



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

Cultivo de ***Bacillus polymyxa*** para a Produção de Acetoína:  
Influência do pH e do Tempo de Cultivo do Inóculo

MURILO CESAR COSTELLI  
Engenheiro Químico – UNOCHAPECO

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, Santa Catarina, Brasil  
Fevereiro de 2005



“O FIM NÃO JUSTIFICA OS MEIOS, PELA SIMPLES E  
EVIDENTE RAZÃO DE QUE OS MEIOS EMPREGADOS  
DETERMINAM A PRÓPRIA ESSÊNCIA DOS FINS OBTIDOS.”

**ALDOUS HUXLEY**

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, sem serem necessários maiores esclarecimentos.

Aos meus pais, Selvino e Oneide pelo amor e compreensão que sempre tiveram e têm por mim, minha eterna gratidão.

Aos meus tios DeJane e Mauri, pelo apoio incondicional e pelo acolhimento e incentivo desde o início desta jornada.

Ao professor Agenor Furigo Jr. pelo voto de confiança, pela orientação e pela amizade.

Ao professor Jacir Dal Magro pelo estímulo inicial, ainda durante minha graduação na UNOCHAPECO, para que prosseguisse com a vida acadêmica.

Aos mais que amigos Rênio, um ótimo companheiro e parceiro de cachaça, e sua esposa Tatiana pelo companheirismo e parceria em todas as horas.

Aos colegas e amigos de laboratório Vanessa, Rafael, Mônica, Érica, Suzane.

Especialmente à Ernandes e Denise, pelas longas e produtivas horas de conversa.

Ao sempre eficaz Edevíson, pelo apoio e atenção.

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

A CAPES, pelo apoio financeiro.

Meu muito obrigado a todos.

## SUMÁRIO

<b>SUMÁRIO</b>	<b>i</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b>	<b>iv</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>v</b>
<b>NOMENCLATURA</b>	<b>VIII</b>
<b>RESUMO</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>X</b>
<b>1 - INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>5</b>
<b>2.1 AROMAS</b>	<b>5</b>
2.1.1 AROMA ARTIFICIAL	6
2.1.2 AROMA NATURAL	7
<b>2.2 FUNÇÕES QUÍMICAS</b>	<b>7</b>
<b>2.3 PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA</b>	<b>7</b>
<b>2.4 MERCADO MUNDIAL</b>	<b>9</b>
<b>2.5 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE ACETOÍNA</b>	<b>9</b>
<b>2.6 BACILLUS POLYMYXA</b>	<b>11</b>
<b>2.7 ACETOÍNA</b>	<b>12</b>
2.8.1 BIOSÍNTESE DA ACETOÍNA	12
2.8.2 FATORES AMBIENTAIS	13

**3 – MATERIAIS E MÉTODOS** **18**

---

<b>3.1 MICRORGANISMO</b>	<b>18</b>
<b>3.2 MEIO DE MANUTENÇÃO</b>	<b>18</b>
<b>3.3 PREPARO DO INÓCULO PARA OS ENSAIOS FERMENTATIVOS</b>	<b>19</b>
<b>3.4 MEIO DE CULTIVO UTILIZADO NOS ENSAIOS FERMENTATIVOS</b>	<b>20</b>
<b>3.5 ENSAIOS FERMENTATIVOS</b>	<b>20</b>
<b>3.6 MÉTODOS ANALÍTICOS</b>	<b>21</b>
3.6.1 AMOSTRAGEM	21
3.6.2 AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO	21
3.6.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR	22
3.6.4 DOSAGEM DE GLICOSE	23
3.6.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ACETOÍNA	23
<b>3.7 CINÉTICA MICROBIANA</b>	<b>24</b>
3.7.1 IDENTIFICAÇÃO DAS FASES DE CRESCIMENTO	24
3.7.2 FATORES DE CONVERSÃO	26

**4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO** **30**

---

<b>4.1 TESTE DE PH</b>	<b>30</b>
4.1.1 ENSAIO A PH INICIAL 4,5	30
4.1.2 ENSAIO A PH INICIAL 5,0	34
4.1.3 ENSAIO A PH 5,5	37
<b>4.2 TESTES TEMPO DE CULTIVO DO INÓCULO</b>	<b>42</b>
4.2.1 ENSAIO COM TEMPO DE CULTIVO DO INÓCULO DE 20H	43
4.2.2 ENSAIO COM TEMPO DE CULTIVO DO INÓCULO DE 17H	46
<b>4.3 TESTE DE CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE A DIFERENTES T<sub>CI</sub></b>	<b>50</b>
4.3.1 ENSAIO A 30G/L E TEMPO DE CULTIVO DE 20H	50
4.3.2 ENSAIO A 30G/L E TEMPO DE CULTIVO DE 17H	53

