a engenharia genética, que objetiva a alteração do genoma das células através da introdução de novos genes e a conseqüente obtenção de células, órgãos e plantas transgênicas com características bioquímicas alteradas (PLETSCH, 1998).

A produção de aromas através dos processos biotecnológicos pode ser efetuada por duas vias: bioprodução e bioconversão. A bioprodução é a mais utilizada, e conforme descrito em Fabre (1996), citado por MORITZ (1998), ocorre por vias fermentativas, onde a cultura microbiana pode ser melhorada pela otimização das condições de cultivo. A bioconversão envolve reações múltiplas, onde a partir de sistemas enzimáticos é possível ampliar, degradar ou modificar o substrato, deste modo acrescentando ou substituindo a síntese química (BERGER, 1995).

A bioprodução apresenta algumas vantagens frente aos produtos formados por vias sintéticas. Segundo CHEETHAM (1993), os processos químicos atuais carecem de estereoseletividade, às vezes essenciais para a geração de compostos com características adequadas, enquanto os processos enzimáticos são bastante específicos. As qualidades aromáticas de produtos sintéticos nem sempre se igualam às de produtos naturais. Como

alguns aromas são compostos de uma série de substâncias complexas em dosagens determinadas, às vezes, a única forma de produzir um aroma “convincente” é usando fontes naturais ou microrganismos (CARVALHO, 1999).

Outra vantagem está no preço, aromas sintéticos mais complexos, como a vanilina, são geralmente mais caros que os produtos de fermentação (COSTELLI, 2005). Para alguns casos, como álcoois e cetonas, as sínteses a partir de hidrocarbonetos são relativamente fáceis, não justificando a sua produção por processos fermentativos (BERGER, 1995; COSTELLI, 2005). No entanto, deve-se lembrar que as matérias-primas derivadas do petróleo são limitadas, e no futuro, não será mais possível utilizá-las para a produção de diversos compostos.

Além disso, processos fermentativos afetam menos o meio ambiente. Esta característica é de extrema importância nos dias atuais, devido as maiores preocupações, a nível mundial, com a preservação do meio ambiente.

2.1.5 Microrganismos produtores de aromas

A tecnologia para a produção de aromas é baseada principalmente em materiais de plantas naturais, onde as flutuações sazonais são uma desvantagem. Por outro lado, produtos aromáticos sintéticos geralmente carecem de estereoseletividade. Por estas razões, os microrganismos são fontes potenciais de essências naturais (PASTORE et al., 1994).

Os microrganismos são importantes nos alimentos, produzindo aromas desejáveis ou indesejáveis em determinados casos, além de formarem certos alimentos que não poderiam ser produzidos sem a assistência deles. O gosto e o aroma, desejáveis ou não, são produzidos pelos subprodutos do metabolismo do microrganismo: ácido láctico, acetaldeído, álcool, ácido acético, dióxido de carbono, diacetil, entre outros (COLLINS, 1972).

Diversos microrganismos são capazes de produzir aromas. Dentre eles, as bactérias e leveduras merecem especial destaque, conforme descrito por Fabre (1995), citado por TEIXEIRA (1999), pois apresentam vantagens consideráveis em relação aos fungos filamentosos, devido à sua fácil tecnologia, conhecimento biológico e às diversas modificações genéticas realizadas nestes microrganismos.

Na Tabela 2.1 estão listados alguns microrganismos, bactérias e leveduras, utilizados para a produção de aromas.

Tabela 2.1. Microrganismos produtores dos aromas de interesse: acetoína e 2,3-butanodiol.

Gênero	Espécie	Produtos	Referências bibliográficas
<i>Klebsiella</i>	<i>K. pneumoniae</i>	2,3-butanodiol	YU & SADDLER, 1982
	<i>K. oxytoca</i>	acetoína, 2,3-butanodiol	JANSEN et al., 1984
<i>Lactococcus</i>	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	acetoína, diacetil, lactato, acetato	KANEKO et al., 1990
	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>		BOUMERDASSI et al., 1997
	<i>L. diacetylactis</i>	ác. α -acetolactato, acetoína, diacetil	MONNET et al., 1994
<i>Hanseniaspora</i>	<i>H. guilliermondii</i>	etanol e acetoína	ROMANO et al., 1993
<i>Kloeckera</i>	<i>K. apiculata</i>		
<i>Streptococcus</i>	<i>S. thermophilus</i>	acetoína, acetaldeído, acetona, diacetil, etanol	BERGER, 1995
<i>Leuconostoc</i>	<i>L. oenos</i>	acetoína, diacetil, lactato, acetato, 2,3-butanodiol, aspartato	RAMOS et al., 1995
	<i>L. mesenteroides</i>	acetoína, acetato, diacetil, lactato	CAÑAS & OWENS, 1999
<i>Enterobacter</i>	<i>E. aerogenes</i>	acetoína, etanol, acetato, 2,3-butanodiol	ZENG et al., 1990
		acetoína, acetato, lactato, 2,3-butanodiol, etanol	ZENG et al., 1994
<i>Bacillus</i>	<i>B. polymyxa</i>	acetoína, 2,3-butanodiol	SEREBRENNIKOV, 1995
		acetato, 2,3-butanodiol, etanol, acetoína	NAKASHIMADA et al., 1998
	<i>B. licheniformis</i>	ác. acético, etanol, acetato, 2,3-butanodiol, formato, lactato	MARWOTO et al., 2004
		2,3-butanodiol, acetoína, acetato, etanol, formato, glicerol, lactato	PEREGO et al., 2003

Continuação da Tabela 2.1

Gênero	Espécie	Produtos	Referências bibliográficas
<i>Acetobacter</i>	<i>A. hansenii</i>	diacetil, 2,3-butanodiol, acetoína	FAVERI et al., 2003
<i>Kloeckera</i>	<i>K. apiculata</i>		
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i>		
<i>Candida</i>	<i>C. stellata</i>	acetoína, 2,3-butanodiol	ROMANO et al., 2003
<i>Metschnikowia</i>	<i>M. pulcherrima</i>		
<i>Brettanomyces</i>	<i>B. bruxellensis</i>		

2.2 *Bacillus polymyxa*

As bactérias do gênero *Bacillus* estão classificadas dentro dos microrganismos aeróbicos ou facultativos. Podem ser gram positivos ou gram variáveis e crescem favoravelmente em meios sintéticos que contêm açúcares, ácidos orgânicos, álcoois, entre outros, como únicas fontes de carbono e amônio como única fonte de nitrogênio. Em sua grande maioria produzem endosporos, isto é, aqueles esporos que se formam no interior da célula. Tais endosporos são termorresistentes, tolerando limites de temperatura de 55 a 70°C, e também resistem à dissecação, radiação, aos ácidos e desinfetantes químicos. O limite inferior de pH tolerado está entre 2 e 3. Antibióticos como bacitracina, polimixina, tirocidina, gramicidina e circulina são produzidos por essa classe de microrganismos (LUERCE, 2002; BIO LAND – Características del NUTRI-COMPOST™, 2007). Muitas espécies de *Bacillus* produzem enzimas extracelulares capazes de degradar vários polissacarídeos de plantas. Comparados com outras bactérias, espécies de *Bacillus* têm sido extensivamente utilizados em fermentações industriais, particularmente para a produção de amilases e proteases (HESPELL, 1996).

Testes do grupo *Bacillus* que contribuem para a identificação dessa classe de bactérias envolvem a produção de ácido e ou gás a partir da glicose, teste de Voges-Proskauer (para redutores de butanodiol), redução de nitrato, capacidade de crescimento sob a forma anaeróbica e motilidade. O método de cultivo enriquecido utilizado para o isolamento das espécies consiste de ausência de luz, incubação aeróbica com ingredientes principais a base de

amido e amônio, e oxigênio como aceptor de elétrons (LUERCE, 2002; BIO LAND – Características del NUTRI-COMPOST™, 2007).

Bacillus polymyxa são bactérias gram variáveis, mesófilas e produzem esporos ovais, com paredes grossas (LUERCE, 2002; BIO LAND – Características del NUTRI-COMPOST™, 2007). A maior vantagem deste microrganismo está na capacidade de utilizar vários monossacarídeos (glicose, xilose, galactose, trealose), dissacarídeos (lactose, celobiose, manose, levulose, sacarose, maltose), polissacarídeos (amido, xilana) e lipídeos, permitindo que o organismo empregue tais produtos como fontes de carbono e doadores de elétrons (MOLINA, 1995). É uma das poucas espécies de *Bacillus* que crescem em condições anaeróbicas, e possuem a capacidade de produzir somente *levo*-isomero de butanodiol, como também formar etanol de açúcares (HESPELL, 1996, LAUBE et al., 1984). Além do butanodiol e etanol, *B. polymyxa* excreta também acetoína, diacetil, acetato de etila, ácido láctico, ácido acético, acetona e ácido fórmico como produtos da fermentação de glicose (DE MAS et al., 1988; MANKAD & NAUMAN, 1992). Esta bactéria também é conhecida como *Aerobacillus polymyxa*, *Granulobacter polymyxa*, *Clostridium polymyxa* ou *Paenibacillus polymyxa*.

A Figura 2.1. mostra a bactéria *B. polymyxa* CCT 512.

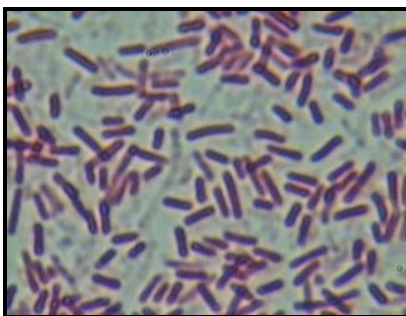


Figura 2.1. Bactéria *B. polymyxa* CCT 512.

2.3 Acetoína

A acetoína é um aromatizante utilizado pelas indústrias de alimentos, na formação de produtos lácticos e bebidas. Produzido geralmente por processos fermentativos, utilizando bactérias e leveduras, não é o único componente responsável pelos aromas dos produtos

alimentícios. A acetoína está relacionada, normalmente, com o diacetil, um aromatizante produzido também pelo mesmo processo. Estes dois componentes formam os aromas de diversos produtos, principalmente queijos e manteigas, além de funcionarem como “carriers” de outros aromas, como o vinagre e o café (ANTINONE et al., 1994; CARVALHO, 1999).

Produto normal da fermentação alcoólica, a acetoína é um componente muito importante no estudo dos vinhos, devido ao envolvimento com o “bouquet” deste produto (ROMANO & SUZZI., 1996). Seu teor em vinhos geralmente é baixo e sua presença nestes não é muito desejada principalmente por tratar-se de uma substância derivada do diacetil, o qual apresenta um forte odor característico. Em vinagres, o teor encontrado é bastante superior ao dos vinhos e sua determinação está associada ao produto original (TAKEMOTO, 2000).

A acetoína, também conhecida como 3-hidroxi-2-butanona, acetil metil carbinol, dimetilcetol ou γ -hidroxi- β -oxobutano, é uma cetona de odor agradável, cuja massa molecular é 88,10, fórmula química $C_4H_8O_2$, ponto de ebulição $148^\circ C$ e ponto de fusão de $15^\circ C$ (MERCK, 1990, COSTELLI, 2005). Além de ser produzida por processos fermentativos, pode ser obtida por via sintética a partir do diacetil por redução parcial.

2.4 2,3-Butanodiol

Segundo Ledingham & Neish (1954), citado por (MOLINA, 1995), o 2,3-butanodiol, que recebe também os nomes de 2,3-butileno glicol, 2,3-dihidroxibutano e dimetilenoglicol, é um líquido viscoso, incolor e inodoro. É encontrado em pequenas quantidades em tecidos de plantas e animais superiores, assim como em vários produtos alimentícios, neste caso, pela ação de microrganismos.

Conforme Neish (1944), citado por SILVEIRA (1991), dependendo do microrganismo produtor, 2,3-butanodiol pode se apresentar em três formas isoméricas diferentes: dextro-rotatório, L(+), levo-rotatório, D(-), e meso. O ponto de ebulição de cada uma das conformações apresentadas é $178^\circ C$ para as formas L(+) e D(-) e $182^\circ C$ para a forma meso. No caso de ocorrência de mistura de isômeros, o ponto de ebulição se coloca numa faixa intermediária de acordo com a composição da mistura. Sua fórmula química é $C_4H_{10}O_2$.

O 2,3-butanodiol, juntamente com a acetoína, é um produto da fermentação alcoólica, sendo o segundo componente mais abundante no vinho. Geralmente, este aromatizante não

afeta as qualidades sensoriais das bebidas alcoólicas, mas em elevadas concentrações pode modificar o “bouquet” e o corpo do vinho, devido a seu gosto levemente amargo e sua viscosidade (ROMANO et al., 1998). Ainda na indústria de alimentos, a desidrogenação catalítica do 2,3-butanodiol produz diacetil, outro aromatizante presente em diversos produtos além do vinho (MOLINA, 1995).

As aplicações de 2,3-butanodiol não se restringem somente à indústria alimentícia. Este pode ser utilizado na produção de 1,3-butadieno, intermediário na produção de borracha sintética, cujo processo é conhecido desde a Segunda Guerra Mundial. O baixo ponto de congelamento do levoisômero (-60°C) pode substituir o uso de etilenoglicol como agente anti-congelante. Além disso, o elevado calor de combustão (27.200 kJ/kg) se compara favoravelmente ao do etanol (29.100 kJ/kg) e do metanol (22.100 kJ/kg), indicando a possibilidade de sua utilização como combustível. 2,3-Butanodiol pode também ser utilizado na manufatura de polímeros, tintas de impressão, perfumes, explosivos, plastificantes e como “carriers” de produtos farmacêuticos (FLICKINGER, 1980; ZENG et al., 1990; SILVEIRA, 1991; MOLINA, 1995; PEREGO et al., 2003).

Outra característica importante, do ponto de vista ecológico, é descrita por Tegtmeier, citado por MOLINA (1995), que destaca o fato do 2,3-butanodiol ser um composto biodegradável, podendo ser empregado na fabricação de produtos menos agressivos ao meio ambiente.

2.5 Biossíntese de acetoína e 2,3-butanodiol

Os microrganismos capazes de se desenvolver em ausência de oxigênio e de qualquer outro acceptor final de elétrons exógeno conseguem oxidar substratos através de um processo denominado fermentação. Neste processo, a oxidação do substrato é acompanhada da redução de coenzimas, como na oxidação aeróbia. A falta de acceptor final de elétrons impede, entretanto, que a reoxidação destas coenzimas possa ser feita pela cadeia de transporte de elétrons. Esta oxidação é, então, obtida pela transferência dos elétrons das coenzimas reduzidas diretamente para um composto orgânico, originado pela própria via de oxidação do substrato. O composto reduzido geralmente é eliminado para o meio externo (BARBOSA & TORRES, 1998).

Embora outros compostos possam ser utilizados para as fermentações, os açúcares são, de longe, os substratos mais frequentes deste processo. Na fermentação de açúcares, a degradação do substrato é normalmente realizada pela via glicolítica, com a produção de piruvato. Na conversão de uma molécula de glicose a duas de piruvato são, portanto, produzidas duas moléculas de NADH. Estas coenzimas reduzidas são oxidadas por transferência de elétrons para o piruvato, ou para compostos dele derivados (BARBOSA & TORRES, 1998).

Segundo COLLINS (1972), a reação chave para a utilização do piruvato é a sua descarboxilação à hidroxietiltiamina pirofosfato, chamado complexo acetaldeído-TPP, a qual requer tiamina pirofosfato e um metal divalente. As bactérias, exceto *Escherichia coli*, utilizam o mecanismo descrito na Figura 2.2. O complexo acetaldeído-TPP reage com outra molécula de piruvato, formando o ácido α -acetoláctico, o qual é descarboxilado para formar acetoina. Em presença de NAD reduzida e da enzima redutase, a acetoina pode ser reduzida a 2,3-butanodiol, com simultânea oxidação da NAD.

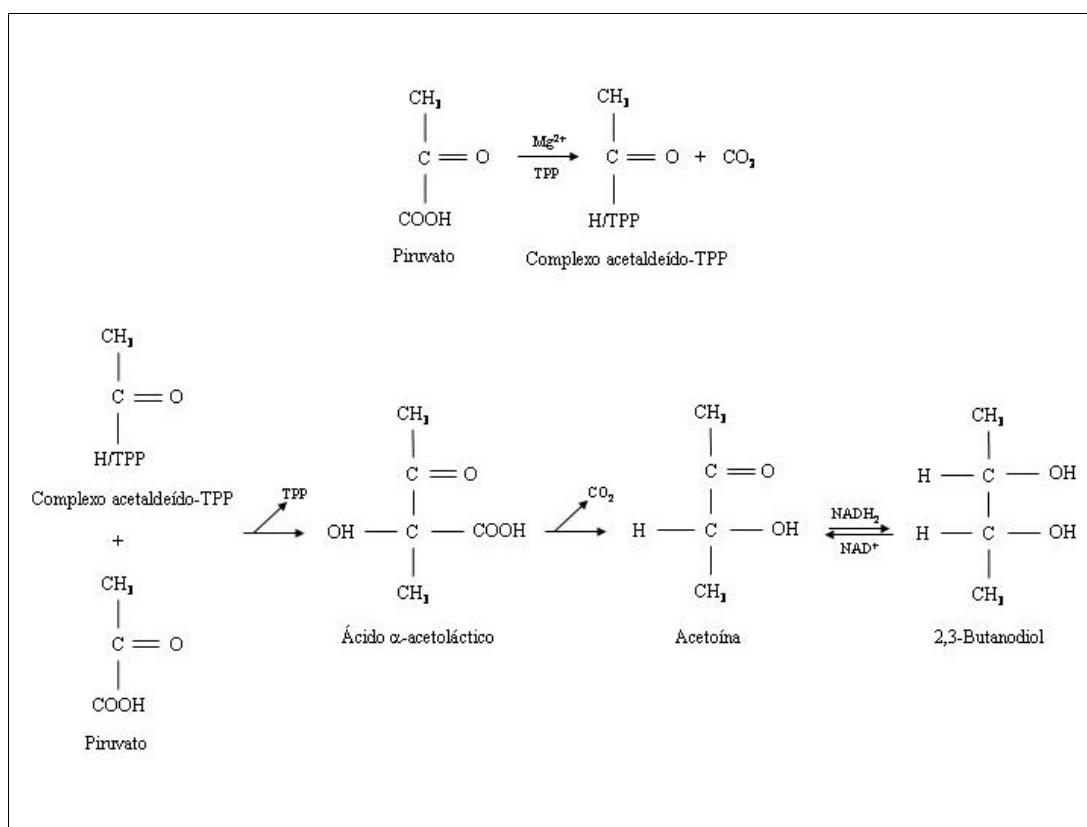


Figura 2.2. Mecanismo de formação da acetoina e 2,3-butanodiol.

2.6 Fatores que influenciam a produção de acetoína e 2,3-butanodiol

2.6.1 Temperatura

O efeito da temperatura na produção de 2,3-butanodiol foi estudado por PEREGO et al. (2003), utilizando uma cepa de *Bacillus licheniformis*. Os autores aumentaram progressivamente a temperatura de 34 para 40°C, e verificaram que até 37°C ocorreu um aumento na concentração final do produto, bem como na produtividade volumétrica média e máxima (considerando acetoína + 2,3-butanodiol). Utilizando temperaturas maiores, observou-se a diminuição da concentração de 2,3-butanodiol e da produtividade, provavelmente devido à inativação térmica da biossíntese a temperaturas mais elevadas que a ótima, considerada neste caso 37°C. A concentração de acetoína não pareceu ser significativamente dependente da temperatura.

A biossíntese do 2,3-butanodiol inicia com o piruvato e envolve três enzimas: acetolactato sintase e acetolactato descarboxilase são responsáveis pela formação de acetoína, e NADH-dehidrogenase converte a acetoína em 2,3-butanodiol. SEREBRENNIKOV (1994) estudou a influência da temperatura na atividade destas três enzimas. Para tanto, o autor utilizou extrato de células livres de *Bacillus polymyxa*, para a biossíntese de acetoína, e uma preparação parcialmente purificada de butanodiol dehidrogenase. Os resultados obtidos mostraram que as enzimas produtoras de acetoína exibem uma ótima operação a temperaturas entre 37 e 40°C, e para a enzima responsável pela formação de 2,3-butanodiol a temperatura ótima é de aproximadamente 70°C.

ROMANO & SUZZI (1996) relatam que a produção de acetoína durante a fermentação do vinho por leveduras é dependente da temperatura. Quando a temperatura aumenta, a velocidade de decomposição de α -acetolactato também aumenta, e mais diacetil e acetoína são produzidos.

2.6.2 Aeração

A disponibilidade de oxigênio presente no meio de cultura afeta a produção de acetoína, 2,3-butanodiol, acetato, etanol e lactato, utilizando o microrganismo *Bacillus polymyxa*, num processo fermentativo. No estudo da aeração realizado por DE MAS et al.

(1988), os autores mostram que o rendimento de 2,3-butanodiol alcança valores máximos em velocidades de transferência de oxigênio de 15 mmol/L/h. Em velocidades maiores, o rendimento deste produto diminui, enquanto elevadas quantidades de acetoína e acetato são excretados pelo microrganismo. Utilizando velocidades menores, a produção de etanol e lactato são favorecidas, e baixas concentrações de 2,3-butanodiol são obtidas.

SABLAYROLLES & GOMA (1984), estudaram a produção de 2,3-butanodiol por *Aerobacter aerogenes* NRRL B199. Os autores verificaram que a velocidade específica de produção de 2,3-butanodiol aumenta quando a concentração de oxigênio dissolvido atinge valores próximos de zero. Um aumento da transferência de oxigênio diminui a velocidade específica de produção deste produto. Segundo os autores, a aeração favorece a produção de biomassa à custa do 2,3-butanodiol.

O efeito da aeração na produção de 2,3-butanodiol também foi estudado por NAKASHIMADA et al. (1998), utilizando a bactéria *Paenibacillus polymyxa*. Segundo os autores, a velocidade de aeração elevada, 0,8 vvm, reduz a formação de etanol e acetato, e favorece a produção de acetoína. Com relação ao 2,3-butanodiol, a velocidade de aeração de 0,3 vvm foi considerada ótima para a formação deste produto.

BOUMERDASSI et al. (1996), estudaram a produção de acetoína pelo microrganismo *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. Os resultados obtidos mostraram que tanto em condições anaeróbicas ou aeróbicas ocorre a formação deste produto. Entretanto, conforme se aumenta a concentração de oxigênio dissolvido no meio, ocorre maior produção de acetoína.

2.6.3 Concentração inicial de substrato

A concentração inicial de xilose foi estudada por LAUBE et al. (1984), visando a formação de 2,3-butanodiol por *Bacillus polymyxa*. O aumento da concentração de substrato de 1 até 6%, ampliou o rendimento do produto de interesse, o 2,3-butanodiol, obtendo-se melhores resultados utilizando 4 ou 6% de xilose. Uma concentração superior, de 10%, inibiu a formação do composto pelo microrganismo.

MOLINA (1995), utilizando a bactéria *Klebsiella pneumoniae*, variou a concentração inicial de sacarose de 24,2 até 181 g/L, com o objetivo de verificar a influência deste parâmetro na produção de 2,3-butanodiol. Os resultados obtidos mostraram que conforme se aumenta a concentração de substrato, obtém-se maiores concentrações de produtos. A máxima

produção de 2,3-butanodiol ocorreu utilizando 181 g/L de sacarose. O mesmo não ocorre para a produtividade, que atinge seu valor máximo usando 105 g/L de sacarose.

LUERCE (2002) avaliou a concentração inicial de glicose, 30, 40 e 50 g/L, para a produção de acetoína pelo microrganismo *Bacillus polymyxa*. Os resultados alcançados pelo autor indicam que elevadas quantidades do produto são obtidas ao se utilizar a maior concentração inicial de substrato, 50 g/L.

2.6.4 Potencial hidrogeniônico (pH)

O pH é um parâmetro fundamental na regulação do metabolismo das bactérias e esta influência é especialmente acentuada no processo envolvendo a formação de múltiplos subprodutos. O pH do meio fermentativo afeta a composição da biomassa e a natureza do metabolismo bacteriano (GARG & JAIN, 1995). Como a maioria das bactérias crescem mais lentamente em pH baixo, há uma maior disponibilidade de piruvato para ser utilizado na produção de acetoína, visto que, ao crescerem, as células requerem uma quantidade menor de piruvato para a síntese de material celular (TEIXEIRA, 1999).

O estudo realizado por JANSEN et al. (1984) avaliou a influência do pH sobre a produção de 2,3-butanodiol por *Klebsiella oxytoca*. Os autores observaram que entre os pHs estudados 4,4 e 5,8 o rendimento do produto não parece ser muito afetado por este parâmetro do processo, atingindo um pico de maior produção entre 5,2 e 5,6. Utilizando valores maiores de pH, como 6,0, o rendimento de 2,3-butanodiol diminui. Segundo os autores, esta diminuição ocorre devido a redução da atividade das enzimas produtoras deste aromatizante.

RAMOS et al (1995), utilizando o microrganismo *Leuconostoc oenos*, verificaram que em pH 4,0, maiores concentrações de acetoína foram produzidas, enquanto que em pH 6,2 somente foram observados a formação de lactato e acetato. Utilizando condições intermediárias, pH 5,0, acetato, lactato e acetoína foram produzidas em iguais proporções molares (1:1:1), com baixa produção de 2,3-butanodiol.

COSTELLI (2005) estudou a influência do pH na produção de acetoína pelo microrganismo *Bacillus polymyxa*. Os pHs avaliados foram 4,5, 5,0 e 5,5. Os resultados obtidos pelo autor mostraram que as maiores concentrações do produto foram alcançados nos ensaios realizados com o maior pH, 5,5.

2.6.5 Inóculo

O volume do inóculo usado na bioconversão de glicose ou xilose não parece afetar significativamente o rendimento final de 2,3-butanodiol (GARG & JAIN, 1995). Segundo ROMANO & SUZZI (1996), a formação de acetoína depende das cepas de microrganismos utilizados na fermentação, embora a quantidade de células viáveis presente no processo apresenta uma influência maior na formação do produto.

YU & SADDLER (1982), observaram que o volume do inóculo, para a formação de 2,3-butanodiol pela bactéria *Klebsiella pneumoniae*, não afeta o rendimento final do produto. Somente no consumo de xilose em concentrações maiores que 10%, o volume do inóculo apresenta influência no processo.

2.7 Considerações finais

Diversos trabalhos relacionados com a produção de acetoína e 2,3-butanodiol estão presentes na literatura, indicando as ótimas condições do processo. Sabe-se que alterações no cultivo, como mudança de substrato ou microrganismo, afeta significativamente a formação destes produtos e, portanto, existe uma variedade muito grande de informações na literatura, enfocando principalmente os vinhos, quando o objetivo é a produção de acetoína, ou a borracha, no caso do 2,3-butanodiol. No entanto, poucos trabalhos referentes à formação destes aromas, para aplicação nas indústrias de alimentos, foram publicados nos últimos anos, principalmente utilizando a bactéria *Bacillus polymyxa*.

Conforme descrito neste capítulo, fica evidente que determinados parâmetros do processo, como pH, temperatura, aeração, concentração de substrato, entre outros, são essenciais para uma elevada formação dos dois aromas. Dentre as informações obtidas na literatura, somente se observa uma semelhança entre os trabalhos com relação à aeração, esta deve ser elevada para a produção de acetoína e baixa para a formação de 2,3-butanodiol. Com relação a outros parâmetros, existe uma grande variação das condições ótimas de cultivo. Como exemplo pode-se citar o pH, cujos valores presentes na literatura variam em torno de 4,5 a 6,5, e o substrato utilizado, sendo estes glicose, xilose, sacarose, entre outros, em diversas concentrações iniciais. Portanto, torna-se necessário um estudo mais detalhado destes parâmetros para realmente se obter máximas concentrações destes produtos, e posteriormente

ampliar a escala, visando a produção industrial para as diversas áreas que utilizam estes dois compostos.

O presente trabalho foi desenvolvido para fornecer outras informações à literatura, com relação a formação dos aromas acetoína e 2,3-butanodiol, utilizando a bactéria *Bacillus polymyxa*, pelo fato deste microrganismo ser um bom produtor destes aromas e de haver carência de resultados experimentais. Desta forma, realizou-se um estudo da influência da fonte de nitrogênio, pH e transferência de oxigênio no crescimento do microrganismo, consumo de substrato e produção dos aromas, utilizando um meio de cultura sintético, cuja fonte de carbono foi a glicose.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Engenharia Bioquímica, do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, na Universidade Federal de Santa Catarina.

3.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado nos ensaios fermentativos foi a bactéria *Bacillus polymyxa* CCT 512 (referência ATCC 842), fornecida pela Fundação Tropical de Pesquisas Tecnológicas “André Tosello”.

3.2 Meio de manutenção

O meio utilizado na manutenção do microrganismo foi o Meio AN (*Agar Nutrient*), cuja composição está descrita na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Composição do Meio AN para manutenção do microrganismo.

Componentes	Concentração (g/L)
Extrato de carne	3
Peptona bacteriológica	5
Ágar	15

Os componentes do meio foram misturados na água destilada e aquecidos, até completa diluição. Posteriormente, o meio foi autoclavado, juntamente com placas de petri, a 121°C durante 15 minutos. A seguir, o meio foi distribuído nas placas, e após a solidificação deste meio, foi feita a inoculação do microrganismo utilizando uma alça de platina. As placas inoculadas foram incubadas em estufa bacteriológica, a 30°C durante 24 horas. Após este período, as placas foram protegidas com insulfilm, e mantidas sobre refrigeração a 4°C. A Figura 3.1 mostra uma placa inoculada com o microrganismo. A repicagem foi realizada a cada dois meses.



Figura 3.1. Microrganismo *Bacillus polymyxa* inoculado no meio de manutenção AN.

3.3 Inóculo

O meio de cultura utilizado na preparação do inóculo foi o Meio YM (*Yeast Malt Extract*), cuja composição está descrita na Tabela 3.2, conforme DE MAS et al. (1988).

Tabela 3.2. Composição do Meio YM utilizada para a preparação do inóculo.

Componentes	Concentração (g/L)
Extrato de levedura	3
Extrato de malte	3
Peptona bacteriológica	5
Glicose	30

Para a preparação do inóculo, foram utilizados erlenmeyers aletados de 1L, contendo 400 mL de meio de cultura, e cobertos com tampões de algodão, para permitir uma adequada aeração e evitar possíveis contaminações. Estes foram autoclavados durante 15 minutos a 121°C. Após este período, foi feita a inoculação do microrganismo, adicionando ao meio três alçadas de células da cultura estoque. Posteriormente, os frascos foram incubados em shaker, modelo TE-421 TECNAL, com agitação orbital de 150 rpm, a 37°C durante 17 horas. Neste período de incubação, o microrganismo atinge a fase exponencial do crescimento microbiano, segundo COSTELLI (2005). O volume do inóculo utilizado, para cada ensaio fermentativo, foi equivalente a 10% do volume total do meio de cultura.

3.4 Ensaio fermentativos

Os ensaios fermentativos podem ser separados em três conjuntos de estudos, cujos objetivos foram avaliar a influência da fonte de nitrogênio; a influência do pH e da transferência de oxigênio; e a ampliação de escala utilizando um biorreator. Em todos os

ensaios foram analisados o crescimento do microrganismo, o consumo de glicose e a produção dos aromas, acetofina e 2,3-butanodiol.

No primeiro conjunto, onde se estudou a influência da fonte de nitrogênio, os ensaios foram realizados em frascos de Erlenmeyers aletados de 1L, contendo 400 mL de meio de cultura, para se obter uma elevada transferência de oxigênio, e cobertos com tampões de algodão. O meio de cultura utilizado foi o Meio PAY, conforme descrito por DE MAS et al. (1988), cuja composição está apresentada na Tabela 3.3. Este meio foi modificado, substituindo o extrato de levedura pelo sulfato de amônio e pela uréia, sendo que a concentração de nitrogênio presente no meio foi a mesma para todos os cultivos (Anexo I) . A Tabela 3.4 mostra as concentrações utilizadas para os dois componentes diferentes.

Tabela 3.3. Composição do Meio PAY utilizado nos ensaios fermentativos.

Componentes	Concentração
K_2HPO_4	9,16 g/L
KH_2PO_4	1,75 g/L
$(NH_4)_2HPO_4$	2,9 g/L
$(NH_4)_2SO_4$	5,8 g/L
Extrato de levedura	13,1 g/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	219 mg/L
$FeSO_2 \cdot 7H_2O$	44 mg/L
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	8,8 mg/L
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,9 mg/L
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,9 mg/L
EDTA	44 mg/L
H_2SO_4	150 mg/L
Glicose	50 g/L

Tabela 3.4. Modificação do Meio PAY, utilizando duas fontes de nitrogênio diferentes.

Componentes	Concentração (g/L)
Sulfato de amônio	6,24
Uréia	2,85

Este meio foi autoclavado a 121°C durante 15 minutos em duas partes separadas: uma contendo a solução de sais de fosfato e de amônio, juntamente com a fonte de nitrogênio utilizada para cada ensaio, e uma segunda solução composta pela glicose, os demais sais e o ácido sulfúrico. Tal procedimento é necessário a fim de impedir a ocorrência de reações indesejáveis e também para evitar a precipitação de sais. Após este procedimento, as duas partes do meio foram misturadas nos frascos de Erlenmeyers estéreis, e o pH inicial foi ajustado para 6,5.

Os ensaios realizados para avaliar a influência do pH e da transferência de oxigênio, também foram conduzidos em frascos de Erlenmeyers aletados de 1L, cobertos com tampões de algodão. No entanto, o volume do meio de cultura e o pH foram diferentes para cada ensaio, sendo que metade destes foram realizados com controle do pH ao longo do cultivo, e nos restantes apenas ajustou-se o pH inicial. O meio de cultura utilizado neste conjunto de experimentos foi o Meio PAY, autoclavados em duas partes separadas, conforme descrito anteriormente. A Tabela 3.5 mostra os ensaios realizados, juntamente com os valores de cada parâmetro.

Tabela 3.5. Identificação dos ensaios realizados.

Ensaio realizado com o controle do pH	Ensaio realizado sem o controle do pH	Volume (mL)	pH
1	6	400	4,5
2	7	600	4,5
3	8	400	6,5
4	9	600	6,5
5	10	500	5,5

Nestes dois primeiros conjuntos de experimentos, os frascos foram incubados em shaker, modelo TE-421 TECNAL, com agitação orbital de 150 rpm, a 37°C por 24 ou 48 horas, dependendo da duração da fase de adaptação do microrganismo. O ajuste do pH inicial, ou o controle durante o processo, foram feitos adicionando-se algumas gotas de soluções de ácido sulfúrico (H₂SO₄) e hidróxido de sódio (NaOH) 10% (p/v). O controle do pH ao longo do cultivo foi realizado retirando-se os frascos de Erlenmeyers do shaker e medindo-se o pH

do meio de cultura utilizando um pHmetro modelo pH 330i/SET, Wissenschaftlich Technische Werkstätten. A Figura 3.2 mostra um ensaio realizado nestes dois conjuntos de experimentos.

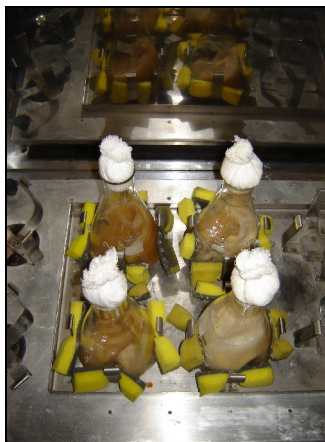


Figura 3.2. Ensaio realizado em shaker.

A ampliação de escala foi realizada em um biorreator New Brunswick Scientific CO INC, modelo BIOFLO III, com capacidade de 6L, e volume útil de 4L. Este equipamento possui sondas automáticas para medição de pH, temperatura e oxigênio dissolvido no meio de cultura. Contém quatro bombas peristálticas que permitem controlar o pH, através da adição de soluções ácidas e básicas, a formação de espumas e a adição de nutrientes. A agitação do meio é realizada por duas turbinas, localizadas no centro do equipamento, possuindo a função de agitar o meio de cultura e quebrar a espuma formada durante o cultivo. O ar, proveniente de um compressor, passa primeiramente por um filtro estéril antes de entrar no biorreator, sendo sua vazão controlada por um rotâmetro. A Figura 3.3 mostra o biorreator utilizado neste cultivo.