**5. CONCLUSÕES** **60****6. SUGESTÕES** **63****7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** **65****8. ANEXOS** **71**

**ANEXO I – CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR** **71**

**ANEXO II – CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ACETOÍNA** **75**

## ÍNDICE DE TABELAS

<i>Tabela 2.1 – Principais espécies de bactérias e leveduras produtoras de acetoina.....</i>	<i>10</i>
<i>Tabela 3.1 – Composição do Meio AN para manutenção do microrganismo .....</i>	<i>18</i>
<i>Tabela 3.2 – Composição do Meio de cultivo YM.....</i>	<i>19</i>
<i>Tabela 3.3 – Composição do Meio PAY.....</i>	<i>20</i>
<i>Tabela 4.1: Parâmetros cinéticos e estequiométricos do teste de pH inicial à agitação de 150rpm, <math>S_0 = 50\text{g/L}</math>, <math>T = 37^\circ\text{C}</math>, <math>t_{ci} = 24\text{h}</math>.....</i>	<i>41</i>
<i>Tabela 4.2: Parâmetros cinéticos e estequiométricos para o Teste de Tempo de cultivo do Inóculo a <math>\text{pH} = 5,5</math>, <math>S_0 = 50\text{g/L}</math>, <math>T = 37^\circ\text{C}</math>, agitação de 150rpm. ....</i>	<i>49</i>
<i>Tabela 4.3: Parâmetros cinéticos e estequiométricos para o Teste de Concentração de Substrato a diferentes <math>t_{ci}</math> a <math>\text{pH} = 5,5</math>, <math>S_0 = 30\text{g/L}</math>, <math>T = 37^\circ\text{C}</math>, agitação de 150rpm .....</i>	<i>57</i>



## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 2.1 – Bacillus polymyxa CCT 2479* 12
- Figura 2.2 – Mecanismo de formação de acetoína a partir de hidroxietiltiamina pirofosfato (LUERCE, 2002)* 13
- Figura 3.1 – Shaker Incubador Refrigerado com Agitação modelo TE-421 TECNAL* 19
- Figura 3.2 – Fases do Crescimento Microbiano (SCRIBAN, 1985)* 25
- Figura 4.1 – Comportamento dinâmico da concentração de células (a), da concentração de substrato (b), da concentração de acetoína (c) e do logaritmo da concentração de células (d) a pH inicial 4,5,  $S_0 = 50\text{g/L}$ ,  $T = 37^\circ\text{C}$ , agitação de 150rpm,  $t_{ci} = 24\text{h}$ .* 31
- Figura 4.2 – Comportamento estequiométrico da conversão de substrato em célula (a), de substrato em produto (b) e de célula em produto (c) a pH inicial 4,5,  $S_0 = 50\text{g/L}$ ,  $T = 37^\circ\text{C}$ , agitação de 150rpm,  $t_{ci} = 24\text{h}$ .* 33
- Figura 4.3 - Comportamento dinâmico da concentração de células (a), da concentração de substrato (b), da concentração de acetoína (c) e do logaritmo da concentração de células (d) a pH inicial 5,0,  $S_0 = 50\text{g/L}$ ,  $T = 37^\circ\text{C}$ , agitação de 150rpm,  $t_{ci} = 24\text{h}$ .* 35
- Figura 4.4 – Comportamento estequiométrico da conversão de substrato em célula (a), de substrato em produto (b) e de célula em produto (c) a pH inicial 5,0,  $S_0 = 50\text{g/L}$ ,  $T = 37^\circ\text{C}$ , agitação de 150rpm,  $t_{ci} = 24\text{h}$ .* 36
- Figura 4.5 - Comportamento dinâmico da concentração de células (a), da concentração de substrato (b), da concentração de acetoína (c) e do logaritmo da concentração de células (d) a pH inicial 5,5,  $S_0 = 50\text{g/L}$ ,  $T = 37^\circ\text{C}$ , agitação de 150rpm,  $t_{ci} = 24\text{h}$ .* 38