Neste ensaio o meio de cultivo utilizado foi o Meio PAY, sendo esterilizado a 121°C durante 15 minutos, em duas partes separadas, conforme explicado anteriormente. A primeira parte foi autoclavada num recipiente de vidro, coberto por papel alumínio, e a segunda parte dentro do biorreator. As sondas de pH e oxigênio dissolvido foram esterilizadas com álcool 70%, antes de serem colocadas no equipamento, no início do cultivo. O pH utilizado foi 6,5, controlado durante todo o processo, através da adição de soluções de ácido sulfúrico (H_2SO_4) e hidróxido de sódio (NaOH) 10% (p/v). A aeração e a agitação inicial foram de 0,25 vvm e

200 rpm, respectivamente, sendo que estas variaram ao longo do cultivo, de forma a manter o microrganismo em condições aeróbias, utilizando, portanto, uma sonda de oxigênio dissolvido. A temperatura foi a mesma utilizada nos ensaios em frascos, 37°C, e a formação de espuma foi controlada pela adição do antiespumante Silicone, através de uma seringa no topo do biorreator.



Figura 3.3. Biorreator New Brunswick Scientific CO INC, modelo BIOFLO III.

3.5 Métodos analíticos

3.5.1 Amostragem

Em todos os ensaios foram retiradas alíquotas de aproximadamente 2 mL, a cada 1, 2 ou 3 horas, dependendo da fase de crescimento do microrganismo. Nos experimentos realizados em shaker, as amostras foram coletadas utilizando pipetas automáticas, próxima à chama do bico de Bunsen. No caso do biorreator, as amostras foram retiradas através de um coletor acoplado ao equipamento.

Após a análise do crescimento microbiano, realizado por turbidimetria, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm durante 5 minutos, em centrífuga Hsiangtai Machinery Ind. Co. Ltda, modelo MCD-2000. O sobrenadante foi armazenado sob refrigeração a -4°C, para análises posteriores.

3.5.2 Avaliação da contaminação

A avaliação da contaminação foi realizada através do Método de Gram, em todos os ensaios fermentativos. Este método baseia-se no fato de que, quando certas bactérias são coradas pelo Cristal Violeta e depois tratadas pelo Lugol, forma-se um composto de coloração escura entre o iodo e o corante (iodopararrosanilina), o qual é fortemente retido pelas bactérias e não pode ser facilmente removido pelo tratamento subsequente com álcool-acetona: são as bactérias Gram positivas. Outras bactérias, chamadas Gram negativas, deixam-se descorar pela solução de álcool-acetona. Após uma coloração com fucsina, as bactérias Gram negativas apresentarão a cor vermelha, ao passo que as Gram positivas serão roxas, conservando a cor violeta.

Para a realização deste método, é necessário efetuar um esfregaço sobre uma lâmina, com a amostra do ensaio fermentativo. A técnica de coloração consiste em cobrir a lâmina com a solução de Cristal Violeta, deixando agir durante 30 segundos a 1 minuto. Após este período deve-se escorrer o excesso de corante. Posteriormente, verte-se a solução de Lugol para Gram, deixando agir por 1 minuto e retira-se o excesso. A preparação deve ser lavada com a solução de Álcool-Cetona, até que a cor roxa cesse de desprender-se, e em seguida com água destilada. Posteriormente, cora-se com Fucsina Fenicada de Gram, durante 30 segundos, e deixa-se escorrer o excesso de corante. Após esta etapa, a preparação deve ser lavada com água destilada. A lâmina deve ser secada para efetuar-se a leitura, utilizando a objetiva de imersão.

3.5.3 Determinação da concentração celular

A concentração celular obtida nos ensaios fermentativos foi determinada por dois métodos: indiretamente por turbidimetria e diretamente por gravimetria, conforme Leveau & Bouix, citado por COSTELLI (2005).

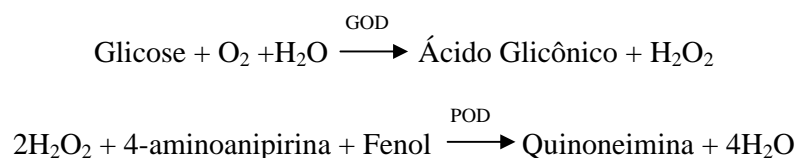
A absorvância das amostras foi medida a um comprimento de onda de 540 nm, em espectrofotômetro TECNAL, modelo Bel Photonics 1105, em cubetas cilíndricas de vidro de 1 cm de diâmetro. As amostras foram diluídas sempre que a absorvância fosse superior a 0,900. Os valores obtidos foram convertidos em concentração celular (massa seca de células por volume de suspensão) através de uma curva de calibração determinada para cada ensaio.

A curva de calibração (Anexo II) foi construída coletando-se 5 mL da suspensão celular no final do processo, em eppendorfs previamente tarados, os quais foram centrifugados a 14000 rpm durante 5 minutos, em centrífuga Hsiangtai Machinery Ind. Co. Ltda, modelo MCD-2000. O sobrenadante foi descartado, e os eppendorfs foram levados a estufa de secagem, a 105°C por 24 horas. Após este período, os eppendorfs contendo as células foram pesados, e a biomassa determinada pela diferença de massa. Esta etapa foi realizada em duplicata. A concentração celular (g/L) foi obtida dividindo-se a massa média de células secas (g) pelo volume da suspensão utilizado (5 mL).

Coletou-se também 15 mL do caldo fermentativo no final do processo, os quais foram diluídos na faixa de 1:10 até 1:100. Para cada diluição fez-se a leitura da absorbância a 540 nm. A concentração celular obtida por gravimetria foi dividida por cada um dos fatores de diluição utilizados. A curva de calibração foi plotada correlacionando-se a concentração celular (g/L) com a absorbância lida a 540 nm.

3.5.4 Determinação da concentração de glicose

A determinação da glicose nos ensaios fermentativos foi realizada através de um método enzimático-colorimétrico, utilizando o Kit de Glicose-PP (Gold Analisa). Neste método, a glicose oxidase (GOD) catalisa a oxidação da glicose para ácido glicônico e peróxido de hidrogênio. Através de uma reação oxidativa de acoplamento catalisada pela peroxidase (POD), o peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, formando um complexo de cor vermelha (quinoneimina), cuja absorbância medida em 500 nm é diretamente proporcional à concentração de glicose na amostra.



A técnica de análise consiste na adição de 2 mL do reagente de cor à alíquotas de 20 µL do padrão e do sobrenadante das amostras, obtidos após centrifugação. Estes foram homogeneizados e incubados durante 5 minutos a 37°C. Após este período, a absorbância da coloração foi lida contra o branco do reagente, a um comprimento de onda de 500 nm, em

espectrofotômetro TECNAL, modelo Bel Photonics 1105. O branco do reagente foi obtido utilizando somente 2 mL do reagente de cor.

Como a metodologia obedece a Lei de Lambert-Beer, a concentração da amostra pode ser calculada através do Fator de Calibração (F_c), representada pela Equação 3.1.

$$F_c = \frac{C_p}{A_p} \quad (3.1)$$

Onde:

C_p = concentração do padrão (1 g/L)

A_p = absorvância do padrão

A concentração de glicose (C_t) é dada pela Equação 3.2.

$$C_t = A_t \cdot F_c \quad (3.2)$$

Onde:

A_t = absorvância da amostra

O intervalo de medida deste método é de 0,0023 até 5 g/L.

3.5.5 Determinação dos produtos

As concentrações de acetoina e 2,3-butanodiol foram determinadas por cromatografia gasosa. Para tanto, o sobrenadante das amostras coletadas ao longo do cultivo foram diluídas, conforme necessidade, e injetadas no cromatógrafo. Através de uma curva padrão (Anexo III) foi possível obter as concentrações dos aromas.

O cromatógrafo utilizado nas análises, CG-90-DIC, é equipado com detector de ionização de chama (DIC-ar-hidrogênio) e coluna Supelcowax-10 (30m x 0,53mm x 1 mm), com sistema de aquecimento de rampa de temperatura iniciando em 55°C até 130°C, a uma taxa de 20°C/min, temperatura do injetor de 185°C e do detector 230°C. Os cromatogramas foram obtidos e analisados com o auxílio do programa Clarite Lite v.2.2 da DataApex Ltda (Anexo IV)

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Influência da fonte de nitrogênio

O objetivo destes experimentos foi avaliar a influência da fonte de nitrogênio no crescimento do microrganismo e na produção dos aromas de interesse, a acetofina e o 2,3-butanodiol. Portanto, utilizaram-se três fontes de nitrogênio diferentes: extrato de levedura, uréia e sulfato de amônio. O volume do meio de cultura foi de 400 mL, em frascos de Erlenmeyers de 1L, para aumentar a transferência de oxigênio, e o pH inicial foi de 6,5.

A Figura 4.1 mostra os resultados obtidos do crescimento microbiano. Nos ensaios realizados com sulfato de amônio e uréia, o microrganismo apresentou as fases de adaptação, com duração de aproximadamente 2 horas, uma fase linear e a estacionária. Utilizando o extrato de levedura, somente uma fase linear e a estacionária foram observadas. A fase exponencial foi muito pequena, podendo ser desconsiderada.

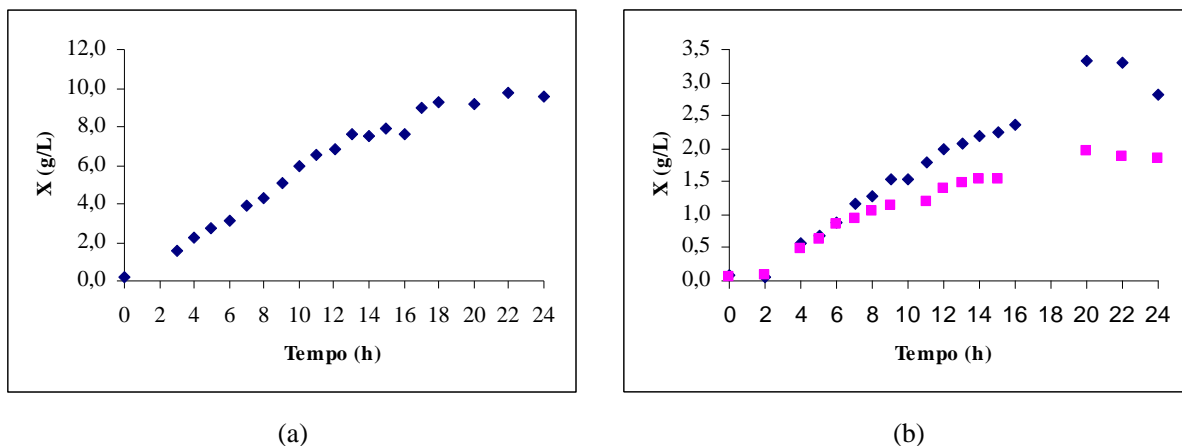


Figura 4.1. Crescimento microbiano para os ensaios conduzidos com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando o meio PAY com 50 g/L de glicose, 150 rpm, 37°C, pH inicial de 6,5 e volume de meio de cultura de 400 mL. (a) Ensaio realizado com 13,1 g/L de extrato de levedura, (b) Ensaio realizado com 2,85 g/L de uréia (♦) e 6,24 g/L de sulfato de amônio (■).

A melhor fonte de nitrogênio para o crescimento microbiano foi o extrato de levedura, com produção de 9,8 g/L de células, em 22 horas de cultivo. Após a pequena fase de adaptação, o microrganismo atinge uma fase linear de crescimento, com velocidade

praticamente constante de 0,56 g/L.h, entre 3 e 15 horas de cultivo. Após este período a velocidade de crescimento diminui alcançando a fase estacionária. O mesmo ocorre para os ensaios com uréia e sulfato de amônio, só que a formação de células, nestes dois casos, foi muito menor. As máximas concentrações celulares obtidas foram de 3,3 e 2,0 g/L em 20 horas, para a uréia e o sulfato de amônio, respectivamente. Na fase linear, a velocidade de crescimento para a uréia foi de 0,16 g/L.h e para o sulfato de amônio foi de 0,09 g/L.h, entre 4 e 16 horas de experimento. Através destes resultados fica claro que existe uma diferença significativa, com relação a velocidade de crescimento do microrganismo, quando se utiliza diferentes fontes de nitrogênio. No entanto, a velocidade específica de crescimento microbiano apresenta o mesmo comportamento, pois em todos os ensaios realizados esta velocidade diminuiu ao longo do tempo (Figura 4.2). Este fato ocorre devido à limitação de algum componente no meio de cultura, que pode ter sido ocasionado pelo oxigênio dissolvido neste meio. No caso do extrato de levedura e uréia, além do mesmo comportamento, as velocidades específicas de crescimento possuem valores semelhantes. A diferença obtida nas velocidades de crescimento pode ser explicada pela concentração celular na fase exponencial, sendo esta muito maior para o cultivo realizado com extrato de levedura comparado com a uréia e sulfato de amônio.

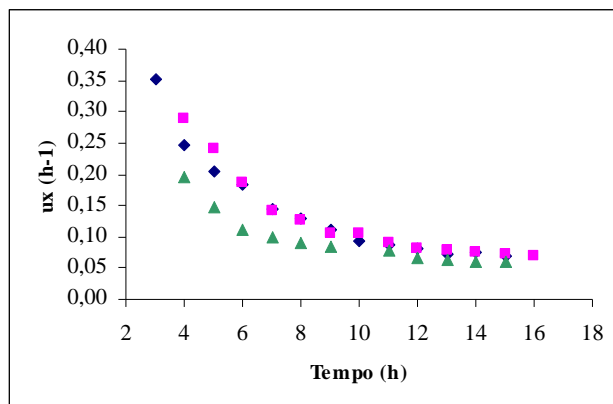


Figura 4.2. Velocidade específica de crescimento ao longo do tempo para os ensaios conduzidos com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando o meio PAY com 50 g/L de glicose, 150 rpm, 37°C, pH inicial de 6,5 e volume de meio de cultura de 400 mL. Extrato de levedura (◆), uréia (■) e sulfato de amônio (▲).

O consumo de glicose pode ser observado na Figura 4.3, para os três ensaios realizados, sendo que a concentração inicial deste componente no meio de cultura foi de 50

g/L. Utilizando o extrato de levedura como fonte de nitrogênio, verifica-se que o microrganismo consumiu toda a glicose presente no meio de cultura, em 20 horas de cultivo. Neste ensaio, o consumo inicia-se na fase linear do crescimento microbiano, e apresenta uma velocidade constante, entre 9 e 18 horas, de 3,31 g/L.h. No caso da uréia e do sulfato de amônio, a concentração de glicose atingiu valores de 20,4 e 36,1 g/L no final do processo, respectivamente. Portanto, é possível verificar que durante o cultivo, que apresentou duração de 24 horas, o microrganismo não foi capaz de consumir todo o substrato disponível no meio. O consumo de glicose, nestes ensaios, também se inicia na fase linear de crescimento, com velocidade constante de 1,58 g/L.h, entre 6 e 22 horas, e de 2,43 g/L.h, entre 7 e 13 horas, para os ensaios realizados com uréia e sulfato de amônio.

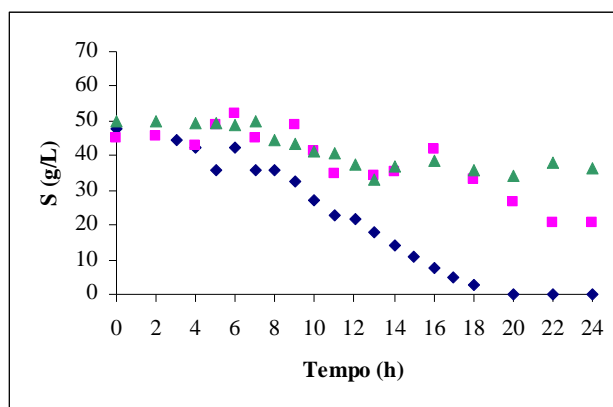


Figura 4.3. Consumo de glicose para os ensaios conduzidos com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando o meio PAY com 50 g/L de glicose, 150 rpm, 37°C, pH inicial de 6,5 e volume de meio de cultura de 400 mL. Extrato de levedura (◆), uréia (■) e sulfato de amônio (▲).

Os resultados obtidos do fator de conversão substrato em células ($Y_{X/S}$) foram 0,17 $g_{cél}/g_{sub}$ para o ensaio conduzido com extrato de levedura e 0,04 $g_{cél}/g_{sub}$ para os ensaios realizados com uréia e sulfato de amônio. Este baixo valor, obtido nos dois últimos ensaios, revela que somente uma pequena quantidade da glicose consumida pelo microrganismo foi transformada em células, o que já foi verificado anteriormente, pois a produção celular foi muito inferior quando comparada ao ensaio realizado com extrato de levedura. A outra parte da glicose consumida foi convertida em produtos, acetoína e 2,3-butanodiol, que podem ter inibido o crescimento do microrganismo. Analisando estes resultados verifica-se que o extrato de levedura é a melhor fonte de nitrogênio, pois este apresenta diversas fontes de carbono e vitaminas, além de outros nutrientes que favorecem a produção de células. Desta forma, o

microrganismo é capaz de consumir totalmente a glicose presente no meio, transformando uma maior parte deste componente em biomassa.

As Figuras 4.4 e 4.5 mostram os produtos formados, acetoína e 2,3-butanodiol. Utilizando sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, somente 2,3-butanodiol é produzido, alcançando máxima concentração em 20 horas de cultivo, com formação de 7,3 g/L. O ensaio realizado com uréia também apresentou um resultado próximo ao do sulfato, atingindo 7,5 g/L de 2,3-butanodiol, em 24 horas. Porém, houve formação de acetoína neste cultivo, que atingiu sua máxima concentração em 22 horas, com formação de 3,8 g/L deste produto. Os resultados obtidos com estas duas fontes de nitrogênio foram muito baixos comparados com a formação dos produtos usando o extrato de levedura. Em 20 horas de experimento, o microrganismo produziu 24,2 g/L de 2,3-butanodiol e, em 24 horas, 15,0 g/L de acetoína. Nota-se um aumento da concentração de acetoína, bem como a diminuição de 2,3-butanodiol, no final do cultivo. Este fato pode ser explicado devido a biossíntese destes dois aromas, pois a acetoína pode ser transformada em 2,3-butanodiol através de uma reação reversível.