*Figura 4.6 – Comportamento estequiométrico da conversão de substrato em célula (a), de substrato em produto (b) e de célula em produto (c) a pH inicial 5,5,  $S_0 = 50\text{g/L}$ ,  $T = 37^\circ\text{C}$ , agitação de 150rpm,  $t_{ci} = 24\text{h}$ .* 40

*Figura 4.7 - Comportamento dinâmico da concentração de células (a), da concentração de substrato (b), da concentração de acetoína (c) e do logaritmo da concentração de células (d) a pH inicial 5,5,  $S_0 = 50\text{g/L}$ ,  $T = 37^\circ\text{C}$ , agitação de 150rpm,  $t_{ci} = 20\text{h}$ .* 44

*Figura 4.8 – Comportamento estequiométrico da conversão de substrato em célula (a), de substrato em produto (b) e de célula em produto (c) a pH inicial 5,5,  $S_0 = 50\text{g/L}$ ,  $T = 37^\circ\text{C}$ , agitação de 150rpm,  $t_{ci} = 20\text{h}$ .* 45

*Figura 4.9 - Comportamento dinâmico da concentração de células (a), da concentração de substrato (b), da concentração de acetoína (c) e do logaritmo da concentração de células (d) a pH inicial 5,5,  $S_0 = 50\text{g/L}$ ,  $T = 37^\circ\text{C}$ , agitação de 150rpm,  $t_{ci} = 17\text{h}$ .* 47

*Figura 4.10 – Comportamento estequiométrico da conversão de substrato em célula (a), de substrato em produto (b) e de célula em produto (c) a pH inicial 5,5,  $S_0 = 50\text{g/L}$ ,  $T = 37^\circ\text{C}$ , agitação de 150rpm,  $t_{ci} = 17\text{h}$ .* 48

*Figura 4.11 - Comportamento dinâmico da concentração de células (a), da concentração de substrato (b), da concentração de acetoína (c) e do logaritmo da concentração de células (d) a pH inicial 5,5,  $S_0 = 30\text{g/L}$ ,  $T = 37^\circ\text{C}$ , agitação de 150rpm,  $t_{ci} = 20\text{h}$ .* 51

*Figura 4.12 – Comportamento estequiométrico da conversão de substrato em célula (a), de substrato em produto (b) e de célula em produto (c) a pH inicial 5,5,  $S_0 = 30\text{g/L}$ ,  $T = 37^\circ\text{C}$ , agitação de 150rpm,  $t_{ci} = 20\text{h}$ .* 53

*Figura 4.13 - Comportamento dinâmico da concentração de células (a), da concentração de substrato (b), da concentração de acetoína (c) e do logaritmo da concentração de células (d) a pH inicial 5,5,  $S_0 = 30\text{g/L}$ ,  $T = 37^\circ\text{C}$ , agitação de 150rpm,  $t_{ci} = 17\text{h}$ . 54*

*Figura 4.14 – Comportamento estequiométrico da conversão de substrato em célula (a), de substrato em produto (b) e de célula em produto (c) a pH inicial 5,5,  $S_0 = 30\text{g/L}$ ,  $T = 37^\circ\text{C}$ , agitação de 150rpm,  $t_{ci} = 17\text{h}$ . 56*

## NOMENCLATURA

---

AN	Agar Nutrient
ATCC	American Type Culture Collection (EUA)
CCT	Coleção de Culturas Tropical
P	Concentração de produto (acetoína) (g/L)
PAY	Phosphate Ammonium Yeast
S	Concentração de substrato (glicose) (g/L)
S <sub>0</sub>	Concentração de substrato inicial (glicose) (g/L)
t	tempo (h)
t <sub>ci</sub>	tempo de cultivo do inóculo
v <sub>S</sub>	velocidade de consumo de substrato (g/L.h)
X	Concentração celular (g/L)
YM	Yeast Malt Extract
Y <sub>P/S</sub>	Fator de conversão de substrato em produto (g/g)
Y <sub>P/X</sub>	Relação entre produção de célula e a formação de produto (g/g)
Y <sub>X/S</sub>	Fator de conversão de substrato em célula (g/g)
μ	Velocidade específica de crescimento celular (h <sup>-1</sup> )