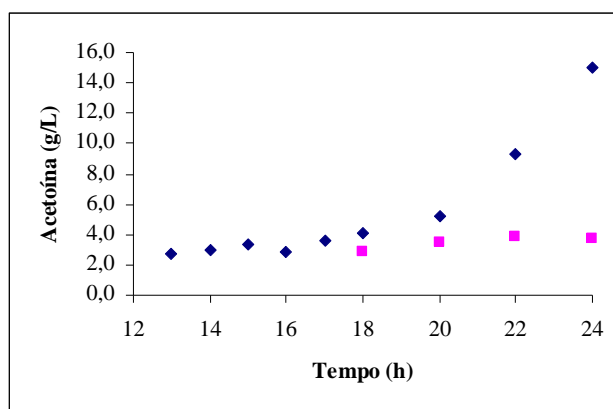


Figura 4.4. Produção de acetoína para os ensaios conduzidos com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando o meio PAY com 50 g/L de glicose, 150 rpm, 37°C, pH inicial de 6,5 e volume de meio de cultura de 400 mL. Extrato de levedura (♦), uréia (■) e sulfato de amônio (NP).
(NP): Não produziu acetoína.

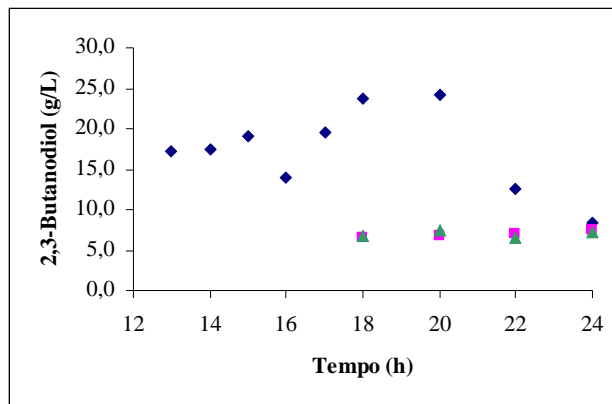


Figura 4.5. Produção de 2,3-butanodiol para os ensaios conduzidos com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando o meio PAY com 50 g/L de glicose, 150 rpm, 37°C, pH inicial de 6,5 e volume de meio de cultura de 400 mL. Extrato de levedura (◆), uréia (■) e sulfato de amônio (▲).

Entre 0 e 12 horas de cultivo, as concentrações dos dois aromas foram muito baixas não alcançando o limite de sensibilidade da técnica utilizada. Portanto, as amostras deste período de cultivo não foram apresentadas nas Figuras 4.4 e 4.5. No ensaio utilizando extrato de levedura, a formação dos produtos inicia-se efetivamente no final da fase linear, e atinge suas maiores concentrações na fase estacionária. Portanto, a formação dos produtos não parece estar associada ao crescimento do microrganismo. Nos outros ensaios, utilizando uréia e sulfato de amônio, devido à baixa concentração dos produtos e as poucas amostras analisadas, não foi possível verificar tal fato.

Estudos realizados por YU & SADDLER (1982), mostraram que o extrato de levedura é a melhor fonte de nitrogênio para a produção de 2,3-butanodiol pela bactéria *Klebsiella pneumoniae*. Neste estudo os autores utilizaram frascos contendo um meio quimicamente definido, conhecido como Kp 1, sendo D-glicose a fonte de carbono. Este meio foi suplementado com diferentes nutrientes, extrato de levedura, sulfato de amônio, uréia ou traços de elementos. Os cultivos foram incubados a 30°C, com agitação de 120 rpm e pH de 6,5. Os resultados obtidos para o cultivo controle, sem a presença de nutrientes, foram 4,97 (OD₅₄₀) de células, 8,21 g/L de 2,3-butanodiol e consumo de 55,9% da glicose presente no meio, contra 6,00 (OD₅₄₀) de células, 12,40 g/L de 2,3-butanodiol e consumo de 68,4% da glicose, para o cultivo com extrato de levedura. Os outros nutrientes apresentaram resultados inferiores aos alcançados com o extrato de levedura. Resultados semelhantes foram obtidos no presente trabalho, pois o extrato de levedura favoreceu a formação de células e de produtos, além do consumo do substrato.

Portanto, pode-se concluir que o extrato de levedura é a melhor fonte de nitrogênio para o crescimento do microrganismo *Bacillus polymyxa* e para a formação de acetofina e 2,3-butanodiol. Assim, nos próximos experimentos, foi utilizado este componente no meio de cultivo.

4.2 Influência do pH e da transferência de oxigênio

O objetivo destes experimentos foi avaliar a influência do pH e da transferência de oxigênio no crescimento do microrganismo e na produção dos aromas, acetofina e 2,3-butanodiol. Os ensaios foram divididos em dois conjuntos, o primeiro com o controle do pH ao longo de todo o cultivo, enquanto, no segundo, ajustou-se somente o pH inicial do meio de cultura. Desta forma, é possível verificar a importância do controle deste parâmetro no processo. Todos os ensaios foram realizados em frascos de Erlenmeyers aletados de 1L, variando-se o pH e o volume do meio de cultura, conforme descrito no item 2.4 do Capítulo 2.

As Figuras 4.6 e 4.7 mostram o crescimento microbiano obtido para os ensaios com e sem o controle do pH ao longo do cultivo. Nos ensaios conduzidos com pHs de 5,5 e 6,5, foi possível verificar que o crescimento do microrganismo apresentou as fases de adaptação, uma fase linear, a de desaceleração e a estacionária. No caso dos ensaios realizados com o pH 4,5, somente as fases de adaptação e linear foram observadas. Em todos os ensaios a fase exponencial foi muito pequena, podendo ser desconsiderada.

Analisando as figuras, observa-se que valores de pHs mais elevados favorecem o crescimento do microrganismo, diminuindo a fase de adaptação. Utilizando o pH 4,5, a duração desta fase foi de aproximadamente 40 horas. Aumentando o pH para 5,5, o microrganismo é capaz de se adaptar ao meio de cultura em apenas 3 e 8 horas, para os ensaios conduzidos sem e com o controle do pH ao longo do cultivo. No caso do pH 6,5, a fase de adaptação foi muito pequena, podendo ser desconsiderada. Esta diferença na duração da fase de adaptação está relacionada com o pH do meio de cultura do inóculo, que é de aproximadamente 6,5. Portanto, em cultivos com pHs menores, o microrganismo necessita de um período maior de adaptação, o que não acontece nos demais ensaios, pois apresentam um valor mais próximo do inóculo. Assim, conclui-se que a bactéria pode alterar o seu metabolismo e crescer em pHs mais ácidos.

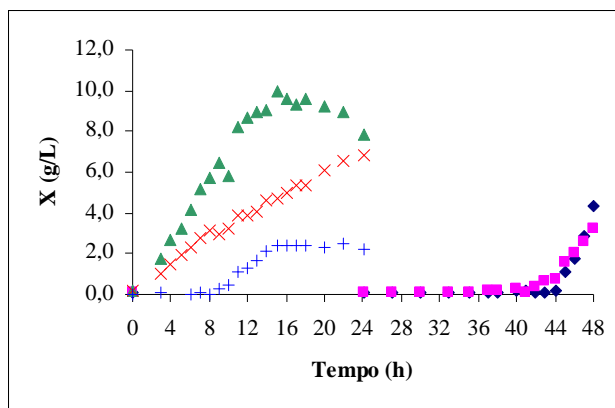


Figura 4.6. Crescimento do microrganismo para os ensaios realizados com o meio PAY, contendo 50 g/L de glicose, a 37°C, 150 rpm e com o controle do pH ao longo de todo o cultivo. (◆) Ensaio 1: pH 4,5 e volume do meio de cultura de 400 mL; (■) Ensaio 2: pH 4,5 e volume do meio de cultura de 600 mL; (▲) Ensaios 3: pH 6,5 e volume de meio de cultura de 400 mL; (×) Ensaio 4: pH 6,5 e volume do meio de cultura de 600 mL; (+) Ensaio 5: pH 5,5 e volume de meio de cultura de 500 mL.

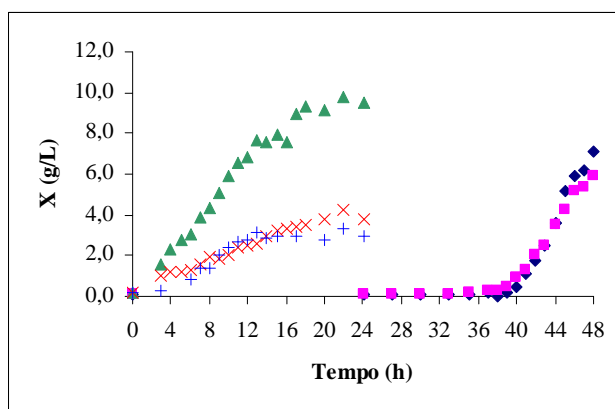


Figura 4.7. Crescimento do microrganismo para os ensaios realizados com o meio PAY, contendo 50 g/L de glicose, a 37°C, 150 rpm e com o ajuste do pH inicial. (◆) Ensaio 6: pH 4,5 e volume do meio de cultura de 400 mL; (■) Ensaio 7: pH 4,5 e volume do meio de cultura de 600 mL; (▲) Ensaios 8: pH 6,5 e volume de meio de cultura de 400 mL; (×) Ensaio 9: pH 6,5 e volume do meio de cultura de 600 mL; (+) Ensaio 10: pH 5,5 e volume de meio de cultura de 500 mL.

O melhor resultado para o crescimento microbiano foi obtido nos Ensaios 3 e 8, onde utilizou-se o pH 6,5 e um volume do meio de cultura de 400 mL. Nestes cultivos obteve-se máxima concentração celular de 9,8 g/L, em 15 e 22 horas, e velocidades constantes de crescimento, obtidas na fase linear, de 0,80 e 0,56 g/L.h., para os ensaios realizados com e sem o controle do pH. As máximas concentrações celulares obtidas nos outros ensaios, bem como a velocidade de crescimento constante na fase linear, estão apresentadas na Tabela 4.1.

Utilizando um volume de meio de cultivo menor, 400 mL, obteve-se maiores concentrações celulares e velocidades de crescimento mais elevadas, quando comparados com os ensaios realizados com um volume maior, 600 mL. Condições intermediárias de cultivo, como no caso dos ensaios conduzidos com pH 5,5 e volume de meio de cultura de 500 mL, não foram adequados ao crescimento do microrganismo, obtendo as menores concentrações celulares, 2,5 e 3,3 g/L, para os Ensaios 5 e 10, e velocidades de crescimento em torno de 0,36 g/L.h (Tabela 4.1). Estes resultados mostram a importância da transferência de oxigênio para o crescimento do microrganismo. Um meio de cultura com volume menor representa uma transferência de oxigênio maior, conseqüentemente o microrganismo possui mais oxigênio dissolvido no meio para se desenvolver, ocorrendo um maior crescimento.

Tabela 4.1. Máximas concentrações celulares e velocidades de crescimento constante, obtidas nos ensaios realizados a 37°C, 150 rpm, com e sem o controle do pH ao longo do cultivo.

Ensaio	V (mL)	pH inicial	pH final	X _{máx} (g/L)	Tempo onde se obteve X _{máx} (h)	V _x (g/L.h)	Período onde se obteve V _x (h)	
Com controle do pH	1	400	4,5	4,5	4,4	48	1,02	44-48
	2	600	4,5	4,5	3,2	48	0,49	42-48
	3	400	6,5	6,5	9,8	15	0,80	3-9
	4	600	6,5	6,5	6,8	24	0,27	3-24
	5	500	5,5	5,5	2,5	22	0,36	9-14
Sem controle do pH	6	400	4,5	3,9	7,1	48	0,88	40-48
	7	600	4,5	4,1	5,9	48	0,67	40-48
	8	400	6,5	6,1	9,8	22	0,56	3-15
	9	600	6,5	5,4	4,3	22	0,18	3-22
	10	500	5,5	4,7	3,3	22	0,37	6-11

Como nos ensaios anteriores, onde se avaliou a influência da fonte de nitrogênio, a velocidade específica de crescimento diminuiu ao longo do tempo, conforme mostram as Figuras 4.8 e 4.9. O oxigênio pode ser considerado como o nutriente limitante nestes casos, pois em experimentos conduzidos em frascos de Erlenmeyers não ocorre o fornecimento deste nutriente ao longo do cultivo, podendo ter sido utilizado completamente pelo microrganismo.

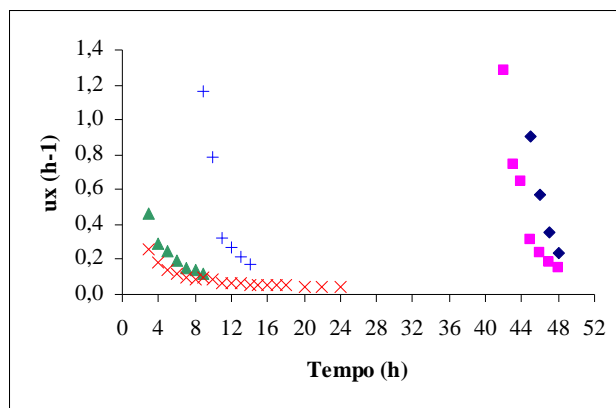


Figura 4.8. Velocidade de crescimento específica para os ensaios realizados com o meio PAY, contendo 50 g/L de glicose, a 37°C, 150 rpm e com o controle do pH ao longo de todo o cultivo. (♦) Ensaio 1: pH 4,5 e volume do meio de cultura de 400 mL; (■) Ensaio 2: pH 4,5 e volume do meio de cultura de 600 mL; (▲) Ensaios 3: pH 6,5 e volume de meio de cultura de 400 mL; (×) Ensaio 4: pH 6,5 e volume do meio de cultura de 600 mL; (+) Ensaio 5: pH 5,5 e volume de meio de cultura de 500 mL.

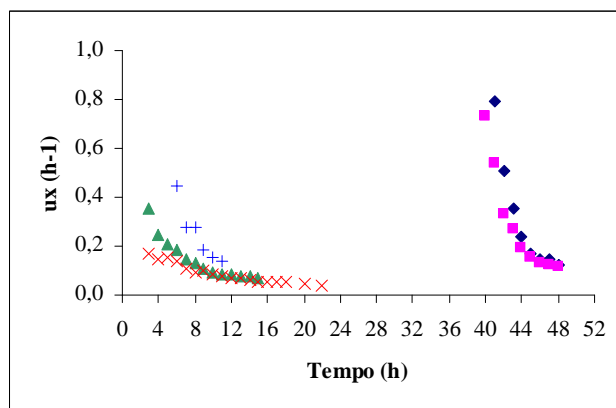


Figura 4.9. Velocidade de crescimento específica para os ensaios realizados com o meio PAY, contendo 50 g/L de glicose, 37°C, 150 rpm e com o ajuste do pH inicial. (♦) Ensaio 6: pH 4,5 e volume do meio de cultura de 400 mL; (■) Ensaio 7: pH 4,5 e volume do meio de cultura de 600 mL; (▲) Ensaios 8: pH 6,5 e volume de meio de cultura de 400 mL; (×) Ensaio 9: pH 6,5 e volume do meio de cultura de 600 mL; (+) Ensaio 10: pH 5,5 e volume de meio de cultura de 500 mL.

As Figuras 4.10 e 4.11 mostram o consumo de glicose para os ensaios que apresentaram o controle do pH, e o ajuste deste parâmetro no início do cultivo, respectivamente.

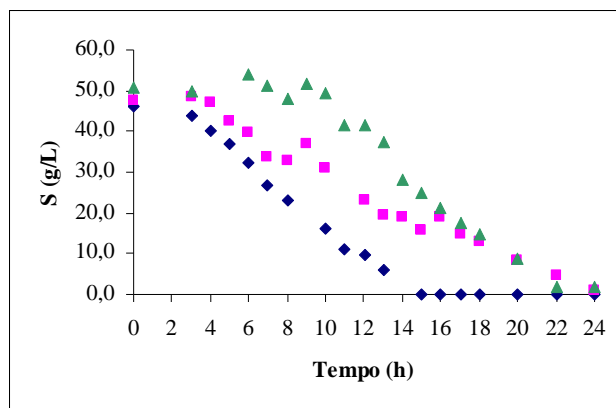


Figura 4.10. Consumo de glicose para os ensaios realizados com o meio PAY, contendo 50 g/L de glicose, a 37°C, 150 rpm e com o controle do pH ao longo de todo o cultivo. (◆) Ensaio 3: pH 6,5 e volume de meio de cultura de 400 mL; (■) Ensaio 4: pH 6,5 e volume do meio de cultura de 600 mL; (▲) Ensaio 5: pH 5,5 e volume de meio de cultura de 500 mL.

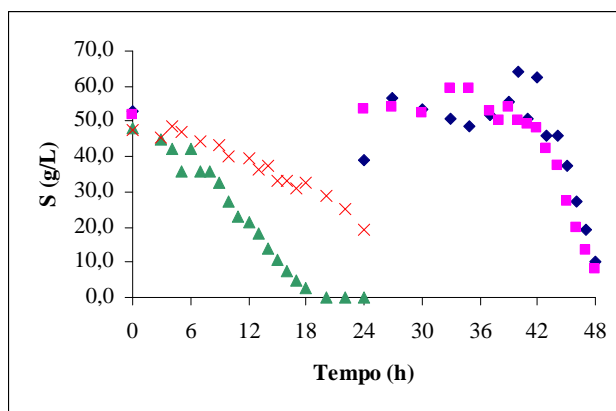


Figura 4.11. Consumo de glicose para os ensaios realizados com o meio PAY, contendo 50 g/L de glicose, a 37°C, 150 rpm e com o ajuste do pH inicial. (◆) Ensaio 6: pH 4,5 e volume do meio de cultura de 400 mL; (■) Ensaio 7: pH 4,5 e volume do meio de cultura de 600 mL; (▲) Ensaio 8: pH 6,5 e volume de meio de cultura de 400 mL; (×) Ensaio 9: pH 6,5 e volume do meio de cultura de 600 mL.

O consumo de glicose inicia-se na fase linear do crescimento microbiano, com velocidades praticamente constantes, em todos os experimentos realizados. Para os ensaios conduzidos com o controle do pH, a glicose é consumida quase totalmente, atingindo concentrações finais próximas de zero. Este fato não ocorre quando se ajusta somente o pH inicial, obtendo-se elevadas quantidades de substrato no final do processo, exceto para o Ensaio 8. As concentrações residuais e as velocidades de consumo do substrato, para todos os experimentos realizados, estão apresentadas na Tabela 4.2. Nos Ensaio 1, 2 e 10, percebe-se

um baixo consumo da glicose pelo microrganismo, mas como a velocidade deste consumo não foi constante, as Figuras 4.10 e 4.11 não apresentaram estes ensaios.

Tabela 4.2. Concentrações residuais e velocidade de consumo de glicose, obtidas nos ensaios realizados a 37°C, 150 rpm, com e sem o controle do pH ao longo do cultivo.

Ensaio	V (mL)	pH inicial	pH final	S _{res.} (g/L)	V _s (g/L.h)	Período onde se obteve V _s (h)	
Com controle do pH	1	400	4,5	4,5	44,8	0,0	-
	2	600	4,5	4,5	29,7	0,0	-
	3	400	6,5	6,5	0,0	3,90	3-13
	4	600	6,5	6,5	1,0	2,26	3-24
	5	500	5,5	5,5	1,7	4,40 ^(*)	9-14
Sem controle do pH	6	400	4,5	3,9	10,4	8,13	42-48
	7	600	4,5	4,1	7,9	7,02	42-48
	8	400	6,5	6,1	0,13	3,25	9-18
	9	600	6,5	5,4	19,0	1,25	4-22
	10	500	5,5	4,7	49	0,0	-

(*) Duas velocidades constantes de consumo: 4,40 g/L.h está relacionado com a formação de células, e 3,28 g/L.h com a formação de produtos.

As maiores velocidades de consumo do substrato foram obtidos nos Ensaio 6 e 7, utilizando o pH 4,5, com 8,13 e 7,02 g/L.h, entre 42 e 48 horas de cultivo. Provavelmente seria possível obter concentrações de glicose próximas de zero no final do processo, com elevadas velocidades de consumo deste substrato. No entanto, não se pode afirmar se estes fatos realmente ocorreriam, visto que estes cultivos não são completos. O processo foi paralisado em apenas 48 horas, quando o microrganismo se encontrava apenas na fase linear do crescimento. Somente no Ensaio 5 foi possível observar duas velocidades de consumo de substrato diferentes. A primeira, relacionada com o crescimento microbiano, possui uma velocidade de 4,40 g/L.h, entre 9 e 14 horas. A segunda, com velocidade de 3,28 g/L.h, obtida entre 15 e 22 horas de cultivo, refere-se à formação de produtos.

Condições aeradas favorecem o desenvolvimento do microrganismo, alcançando maiores concentrações celulares. Desta maneira, o consumo da glicose presente no meio, e conseqüentemente a velocidade deste consumo, também devem ser maiores, a fim de suprir as

necessidades celulares relacionadas a este componente. Isto é observado analisando os resultados obtidos dos cultivos conduzidos a pH 6,5. Utilizando um volume de meio de cultura menor, 400 mL, ocorreu um maior consumo de substrato, com uma velocidade mais elevada, quando comparado com os ensaios realizados com 600 mL de meio de cultura.

A Tabela 4.3 mostra os fatores de conversão substrato em células. Percebe-se uma diferença significativa de resultados somente nos Ensaios 3 e 5, com 0,21 e 0,08 $\text{g}_{\text{cél}}/\text{g}_{\text{sub}}$, respectivamente. Este valor elevado indica que grande parte da glicose consumida pelo microrganismo foi transformada em células, o que explica as maiores concentrações celulares obtidas no Ensaio 3. No caso do Ensaio 5, a glicose foi convertida provavelmente em produtos, visto a baixa concentração celular alcançada, juntamente com o pequeno valor deste parâmetro.

Tabela 4.3. Fator de conversão substrato em células obtidas nos ensaios realizados a 37°C, 150 rpm, com e sem o controle do pH ao longo do cultivo.

Ensaios	V (mL)	pH inicial	pH final	$Y_{X/S}$ ($\text{g}_{\text{cél}}/\text{g}_{\text{sub}}$)	
Com controle do pH	1	400	4,5	4,5	-
	2	600	4,5	4,5	-
	3	400	6,5	6,5	0,21
	4	600	6,5	6,5	0,12
	5	500	5,5	5,5	0,08
Sem controle do pH	6	400	4,5	3,9	0,11
	7	600	4,5	4,1	0,10
	8	400	6,5	6,1	0,17
	9	600	6,5	5,4	0,14
	10	500	5,5	4,7	-

Com relação à produção dos aromas, cujos resultados são apresentados na Tabela 4.4, as maiores concentrações obtidas foram no Ensaio 8, com formação de 15,0 e 24,2 g/L de acetoina e 2,3-butanodiol, em 24 e 20 horas de cultivo, respectivamente. O Ensaio 3 também merece destaque, pois as concentrações obtidas dos dois aromas foram muito próximas do Ensaio 8, com produção de 13,7 g/L de acetoina e 19,9 g/L de 2,3-butanodiol, em 24 e 15 horas de cultivo. Nestes ensaios, o volume do meio de cultura utilizado foi de 400 mL e pH de

6,5, sendo o primeiro realizado com o ajuste do pH no início do processo, e o segundo com o controle deste parâmetro durante o cultivo. Menores concentrações de produtos foram alcançadas nos ensaios sem o controle do pH. No Ensaio 9, somente 2,3-butanodiol foi produzido, com 12,5 g/L em 22 horas de cultivo. O Ensaio 10 apresentou formação máxima de 2,6 g/L de acetoína em 17 horas.

Tabela 4.4. Concentrações máximas de acetoína e 2,3-butanodiol, obtidas nos ensaios realizados a 37°C, 150 rpm, com e sem o controle do pH ao longo do cultivo.

Ensaio	V (mL)	pH	Acetoína Máxima (g/L)	Tempo onde se obteve acetoína (h)	2,3-Butanodiol Máximo (g/L)	Tempo onde se obteve 2,3-butanodiol (h)
Com controle do pH	1	400	4,5	0,0	-	0,0
	2	600	4,5	0,0	-	0,0
	3	400	6,5	13,7	24	19,9
	4	600	6,5	0,0	-	22,8
	5	500	5,5	0,0	-	21,6
Sem controle do pH	6	400	4,5	0,0	-	0,0
	7	600	4,5	0,0	-	0,0
	8	400	6,5	15,0	24	24,2
	9	600	6,5	0,0	-	12,5
	10	500	5,5	2,6	17	0,0

Observa-se que em condições menos aeradas, utilizando 600 mL de meio de cultura, o microrganismo não foi capaz de produzir acetoína. Em condições intermediárias, com o controle do pH 5,5 ao longo do cultivo e volume de meio de 500 mL, ocorreu elevada formação de 2,3-butanodiol, sem formação de acetoína. Nos ensaios conduzidos com o pH 4,5 não ocorreu formação de produtos, o que já era esperado, pois o microrganismo não se desenvolveu completamente nestes ensaios, atingindo somente a fase linear.

Analisando as Figuras 4.12 e 4.13, percebe-se que a formação dos produtos inicia-se na fase linear e atinge suas maiores concentrações na fase estacionária. Desta forma, a produção dos aromas não parece estar associada com o crescimento microbiano. Nos Ensaios

3 e 8, onde se obteve a formação dos dois produtos, observa-se um aumento da concentração de acetoína com uma diminuição de 2,3-butanodiol no final do cultivo. Isto ocorre devido à biossíntese de formação destes produtos, pois a acetoína pode ser transformada em 2,3-butanodiol através de uma reação reversível. Portanto, nestes casos, 2,3-butanodiol deve estar sendo convertido para acetoína na etapa final do processo. Nos demais cultivos, onde somente um aroma foi produzido, não se observa a diminuição da concentração, e conseqüentemente o outro aroma não está sendo formado.

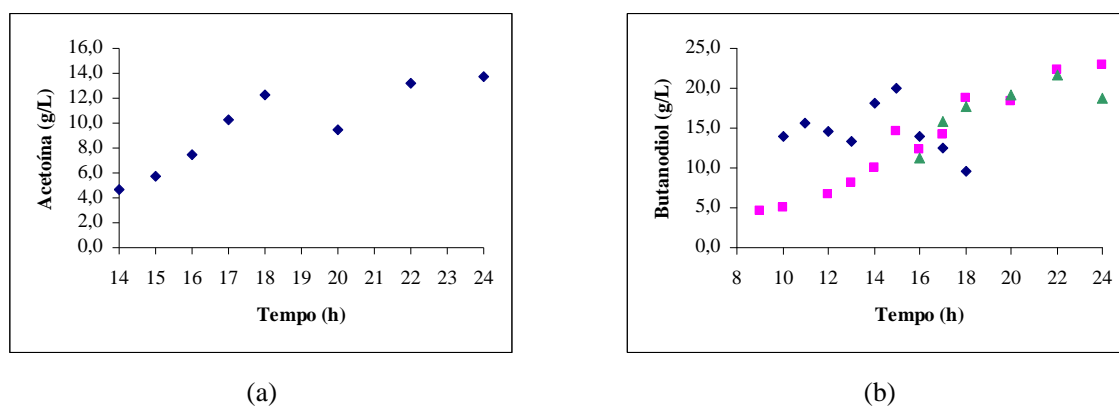


Figura 4.12. Formação dos produtos nos ensaios realizados com o meio PAY, contendo 50 g/L de glicose, a 37°C, 150 rpm, e com o controle do pH ao longo do cultivo. (a) produção de acetoína: (♦) Ensaio 3, pH 6,5 e volume de meio de cultura de 400 mL; (b) produção de 2,3-butanodiol: (♦) Ensaio 3, (■) Ensaio 4, pH 6,5 e volume de meio de cultura de 600 mL, (▲) Ensaio 5, pH 5,5 e volume de meio de cultura de 500 mL.

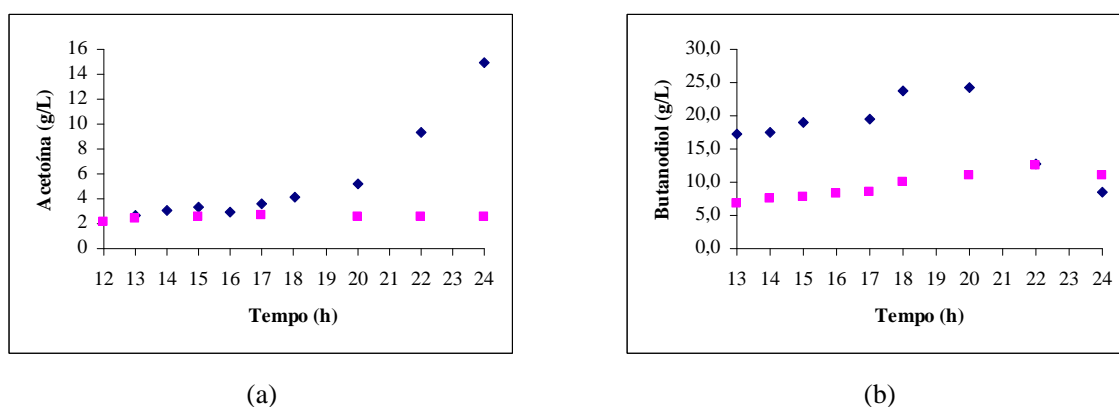


Figura 4.13. Formação dos produtos nos ensaios realizados com o meio PAY, contendo 50 g/L de glicose, a 37°C, 150 rpm, e com o ajuste do pH inicial. (a) produção de acetoína: (♦) Ensaio 8, pH 6,5 e volume de meio de cultura de 400 mL; (■) Ensaio 10, pH 5,5 e volume de meio de cultura de 500 mL; (b) produção de 2,3-butanodiol: (♦) Ensaio 8, (■) Ensaio 9, pH 6,5 e volume de meio de cultura de 600 mL.

Algumas amostras não foram apresentadas nas Figuras 4.12 e 4.13, pois as concentrações dos dois aromas foram muito baixas, não alcançando o limite de sensibilidade da técnica utilizada.

O fator de conversão substrato em produto ($Y_{P/S}$) e a relação entre célula e produto ($Y_{P/X}$) foram calculados somente para o Ensaio 5 e para o aroma 2,3-butanodiol, o único produto formado, obtendo-se $0,33 \text{ g}_{\text{prod}}/\text{g}_{\text{sub}}$ e $3,0 \text{ g}_{\text{prod}}/\text{g}_{\text{cél}}$, respectivamente. Neste ensaio, a velocidade de produção do aroma foi de $1,08 \text{ g/L.h}$. Os demais cultivos não apresentaram uma relação entre o crescimento do microrganismo e o consumo de glicose com a formação do produto.

Analisando todos os resultados obtidos, observa-se que os Ensaios 3 e 8 apresentaram valores muito próximos de concentração celular e produtos, e de consumo de substrato. Estes ensaios foram realizados com o pH 6,5 e volume de meio de cultura de 400 mL, sendo a diferença o controle ou não do pH. Desta forma, fica claro que ao utilizar estas condições de cultivo, o controle do pH não afeta de forma significativa os resultados obtidos. Nos demais ensaios, maiores concentrações celulares e de produtos, principalmente 2,3-butanodiol, e uma baixa concentração residual de glicose foram alcançadas nos cultivos que apresentaram o controle do pH. Obtiveram-se também maiores velocidades de crescimento e consumo de substrato, mostrando a importância do controle deste parâmetro durante o processo.

Existem alguns trabalhos semelhantes presentes na literatura. COSTELLI (2005) estudou a influência do pH inicial (4,5, 5,0 e 5,5) no crescimento da bactéria *Bacillus polymyxa* e na produção de acetoína, utilizando glicose como fonte de carbono. Os experimentos foram conduzidos em frascos agitados. A maior produção de células, $10,16 \text{ g/L}$, e de acetoína $4,23 \text{ g/L}$ foram obtidos utilizando o pH mais elevado, 5,5. Além disso, também foi verificado que em pHs mais ácidos a duração da fase de adaptação é maior. No presente trabalho, estudou-se também a influência do pH no crescimento do microrganismo e na produção do aroma acetoína, utilizando a glicose como fonte de carbono, em frascos agitados. No entanto, o aroma 2,3-butanodiol também foi analisado, visto que a acetoína pode ser transformada neste produto pelo microrganismo. Além disso, o pH foi avaliado juntamente com a transferência de oxigênio, através do volume do meio de cultura (400, 500 e 600 mL), o qual afeta diretamente a formação dos aromas. Pelos resultados obtidos, maiores concentrações de células e produtos foram alcançados utilizando o maior pH, 6,5 e o menor

volume de meio de cultura, ou seja, a maior transferência de oxigênio, atingindo concentrações de 9,8 g/L de células, 15,0 e 24,2 g/L de acetoína e 2,3-butanodiol. Desta forma, verifica-se que a associação destas duas variáveis, pH e volume do meio de cultura, favorecem um maior crescimento do microrganismo e produção dos aromas. COSTELLI (2005) utilizou um pH inferior e um volume do meio de cultura de 500 mL, diminuindo, portanto, a concentração de oxigênio dissolvido no meio, afetando a produção do aroma acetoína. A maior concentração celular alcançada pelo autor foi ocasionada por um fenômeno chamado diauxia, isto é, a presença de duas etapas de crescimento exponencial.

Outros trabalhos na literatura mostram também a importância do pH e da aeração na formação dos aromas. NAKASHIMADA et al. (1998) utilizando *Paenibacillus polymyxa*, também estudaram a influência do pH e da transferência de oxigênio na formação de produtos. Os autores utilizaram um meio de cultura “basal”, sendo glicose a fonte de carbono. Os experimentos foram realizados em frascos, para o estudo da transferência de oxigênio, e biorreator para o pH. Os resultados obtidos mostraram que com o aumento do pH da cultura (5,7-6,9) a produção de acetato aumenta, mas etanol e 2,3-butanodiol diminuem. O aumento do volume do meio de cultura significa que a transferência de oxigênio diminui, aumentando a produção de etanol e 2,3-butanodiol com a diminuição de acetoína e acetato. JANSEN et al. (1984) estudaram a influência do pH (4,2-6,0) e da aeração (0,048-0,007 mol/L/h) na formação de 2,3-butanodiol, utilizando *Klebsiella oxytoca* cultivada em xilose, em biorreator. Os autores observaram que entre os valores de pHs 4,4 a 5,8, o rendimento do produto não foi afetado. Somente utilizando pH 6,0 ocorria uma diminuição de produção, devido à inibição da atividade da enzima produtora de 2,3-butanodiol. Com relação à aeração, maiores velocidades de transferência de oxigênio favorecem o crescimento microbiano, e reduzem a produção de 2,3-butanodiol. Diminuindo esta transferência, maior concentração deste produto é formada. MANKAD & NAUMAN (1992) estudaram a formação de diversos produtos no cultivo de *Bacillus polymyxa*, utilizando um biorreator com um meio de cultura sintético, e usando glicose como fonte de carbono. As variáveis analisadas foram o pH (5,8, 6,5 e 7,2) e a velocidade de transferência de oxigênio, variando-se a velocidade de agitação (250 a 850 rpm). Os resultados mostraram que etanol e ácido láctico são formados sob condições de baixa disponibilidade de oxigênio, e 2,3-butanodiol é o produto predominante em condições intermediárias. A acetoína e o ácido acético são os únicos produtos formados quando a disponibilidade de oxigênio é elevada. Com relação ao pH, o melhor valor obtido para a

produção de acetoína e 2,3-butanodiol foi de 5,8. Ácido acético, láctico e fórmico são produzidos em condições alcalinas, em torno de 7,0. No presente trabalho, a maior aeração produziu elevadas concentrações de 2,3-butanodiol e acetoína. A utilização de frascos para a realização dos cultivos pode explicar este fato, pois como não existe entrada de ar no meio de cultura, o microrganismo consome este componente tornando-o limitante a partir de um período do processo, e conseqüentemente o microrganismo produz 2,3-butanodiol, devido à baixa disponibilidade de oxigênio. A acetoína, provavelmente é produzida pela reação reversível do metabolismo microbiano, pois somente os Ensaio 3 e 8 apresentaram elevadas formações do produto, sendo que nestes casos, a concentração de 2,3-butanodiol diminuiu no final do cultivo. Com relação ao pH, não é possível notar diferenças significativas de resultados, pois a maior concentração de produtos obtidas neste trabalho foi utilizando o pH 6,5, valor um pouco maior daqueles utilizados pelos autores dos trabalhos descritos acima, em torno de 6,0.

Como nos ensaios conduzidos com o controle de pH obteve-se uma maior produção de 2,3-butanodiol, realizou-se um estudo estatístico para verificar a influência dos dois parâmetros, pH e volume do meio de cultura, na formação deste produto. A acetoína não foi avaliada, pois esta foi produzida somente no Ensaio 3.

4.2.1 Planejamento experimental fatorial (Anexo V)

Elaborou-se um planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central, para avaliar estatisticamente a influência do pH e da transferência de oxigênio na formação de 2,3-butanodiol, nos ensaios conduzidos com o controle do pH. Para tanto, realizou-se a repetição em duplicata do Ensaio 5. Estas repetições são representadas pelos Ensaios 6 e 7. O volume do meio de cultura (x_1) e o pH (x_2) são as variáveis de entrada (fatores) e as concentrações máximas de 2,3-butanodiol (y_1) a de saída (resposta). Os diferentes valores de cada fator, juntamente com a resposta obtida, são apresentados na Tabela 4.5.

A tabela de análise de variância (ANOVA), obtida para o resultado de máxima concentração do produto, está representada na Tabela 4.6. Com as somas e médias quadráticas, juntamente com o teste F , é possível verificar se o modelo linear, ajustado às observações experimentais, pode ser considerado adequado ao processo.

Tabela 4.5. Resultados obtidos do planejamento fatorial com controle do pH.

Ensaio	Volume (mL)	pH	Concentração máxima de 2,3-butanodiol (g/L)
1	400	4,5	0,0
2	600	4,5	0,0
3	400	6,5	19,9
4	600	6,5	22,8
5	500	5,5	21,6
6	500	5,5	27,0
7	500	5,5	26,4

Tabela 4.6. Tabela de análise de variância para a concentração máxima de 2,3-butanodiol obtida nos ensaios realizados com o controle de pH.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Número de Graus de Liberdade	Média Quadrática
Regressão	460,0275	3	153,3425
Resíduos	369,3011	3	123,1004
Falta de Ajuste	351,7811	1	351,7811
Erro Puro	17,5200	2	8,7600
Total	829,3286	6	

% de variação explicada: 55,47

Aplicando o teste F , no nível de confiança de 95%, o valor obtido de $F_{calculado}$ foi de 40,16, muito maior que o valor com $F_{tabelado}$, 18,51, indicando que o modelo estimado apresenta falta de ajuste. Foi possível afirmar também, que o modelo não é estatisticamente significativo, pois se obteve o valor de 1,26 para $F_{calculado}$, sendo menor que o $F_{tabelado}$, 9,28

A porcentagem de variação explicada na tabela ANOVA representa o coeficiente de correlação entre as respostas observadas e os valores previstos pelo modelo ajustado. Portanto, não houve uma boa correlação, visto que o valor da variação explicada é de 55,47%. Para se obter uma boa correlação este valor deve estar próximo de 100%. A Figura 4.14 mostra o gráfico da resposta observada pela resposta predita pelo modelo.

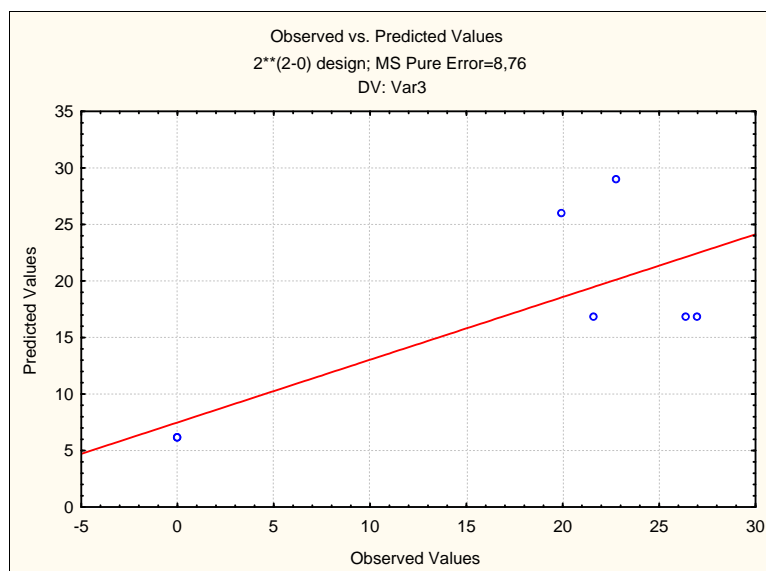


Figura 4.14. Concentração máxima de 2,3-butanodiol observada versus a concentração prevista pelo modelo linear obtido para os experimentos com controle de pH ao longo do cultivo.

A Tabela 4.7 mostra os valores dos coeficientes do modelo, com os seus efeitos principais e de interação. É importante lembrar que nem todos os parâmetros obtidos realmente influenciam a resposta. O nível de confiança, ou nível “ p ”, traduz a significância estatística de cada parâmetro. A significância estatística de um resultado é uma estimativa de até que ponto esse resultado é verdadeiro. O valor do nível p representa um indicador decrescente de confiabilidade de um resultado: quando mais alto o nível p , menos se pode confiar que a relação obtida entre variáveis da amostra é um indicador adequado da relação entre as variáveis na população. O valor comumente considerado “bom” para p é de 0,05 ou menos (CARVALHO, 1999).

Analisando a Tabela 4.7 a concentração máxima de 2,3-butanodiol é influenciada positivamente pela média e pelo pH do meio de cultura, devido ao sinal positivo que estes efeitos possuem. O pH pode ser considerado a principal variável que afeta a resposta, pois apresenta maior magnitude dos efeitos. Utilizando um pH muito ácido, conforme visto anteriormente, o microrganismo apresenta uma fase de adaptação muito longa, não ocorrendo formação do produto. Em pHs mais próximos da neutralidade, o microrganismo se desenvolve em períodos menores, sendo capaz de produzir 2,3-butanodiol. O volume do meio de cultura afeta o processo, mais provavelmente este efeito não é muito significativo, pois comparando os resultados obtidos neste planejamento, em todos os diferentes volumes

utilizados, atingiram-se quantidades de produtos muito próximas. A Figura 4.15 mostra o gráfico de Pareto, onde é possível visualizar os efeitos que influenciam a produção de 2,3-butanodiol.

Tabela 4.7. Efeito das variáveis independentes (entrada) sobre a concentração de 2,3-butanodiol e os coeficientes de regressão do modelo linear, para os ensaios realizados com o controle do pH.

Variáveis	Efeitos	Desvio Padrão	<i>p</i>	Coefficientes de Regressão	Desvio Padrão
Média	16,8143*	1,1187	0,0044	16,8143	1,1187
x_1 - volume	1,4500	2,9597	0,6727	0,7250	1,4799
x_2 - pH	21,3500*	2,9597	0,0187	10,6750	1,4799
$x_1 - x_2$	1,4500	2,9597	0,6727	0,7250	1,4799

Efeitos significativos no intervalo de 95% de confiança.

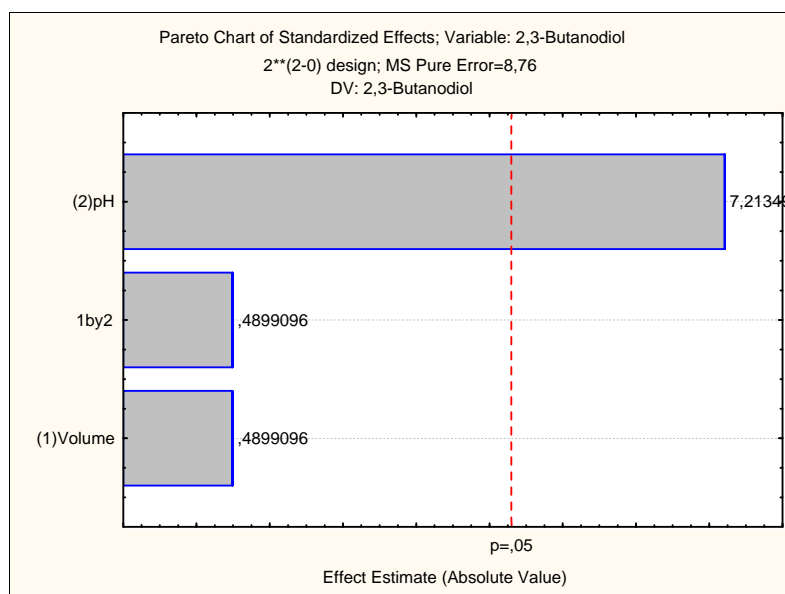


Figura 4.15. Efeitos principais e de interação na produção de 2,3-butanodiol, nos ensaios realizados com controle do pH ao longo do cultivo.

O modelo estimado está representado pela Equação 4.1. É importante ressaltar que, como não são todos os parâmetros que afetam a produção de 2,3-butanodiol, somente consideram-se os efeitos significativos.

$$C_{2,3\text{-butanodiol}} = 16,8143 + 10,6750 \cdot x_2 \quad (4.1)$$

A Figura 4.16 mostra a superfície de resposta obtida para o modelo estimado, onde é possível verificar que a produção de 2,3-butanodiol pode ser melhorada pelo aumento do pH e do volume do meio de cultura, isto é, pela diminuição da transferência de oxigênio. Através dos resultados obtidos neste planejamento, onde se alcançou elevadas concentrações de 2,3-butanodiol em quase todos os cultivos realizados, exceto nos ensaios conduzidos com o pH 4,5, o aumento do volume do meio poderia favorecer uma maior produção do produto, conforme apontam alguns trabalhos presentes na literatura. DE MAS et al. (1988) verificaram que a altas transferências de oxigênio, baixas concentrações de 2,3-butanodiol foram encontradas, enquanto quantidades maiores de acetoína e acetato foram obtidas. Resultado semelhante foi obtido por SEREBRENNIKOV (1995), que encontrou concentrações maiores de 2,3-butanodiol em meios menos aerados, e maior produção de acetoína utilizando uma aeração mais elevada. Com relação ao pH, condições alcalinas (acima de 6,3-6,5) favorecem a formação de ácidos orgânicos, com uma diminuição do rendimento de butanodiol (GARG & JAIN, 1995). Portanto, com um aumento do pH, provavelmente a produção de 2,3-butanodiol diminuiria.

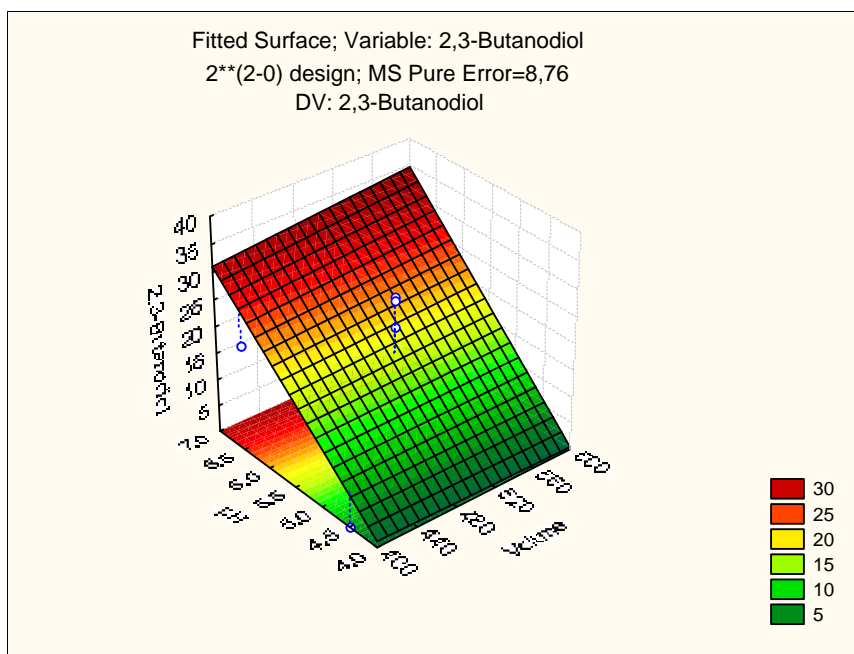


Figura 4.16. Superfície de resposta do modelo linear obtido para a máxima concentração de 2,3-butanodiol, nos ensaios realizados com controle do pH.

O modelo linear estimado não pode ser considerado adequado ao processo, visto que, além de não ser estatisticamente significativo, apresenta falta de ajuste. Para se obter um modelo que represente realmente as observações experimentais, seria necessário realizar um novo planejamento, chamado de estrela. Com este planejamento é possível determinar os modelos quadráticos, que provavelmente se ajustaria aos resultados obtidos.

4.3 Ampliação de escala

Neste ensaio utilizou-se um biorreator de 6L para ampliar a escala do processo, visando uma elevada formação dos produtos de interesse. Este ensaio foi realizado com o controle do pH 6,5, considerado nos cultivos anteriores conduzidos em frascos agitados, a melhor condição para se obter maiores concentrações dos aromas. A Figura 4.17 mostra o crescimento do microrganismo, o consumo de substrato e a formação dos produtos neste ensaio.

Através da figura, é possível observar que o crescimento do microrganismo apresentou as fases de adaptação, exponencial, linear e a estacionária. Neste ensaio, a fase de adaptação foi um pouco maior que nos ensaios realizados em frascos agitados, com duração de 5 horas. Após este período, o microrganismo atingiu a fase exponencial, entre 6 e 9 horas de cultivo, com uma velocidade específica máxima de crescimento de $0,72 \text{ h}^{-1}$.

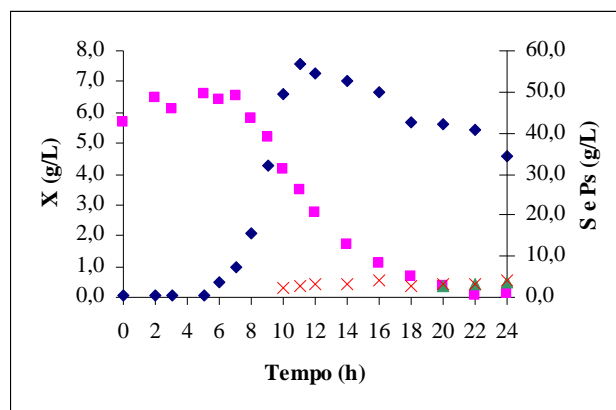


Figura 4.17. Ensaio realizado em biorreator: (◆) crescimento microbiano, (■) consumo de glicose, (▲) concentração de 2,3-butanodiol e (×) acetofina, cultivados a 37°C , com controle do pH 6,5, e em condições aeróbicas ao longo de todo o cultivo.

A máxima concentração de biomassa obtida ocorreu em 11 horas de processo, com produção de 7,6 g/L de células. Neste período, pode-se perceber a limitação de algum nutriente do meio de cultura. O oxigênio fornecido ao microrganismo foi controlado utilizando-se uma sonda, cuja medição é feita em porcentagem de oxigênio dissolvido no meio de cultura. Conforme o microrganismo se desenvolve e consome o oxigênio, o valor da porcentagem diminui. Ao ocorrer limitação de algum nutriente no meio de cultura, o crescimento do microrganismo se estabiliza, entrando na fase estacionária, e conseqüentemente a porcentagem de oxigênio começa a aumentar, pois este componente não é mais consumido para o seu desenvolvimento. O oxigênio presente no meio é utilizado somente para a manutenção celular.

Ao atingir a fase exponencial, o microrganismo começa a consumir o substrato presente no meio de cultura, visando primeiramente a formação de células. Nesta fase, a glicose é consumida a uma velocidade constante de 5,81 g/L.h, entre 7 e 12 horas de cultivo. Na fase estacionária, a glicose é convertida em produtos, e a sua velocidade constante de consumo diminui, 1,49 g/L.h, entre 14 e 22 horas, atingindo concentrações muito próximas de zero no final do cultivo. O fator de conversão substrato em células ($Y_{X/S}$) obtido neste ensaio foi de 0,31 $g_{cél}/g_{sub}$. A Figura 4.18 mostra somente o consumo de glicose neste ensaio, onde é possível visualizar melhor as duas velocidades obtidas.

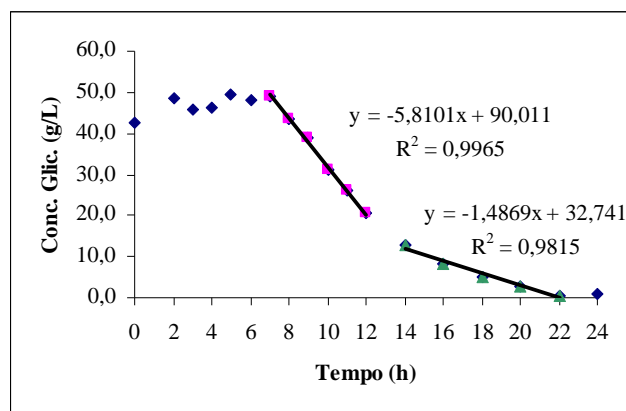


Figura 4.18. Consumo de glicose para o ensaio realizado em biorreator, a 37°C, com controle do pH 6,5 e em condições aeróbicas: (♦) consumo de glicose durante o cultivo, (■) velocidade de consumo de glicose relacionada com o crescimento do microrganismo, (▲) velocidade de consumo de glicose relacionada com a formação dos produtos.

As concentrações de produtos foram muito inferiores aos resultados obtidos nos ensaios anteriores, em frascos agitados. Atingiram-se apenas 4,3 e 3,5 g/L de acetoína e 2,3-butanodiol, respectivamente, no final do processo. O fator de conversão substrato em produtos ($Y_{P/S}$) foi de 0,06 $g_{\text{prod}}/g_{\text{sub}}$ para a acetoína, indicando também a baixa produção deste aroma. Não foi possível calcular este fator para o 2,3-butanodiol, pois este aroma não teve relação com o consumo de glicose, visto que sua formação começa somente em 20 horas de cultivo, e neste período a glicose se encontra em concentrações muito próximas de zero no meio de cultura. Provavelmente a formação de 2,3-butanodiol ocorreu através da acetoína, por uma reação reversível. Na rota metabólica, o 2,3-butanodiol é o produto posterior da formação de acetoína. Desta maneira, a concentração de acetoína deveria diminuir no final do processo, pois seria convertida em 2,3-butanodiol pelo microrganismo. Este fato não ocorreu, visto que as maiores concentrações de produtos foram obtidas em 24 horas de cultivo. Portanto, seria necessário realizar um cultivo com uma duração maior, para verificar se a formação de 2,3-butanodiol realmente ocorre através da reação reversível utilizando acetoína.

A Tabela 4.8 mostra os resultados obtidos neste ensaio, em biorreator, e no Ensaio 3, realizado em frasco agitado com o controle do pH 6,5.

Tabela 4.8. Resultados obtidos no biorreator e no Ensaio 3, realizado com o controle do pH 6,5 em frascos agitados.

Resultados	Biorreator	Frascos Agitados
X (g/L)	7,6	9,8
$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	0,72	Não há fase exponencial
$S_{\text{res.}}$ (g/L)	0,0	0,0
V_s (g/L.h)	5,81	3,90
$Y_{X/S}$ ($g_{\text{cél}}/g_{\text{sub}}$)	0,31	0,21
Acetoína (g/L)	4,3	13,7
Butanodiol (g/L)	3,5	19,9

Os melhores resultados de formação dos produtos foram obtidos no ensaio em frascos agitados. Esta diferença pode ser explicada pela presença do oxigênio durante todo o cultivo no biorreator. Este componente em excesso provavelmente inibiu a formação dos produtos.

Segundo BARBOSA & TORRES (1998), o rendimento energético da fermentação é muito menor do que o da oxidação aeróbia. Este baixo rendimento é revelado pela baixa velocidade de crescimento apresentada pelos microrganismos fermentativos que, via de regra, desenvolvem-se muito mais lentamente do que bactérias crescendo em aerobiose. Portanto, no início do processo o oxigênio é importante, pois favorecerá o crescimento do microrganismo. Nos dois ensaios realizados, em frascos e em biorreator, existe oxigênio presente no meio de cultura no começo do cultivo, sendo que este componente será utilizado para a formação de biomassa, obtendo-se elevadas concentrações de células, conforme observado na Tabela 4.8. A menor formação de células em biorreator provavelmente pode ser explicado pela limitação de algum componente no meio de cultura. Neste caso, o componente limitante não foi o oxigênio, pois este foi fornecido ao longo de todo o cultivo. Além disso, com o fornecimento do oxigênio, o microrganismo atingiu a fase exponencial, onde foi possível calcular a velocidade específica de crescimento no biorreator, o que não ocorreu nos ensaios em frascos agitados, pois esta velocidade diminuiu ao longo do tempo, provavelmente devido a limitação deste componente no meio de cultura. O fornecimento do oxigênio durante o processo também favorece o consumo da glicose, obtendo-se velocidades maiores em biorreator do que em frascos, e, conseqüentemente, o fator de conversão substrato em células apresenta um valor mais elevado.

No entanto, o oxigênio presente no meio de cultivo não favorece a formação dos produtos, visto que a sua produção ocorre via processo fermentativo, conforme explicado no item 1.5 do Capítulo 1. No caso do frasco, em algum momento do processo, ocorrerá a limitação do oxigênio, e conseqüentemente as células começam a formar os dois produtos de interesse através do processo fermentativo. Como se obteve grande concentração de biomassa, maiores concentrações de produtos serão formadas, pois existirão mais células para transformar a glicose em produtos. Isto pode explicar a maior produção dos aromas utilizando um volume de cultura menor, com maior transferência de oxigênio. No biorreator, a presença do oxigênio durante todo o processo favorece o crescimento do microrganismo, mas afeta negativamente a formação dos produtos. Provavelmente, se o fornecimento de ar fosse interrompido no início da fase estacionária do crescimento microbiano, maiores concentrações de produtos poderiam ter sido formados.

5 CONCLUSÃO

A partir dos estudos realizados neste trabalho, onde foi possível analisar a influência da fonte de nitrogênio, pHs e transferência de oxigênio no crescimento da bactéria *Bacillus polymyxa*, consumo de glicose e produção dos aromas acetóina e 2,3-butanodiol, as seguintes conclusões foram obtidas:

- Dentre as fontes de nitrogênio estudadas, o extrato de levedura apresenta os melhores resultados de crescimento microbiano, consumo de glicose e produção de acetóina e 2,3-butanodiol;
- O pH influencia a fase de adaptação do microrganismo, apresentando uma longa duração em condições ácidas, ocasionada pela diferença de pHs entre o meio de cultura do ensaio e do inóculo;
- Em condições ácidas (pH 4,5) o microrganismo é capaz de modificar seu metabolismo e se desenvolver;
- Ocorre limitação de algum nutriente no meio de cultura nos cultivos realizados em frascos, provavelmente o oxigênio, levando à diminuição da velocidade específica do crescimento microbiano;
- O crescimento do microrganismo é influenciado pela transferência de oxigênio e pelo pH do meio de cultivo. Valores de pHs maiores e elevadas transferências de oxigênio (volume de meio de cultura menor) favorecem o desenvolvimento do mesmo;
- O controle ou não do pH afeta somente a velocidade de crescimento do microrganismo, obtendo-se maiores velocidades com o controle deste parâmetro ao longo do processo.
- O controle do pH favorece o consumo de glicose pelo microrganismo, atingindo concentrações finais de substrato próximas de zero no final do processo;
- A formação dos aromas não parece estar associada ao crescimento microbiano, visto que as maiores concentrações de produtos foram obtidas na fase estacionária;
- As melhores condições do processo para o crescimento do microrganismo, formação de produtos e consumo de substrato, utilizando frascos agitados, foram: controle do pH 6,5 durante o cultivo e volume de meio de cultura de 400 mL;

- O modelo linear estimado pelo planejamento experimental fatorial não foi adequado ao processo, pois além de não ser estatisticamente significativo, apresentou falta de ajuste;
- No início do processo, elevadas aerações favorecem o crescimento do microrganismo, pois este ocorrerá por processo aeróbio;
- Transferências de oxigênio elevadas auxiliam o crescimento exponencial do microrganismo, conforme foi verificado no ensaio em biorreator. Este fato não foi observado nos ensaios em frascos agitados;
- A aeração contínua prejudica a formação dos produtos, obtendo-se concentrações muito menores no biorreator daquelas atingidas nos ensaios em frascos agitados, visto que a sua produção ocorre via processo fermentativo, isto é, anaeróbio.

6 SUGESTÕES

- Ampliar o tempo de duração dos cultivos, para verificar se a produção da acetoína ocorre através do 2,3-butanodiol, pela reação reversível;
- Realizar ensaios em biorreator, interrompendo a aeração na fase estacionária do crescimento microbiano, visto que as maiores concentrações de produtos foram obtidas nesta fase, e estes são formados por processos fermentativos.
- Determinar o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) e estudar este parâmetro na produção dos aromas, pois a aeração afeta a formação dos produtos;
- Realizar um estudo da temperatura, uma vez que a temperatura ótima da enzima produtora de 2,3-butanodiol é diferente da enzima produtora de acetoína;
- Realizar a dosagem de outros compostos que podem ser produzidos durante o cultivo em biorreator, como o diacetil.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTINONE, M. J.; LAWLESS, H. T.; LEDFORD, R. A.; JOHNSTON M. Diacetyl as a flavor component in full fat cottage cheese. **Journal of Food Science**, v. 1, p. 38-42, 1994.

BARBOSA, H. R.; TORRES, B. B. **Microbiologia básica**. 1. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1998. 196 p.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. 2. ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1995. 299 p.

BAUER, K.; GARBE, D.; SURBURG, H. **Common fragrance and flavor materials: preparation, properties and uses**. 3. ed. New York: Wiley-VCH, 1997. 278 p.

BIO LAND. Características del NUTRI-COMPOST™. Disponível em: <<http://www.bioland.cl/nutricompoust-mo.htm>>. Acesso em: 25 de setembro de 2007.

BERGER, R. G. **Aroma biotechnology**. 1. ed. Berlin: Ed. Springer-Verlang, 1995. 239 p.

BOUMERDASSI, H.; DESMAZEAUD, M.; MONNET, C.; BOQUIEN, C. Y.; CORRIEU, G. Improvement of diacetyl production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CNRZ 483 through oxygen control. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 775-781, 1996.

BOUMERDASSI, H.; MONNET, C.; DESMAZEAUD, M.; CORRIEU, G. Effect of citrate on production of diacetyl and acetoin by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CNRZ 483 cultivated in the presence of oxygen. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 634-639, 1997.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for experimenters**. An introduction to design, data analysis and model building, New York: Wiley, 1978.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 104, de 14 de maio de 1999. Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes/Aromas. **Diário Oficial** [da União], Brasília, Poder Executivo, de 17 de maio de 1999.

CAÑAS, A.; OWENS, J. D. Acetoin production in growing *Leuconostoc mesenteroides*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 15, p. 339-344, 1999.

CARVALHO, J. C. **Produção de diacetil e acetoína: Desenvolvimento de um meio de cultivo e avaliação de fatores que alteram o crescimento de *Lactococcus lactis subsp lactis* biovar *diacetylactis***. 1999. 100 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis.

CHEETHAM, P. S. J. The use of biotransformations for the production of flavours and fragrances. **Trends in Biotechnology**, v. 11, p. 478-488, 1993.

COLLINS, E. B. Biosynthesis of flavor compounds by microorganisms. **Journal of Dairy Science**, v. 55, p. 1022-1028, 1972.

COSTELLI, M. C. **Cultivo de *Bacillus polymyxa* para a produção de acetoína: influência do pH e do tempo de cultivo do inóculo**. 2005. 77 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis.

DE MAS, C.; JANSEN, N. B.; TSAO, G. T. Production of optically active 2,3-butanediol by *Bacillus polymyxa*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 31, p. 366-377, 1988.

FAVERI, D. De; TORRE, P.; MOLINARI, F.; PEREGO, P.; CONVERTI, A. Carbon material balances and bioenergetics of 2,3-butanediol bio-oxidation by *Aerobacter Hansenii*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 708-719, 2003.

FLICKINGER, M. C. Current biological research in conversion of cellulosic carbohydrates into liquid fuels: how far have we come? **Biotechnology and Bioengineering**, v. 22, p. 27-48, 1980.

GARG, S.K.; JAIN, A. Fermentative production of 2,3-butanediol: A review. **Bioresource Technology**, v. 51, p. 103-109, 1995.

HESPELL, R.B. Fermentation of xylan, corn fiber, or sugars to acetoin and butanediol by *Bacillus polymyxa* strains. **Current Microbiology**, v. 32, p. 291-296, 1996.

JANSEN, N. B.; FLICKINGER, M. C.; TSAO, G. T. Production of 2,3-butanediol from D-xylose by *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, p. 362-369, 1984.

KANEKO, T.; MASAHIRO, T.; SUZUKI, H. Acetoin fermentation by citrate-positive *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 3022 grown aerobically in the presence of hemin or Cu^{2+} . **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 2644-2649, 1990.

LAUBE, V.M.; GROLEAU, D.; MARTIN, S.M. 2,3-Butanediol production from xylose and other hemicellulosic components by *Bacillus polymyxa*. **Biotechnology Letters**, v. 6, p. 257-262, 1984.

LUERCE, R. F. **Produção de acetoína por *Bacillus polymyxa***. 2002. 70 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis.

MANKAD, T.; NAUMAN, E.B. Effect of oxygen on steady-state product distribution in *Bacillus polymyxa* fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 40, p. 413-426, 1992.

MARWOTO, B.; NAKASHIMADA, T.; NISHIO, N. Metabolic analysis of acetate accumulation during xylose consumption by *Paenibacillus polymyxa*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 112-119, 2004.

MASON, R. L.; GUNST, R. F.; HESS, J. L. **Statistical design and analysis of experiments**. With applications to engineering and science. 2. ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 2003. 735 p.

MELLO, R. **Produção do bioaroma acetoína por *Hanseniaspora guilliermondii* CCT 3800 através do processo fermentativo em batelada alimentada**. 2001. 79 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis.

The MERCK Index 11th ed. New Jersey: Merck & Co. Inc. 1990.

MOLINA, M. A. B. **Avaliação de caldo de cana-de-açúcar para obtenção de 2,3-butanodiol**. 1995. 160 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Fermentação) – Universidade de São Paulo – USP, São Paulo.

MONNET, C.; SCHMITT, P.; DIVIES, C. Diacetyl production in milk by an α -acetolactic acid accumulating strain of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 2916-2924, 1994.

MORITZ, D. E. **Estudo do crescimento de três leveduras produtoras de aromas**. 1998. 111 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis.

NAKASHIMADA, Y.; KANAI, K.; NISHIO, N. Optimization of dilution rate, pH and oxygen supply on optical purity of 2,3-butanediol produced by *Paenibacillus polymyxa* in chemostat culture. **Biotechnology Letters**, v. 20, p. 1133-1138, 1998.

NUNES, E. O. **Influência do pH e concentração inicial de glicose na produção de biomassa do fungo *Ganoderma australe***. 2001. 59 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis.

PASTORE, G. M.; SATO, H. H.; YANG, T-S.; PARK, Y. K.; MIN, D. B. Production of fruity aroma by newly isolated yeast. **Biotechnology Letters**, v. 16, p. 389-392, 1994.

PEREGO, P.; CONVERTI, A.; BORGHI, M. D. Effects of temperature, inoculum size and starch hydrolyzate concentration on butanodiol production by *Bacillus licheniformis*. **Bioresource Technology**, v. 89, p. 125-131, 2003.

PLETSCH, M. Compostos naturais biologicamente ativos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 4, p. 12-15, 1998.

RAMOS, A.; LOLKEMA, J. S.; KONINGS, W. N.; SANTOS, H. Enzymes basis for pH regulation of citrate and pyruvate metabolism by *Leuconostoc oenos*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 1303-1310, 1995.

ROMANO, P.; SUZZI, G.; ZIRONI, R.; COMI, G. Biometric study of acetoin production in *Hanseniaspora guilliermondii* and *Kloeckera apiculata*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 1838-1841, 1993.

ROMANO, P.; SUZZI, G. Origin and production of acetoin during wine yeast fermentation – minireview. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 309-315, 1996.

ROMANO, P.; BRANDOLINI, C.; ANSALONI, C.; MENZIANI, E. The production of 2,3-butanodiol as a differentiating character in wine yeasts. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 14, p. 649-653, 1998.

ROMANO, P.; GRANCHI, L.; CARUSO, M.; BORRA, G.; PALLA, G.; FIORE, C.; GANUCCI, D.; CALIGIANI, A.; BRANDOLINI, V. The species-specific ratios of 2,3-butanediol and acetoin isomers as a tool to evaluate wine yeast performance. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, p. 163-168, 2003.

SABLAYROLLES, J.M.; GOMA, G. Butanediol Production by *Aerobacter aerogenes* NRRL B199: Effects of initial substrate concentration and aeration agitation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, p. 148-155, 1984.

SEREBRENNIKOV, V. M. Effects of temperature on the biosynthesis of 2,3-butanediol and acetoin under varying conditions of batch culturing of *Bacillus polymyxa* CCM 1465. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 31, p. 537-542, 1995.

SILVEIRA, M. M. **Estudo cinético da fermentação butileno-glicólica de sacarose por *Klebsiella pneumoniae* NRRL B199**. 1991. 217 f. Tese (Doutorado em Engenharia) – Universidade de São Paulo – USP, São Paulo.

TAKEMOTO, S. Y. **Avaliação do teor de acetoína em vinagres como forma de verificação de sua genuidade**. 2000. 133 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis.

TEIXEIRA, R. M. **Otimização das condições de cultura para produção de acetoína por *Hanseniaspora guilliermondii***. 1999. 109 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis.

TEIXEIRA, R. M.; NINOW, J. L.; FURIGO JUNIOR, A. Optimization of acetoin production by *Hanseniaspora guilliermondii* using experimental design. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 19, p. 181-186, 2002.

YU, E. K. C.; SADDLER, J. N. Enhance production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* grown on high sugar concentrations in the presence of acetic acid. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, p. 777-784, 1982.

ZENG, A.-P.; BIEBL, H.; DECKWER, W.-D. 2,3-Butanediol production by *Enterobacter aerogenes* in continuous culture: role of oxygen supply. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 264-268, 1990.

ZENG, A.-P.; DECKWER, W.-D. Utilization of the tricarboxylic acid cycle, a reactor design criterion for the microaerobic production of 2,3-butanediol. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 40, p. 1078-1084, 1992.

ZENG, A.-P.; BYUN, T.-G.; POSTEN, C.; DECKWER, W.-D. Use of respiratory quotient as a control parameter for optimum oxygen supply and scale-up of 2,3-butanediol production under microaerobic conditions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, p. 1107-1114, 1994.

8 ANEXOS

Anexo I – Cálculo para determinação da concentração de nitrogênio para os ensaios realizados com sulfato de amônio e uréia

1. Cálculo da concentração de nitrogênio no extrato de levedura

Dado: Extrato de levedura = 10% (p/p) de N

10 g de nitrogênio – 100 g de extrato

x g de nitrogênio – 13,1 g de extrato

$$x = 1,31 \text{ g de nitrogênio}$$

Cada ensaio fermentativo deve conter 1,31 g de nitrogênio

2. Cálculo da concentração de nitrogênio no sulfato de amônio

Dados : Peso molecular: 132,13

99% de pureza

132,13 g de sulfato de amônio – 28 g de nitrogênio

x g de sulfato de amônio – 1,31 g de nitrogênio

$$x = 6,18 \text{ g de sulfato de amônio}$$

100 g (total) – 99 g de sulfato de amônio

x g – 6,18 g de sulfato de amônio

$$x = 6,24 \text{ g}$$

Concentração de sulfato de amônio no ensaio fermentativo: 6,24 g/L

3. Cálculo da concentração de nitrogênio na uréia

Dados: Peso molecular: 60,66

99,5% de pureza

60,66 g de uréia – 28 g de nitrogênio

x g de uréia – 1,31 g de nitrogênio

$$x = 2,84 \text{ g de uréia}$$

100 g (total) – 99,5% de uréia

x g – 2,84 g de uréia

$$x = 2,85 \text{ g}$$

Concentração de uréia no ensaio fermentativo: 2,85 g/L

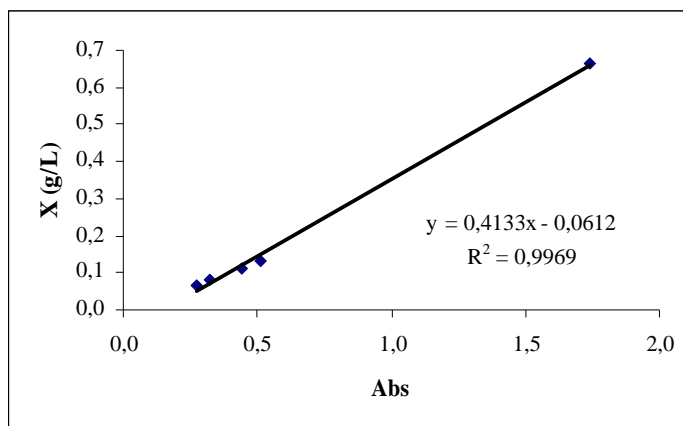
Anexo II – Curva de calibração para determinação da concentração celular

Figura 1. Exemplo da curva de calibração para o ensaio realizado com extrato de levedura no estudo da influência da fonte de nitrogênio.

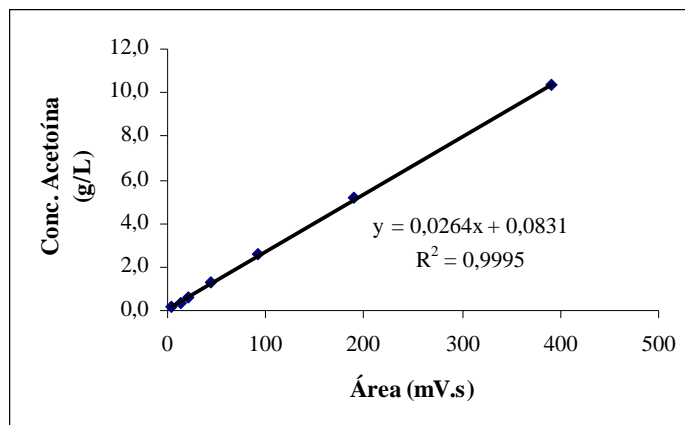
Anexo III – Curva de calibração para acetoína e 2,3-butanodiol

Figura 2. Exemplo da curva de calibração para o aroma acetoína.

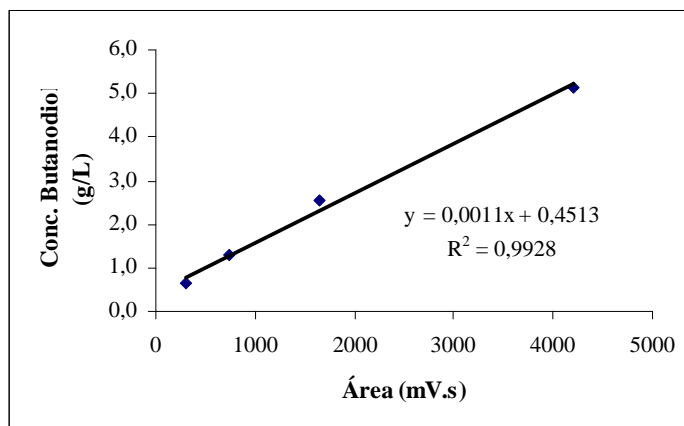


Figura 3. Exemplo da curva de calibração para o aroma 2,3-butanodiol.

Anexo IV – Dados dos produtos obtidos da cromatografia gasosa

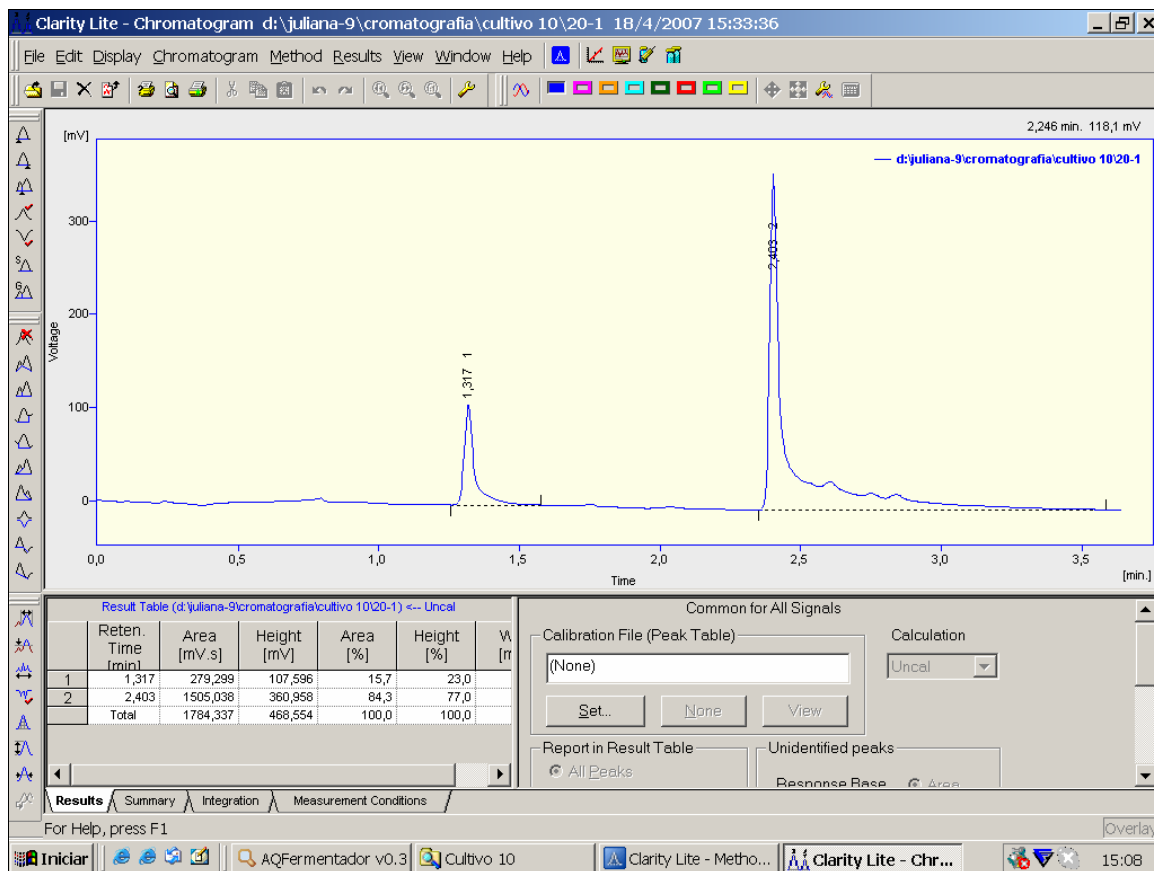


Figura 4. Exemplo do cromatograma obtido na amostra de 20 horas para o Ensaio 10, no estudo da influência do pH e da transferência de oxigênio.

Anexo V – Planejamento de experimentos

Em mundial, vários estudos têm sido feitos visando à obtenção de novos produtos a partir de microrganismos. No entanto, o alto custo operacional, o baixo rendimento de biomassa e metabólitos, associados ao elevado tempo de cultivo levam, muitas vezes, à inviabilidade da produção em escala industrial, havendo, por conseguinte, a necessidade de um delineamento experimental com vistas à obtenção de um melhor rendimento, com diminuição dos custos operacionais (NUNES, 2001).

A utilização de uma abordagem tradicional, para um delineamento experimental, com o objetivo de avaliar diversas variáveis na resposta de um sistema foi, por muito tempo, a variação de “um de cada vez”. Nessa abordagem é possível retirar alguma informação útil do sistema, mas com um inconveniente: um número muito grande de experimentos, quando se deseja pesquisar uma grande, e completa, faixa de variação das variáveis, ou informações incompletas sobre o sistema, ao se realizar menos experimentos. Isso ocorre porque frequentemente há influências de uma variável sobre outra (chamada “interação”), de forma que a variação de uma variável a pode demonstrar um efeito na resposta para um certo valor de uma variável b , mas um efeito diferente quando essa variável b apresenta um novo valor (CARVALHO, 1999).

Além disso, todos os dados experimentais estão sujeitos a uma variedade de fontes que induzem uma variação nas medidas. Estas variações podem ocorrer devido a diferenças fixadas entre máquinas, diferenças ao acaso devido a mudanças nas condições ambientais, erros de medidas de leituras instrumentais, ou efeitos devido a muitas outras influências conhecidas e desconhecidas (MASON et al., 2003). Portanto, para realizar um experimento de forma eficiente, deve ser utilizada uma abordagem científica para o seu planejamento. Tal abordagem é identificada por meio do termo “planejamento estatístico de experimentos” (LUERCE, 2002).

Os planejamentos estatísticos são eficientes na eliminação de influências conhecidas e desconhecidas, garantindo que os experimentos forneçam informações precisas sobre as respostas de interesse. Dados analisados por técnicas estatísticas ajudam a clarear e resumir aspectos dos dados experimentais. (MASON et al., 2003). Usando planejamentos experimentais, baseados em princípios estatísticos os pesquisadores podem extrair do sistema

em estudo o máximo de informação útil, fazendo um número mínimo de experimentos (BARROS NETO et al., 1995).

Portanto, os estudos experimentais envolvem duas partes: o planejamento experimental e a análise estatística. Primeiramente, devem-se determinar quais as variáveis de interesse, de entrada (fatores) e de saída (respostas), bem como os níveis (valores) nos quais cada fator será investigado. Desta forma, pode-se programar ensaios através de um planejamento fatorial, definindo as condições experimentais a serem utilizadas. Segundo BOX et al. (1978) o planejamento fatorial é frequentemente utilizado em estudos de processos para investigações qualitativas ou quantitativas, explorando os efeitos das variáveis de entrada sobre as variáveis de saída.

Para estudar o efeito de qualquer fator sobre a resposta é preciso fazê-los variar e observar o resultado desta variação. Isso implica na realização de ensaios em pelo menos dois níveis desse fator. Um planejamento fatorial em que todas as variáveis são estudadas em apenas dois níveis é o mais simples de todos eles. Existindo k fatores, isto é, k variáveis controladas, o planejamento de dois níveis irá requerer a realização de 2^k ensaios diferentes. Os erros experimentais, associados aos ensaios e ao experimentador, são estimados realizando ensaios em duplicada ou triplicata. Com essa estimativa pode-se determinar, de uma maneira quantitativa, se o modelo utilizado representa satisfatoriamente as observações, ou se é necessário acrescentar-lhe mais termos (BARROS NETO et al., 1995).

Após determinar os resultados do planejamento, podem-se estimar os efeitos principais e de interação dos fatores sobre as respostas do processo, e conseqüentemente os efeitos mais significativos, para ajustar um modelo linear (primeira ordem) que melhor correlaciona as variáveis de entrada e saída. Segundo Werkema e Aguiar (1996), citado por LUERCE (2002), o efeito de um determinado fator é definido como a mudança sofrida pela variável resposta quando passa do nível mais baixo para o nível mais alto do referido fator. Se o comportamento de um fator não é o mesmo nos outros níveis de um segundo fator, há interação entre os mesmos.

A metodologia de superfície de resposta (RSM, *Response Surface Methodology*) tem sido empregada satisfatoriamente na análise, modelagem e otimização de diversos processos industriais. A modelagem usualmente é feita através do ajuste de modelos lineares ou

quadráticos aos resultados experimentais obtidos a partir de planejamentos fatoriais (BARROS NETO et al., 1995).

Planejamento fatorial 2^2 com ponto central

Neste trabalho foi realizado um planejamento fatorial completo 2^2 , com triplicata no ponto central, cujas variáveis de entrada foram o volume e o pH do meio de cultura, e a concentração de 2,3-butanodiol a variável de saída. A Tabela 1 mostra os níveis de cada variável de entrada, juntamente com seus respectivos valores codificados.

Tabela 1. Valores referentes aos níveis dos fatores codificados.

Fatores	Símbolo	Codificação		
		-1	0	+1
Volume (mL)	x_1	400	500	600
pH	x_2	4,5	5,5	6,5

O planejamento apresentou um total de 7 ensaios realizados em ordem aleatória (Tabela 2). A aleatorização dos ensaios permite que os efeitos dos fatores não controlados, que podem estar presentes em cada experimento afetando a resposta, sejam balanceadas entre todas as medidas, de forma a evitar erros na avaliação dos resultados.

Tabela 2. Ensaios do planejamento experimental 2^2 com ponto central.

Ensaios	x_1	x_2
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	0	0
6	0	0
7	0	0

O procedimento usual de avaliação do desempenho de um modelo inicia-se pela análise dos desvios das observações em relação à média global, conforme descrito em BARROS NETO et al. (1995). O desvio de um valor observado em relação à média de todas as observações, em termos quantitativos, é dado pela soma dos quadrados dos desvios, sendo chamadas, portanto, de somas quadráticas (SQ) (Equação 1).

$$SQ_T = SQ_R - SQ_r$$

$$\sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2 = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y})^2 + \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_i - \hat{y})^2 \quad (1)$$

Onde:

m = número dos diferentes níveis

n_i = número de repetições no nível i

j = identificação da repetição

y_{ij} = respostas observadas

\bar{y}_i = média das respostas observadas no nível i

\hat{y}_i = valor estimado pelo modelo

SQ_T = soma quadrática em torno da média

SQ_R = soma quadrática devido à regressão

SQ_r = soma quadrática residual

Uma parte da variação total das observações y_i em torno da média é descrita pela equação de regressão, e o restante pelos resíduos. Quanto maior for a fração descrita pela regressão, melhor será o ajuste do modelo.

O resíduo total deixado pelo modelo pode ser decomposto em duas parcelas:

$$SQ_r = SQ_{ep} + SQ_{faj}$$

$$\sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \hat{y})^2 = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2 + \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2 \quad (2)$$

Onde:

SQ_{ep} = soma quadrática devido ao erro puro

SQ_{faj} = soma quadrática devido à falta de ajuste

O primeiro termo da Equação 2 reflete apenas a dispersão das respostas repetidas ao redor de suas médias em cada nível, dando uma medida do erro aleatório que afeta a resposta, sendo chamada de soma quadrática devido ao erro puro (SQ_{ep}). O segundo termo, soma quadrática devido à falta de ajuste (SQ_{faj}), depende do modelo e será tanto maior quanto mais as estimativas para um dado nível se afastarem do valor médio das respostas neste nível. Portanto, esta soma quadrática fornece uma medida da falta de ajuste do modelo às respostas observadas.

Quando se divide a soma quadrática pelos graus de liberdade, obtém-se a média quadrática, sendo possível determinar a significância estatística da regressão, como também verificar se o modelo está bem ajustado, utilizando o teste F de significância.

Quando $\beta_l = 0$, x e y não apresentam relação, podendo-se demonstrar que as médias quadráticas devido a regressão e ao resíduo seguem uma distribuição F (Equação 3). O teste da hipótese nula pode ser realizado utilizando o valor efetivamente calculado de MQ_R/MQ_r , e comparando este valor com o de $F_{tabelado}$, no nível de confiança desejado. Para que a regressão possua fins preditivos, e não somente significância estatística, o valor de $F_{calculado}$ deve ser, no mínimo, quatro vezes maior que o valor de $F_{tabelado}$.

$$F_{\nu_1, \nu_2} \approx \frac{MQ_R}{MQ_r} \quad (3)$$

Onde:

MQ_R = média dos quadrados da regressão

MQ_r = média dos quadrados dos resíduos

ν_1 = graus de liberdade da regressão

ν_2 = graus de liberdade dos resíduos

O ajuste do modelo é determinado através de um teste F da razão MQ_{faj}/MQ_{ep} . Este valor deve ser pequeno comparado com $F_{tabelado}$, ao nível de confiança estipulado, para indicar que o modelo está ajustado às observações.

A Tabela 3 mostra a tabela da análise de variância, conhecida como ANOVA, utilizada para o ajuste dos parâmetros do modelo pelo método dos mínimos quadrados.

Tabela 3. Tabela de análise de variância.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Número de Graus de Liberdade	Média Quadrática
Regressão	$SQ_R = \sum_i^m \sum_j^{n_i} \left(\hat{y}_i - \bar{y} \right)^2$	$p - 1$	$MQ_R = SQ_R / p - 1$
Resíduos	$SQ_r = \sum_i^m \sum_j^{n_i} \left(y_i - \hat{y} \right)^2$	$n - p$	$MQ_r = SQ_r / n - p$
Falta de ajuste	$SQ_{faj} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} \left(\hat{y}_i - \bar{y}_i \right)^2$	$m - p$	$MQ_{faj} = SQ_{faj} / m - p$
Erro Puro	$SQ_{ep} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} \left(y_{ij} - \bar{y}_i \right)^2$	$n - m$	$MQ_{ep} = SQ_{ep} / n - m$
Total	$SQ_T = \sum_i^m \sum_j^{n_i} \left(y_{ij} - \bar{y} \right)^2$	$n - 1$	

% de variação explicada = SQ_R / SQ_r

Onde:

n = número total de observações

p = número de parâmetros do modelo

O modelo linear obtido neste trabalho é representado genericamente pela Equação 4.

$$y = b_0 + b_1 \cdot x_1 + b_2 \cdot x_2 + b_3 \cdot x_1 \cdot x_2 \quad (4)$$

Onde:

y = estimativa dos valores populacionais das respostas

b_0, b_1, b_2, b_3 = coeficientes de regressão

x_1 = volume do meio de cultura (efeito principal)

x_2 = pH do meio de cultura (efeito principal)

$x_1 \cdot x_2$ = efeito de interação entre as duas variáveis

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.