---

## RESUMO

A aplicação de aromas alimentares produzidos por processos biotecnológicos tem apresentado um crescimento muito elevado tendo em vista a sua condição de classificação como produto “natural”. A acetoína e o diacetil são os responsáveis por parte do aroma da manteiga, queijos e outros derivados do leite, bem como são responsáveis pelo flavor de bebidas alcoólicas; a acetoína, por exemplo, é importante por causa de seu envolvimento com o buquê do vinho. O objetivo deste trabalho é estudar e otimizar a obtenção de acetoína e outros aromas associados a sua produção, aperfeiçoando as condições de cultivo e os parâmetros cinéticos, utilizando como substrato glicose, tendo como foco principal estudar o efeito do pH inicial e do pré-inóculo na produção de acetoína. O microrganismo escolhido para a realização dos ensaios fermentativos foi a bactéria *Bacillus polymyxa* CCT 2479, utilizando-se o meio YM para o preparo dos inóculos e os ensaios fermentativos realizados em frascos agitados utilizando-se o meio PAY. Utilizando como substrato glicose (50g/L e 30g/L) à temperatura de 37°C com agitação de 150rpm, estudou-se o efeito do pH inicial (5,5, 5,0 e 4,5) e do tempo de cultivo do inóculo (24, 20 e 17h) na produção de acetoína. A concentração celular foi determinada indiretamente por turbidimetria e diretamente por gravimetria. A concentração de acetoína e de outros aromas foi determinada por cromatografia gasosa. O estudo mostrou que a fase *lag* é bastante influenciada pelo pH inicial de cultivo, variando de 37 até 8h. Constatou-se que a velocidade específica de crescimento celular da fase exponencial não variou de maneira expressiva, apresentando valores médios de  $0,42h^{-1}$ . A velocidade de consumo de glicose mostrou ser constante durante dois períodos do cultivo. O fator de conversão de substrato em célula ( $Y_{X/S}$ ) apresentou um valor médio de 0,43g/g. Observou-se que a produção de acetoína inicia-se durante a fase exponencial de crescimento e continua na fase estacionária, indicando que sua produção não está diretamente ligada ao crescimento. A concentração de acetoína apresentou seu máximo para o pH inicial mais alto estudado (5,5) atingindo o valor de 7,8g/L.

## ABSTRACT

The application in the food industry of flavors produced by biotechnological processes has shown an increasing development considering its classification as a “natural” product. Acetoin and diacetyl are the main responsible for the flavor of butter, cheese and milk by products, as well as for the flavor of alcoholic beverages; acetoin, for example, has an important role in the “wine bouquet”. The objectives of this work is the study and the optimization of acetoin attainment and others associated flavors to its production, improving the growth conditions and kinetic parameters, having as main focus the effect of the inoculum cultivation and the initial pH in the acetoin production. The microorganism chosen for the batch cultivation assays was the bacteria *Bacillus polymyxa* CCT-2479, using a YM medium to the inoculum cultivation and the PAY medium for the shaken-flask assays. Using glucose (50g/L and 30g/L) as substrate at 37°C with agitation of 150rpm, the effect of initial pH (5,5, 5,0 and 4,5) and the inoculum cultivation time (24, 20 and 17h) in the acetoin production was studied. The cell concentration was determined indirectly by turbidimetry and directly by gravimetry. The acetoin concentration and associated flavors were determined by gas chromatography. The study it showed that the phase lag is higher influenced by initial pH of culture, varying of 37 until 8h. Was evidenced that the specific rate of cellular growth of the exponential phase presenting average values of  $0,42h^{-1}$ . The glucose consumption rate showed to be constant during two periods of the culture. The factor of substrate conversion in cell ( $Y_{X/S}$ ) presented an average value of 0,43g/g. Was observed that the acetoin production is initiated during the exponential phase of growth and continues in the stationary phase, indicating that its production is not directly on to the growth. The acetoin concentration presented its maximum for pH initial higher studied (5,5) reaching the value of 7,8g/L.

# *INTRODUÇÃO*

## 1 - INTRODUÇÃO

Por trás daquele gostinho preferido característico de uma comida ou bebida, um sofisticado setor da indústria química trabalha para “*fisgar*” o consumidor, oferecendo como nunca uma variedade de sabores e cheiros. Essa diversidade é possível graças aos aromas - aditivos alimentares responsáveis por até 90% do cheiro e do sabor - dos alimentos industrializados. Sem eles, enlatados, congelados, empacotados e desidratados não teriam nenhum atrativo, já que os processos industriais e de armazenamento destroem grande parte do sabor original (GERHARDT, 2004).

A produção de aromas por processos biotecnológicos vem sendo objeto de estudo intenso (CARVALHO, 1999). Diversas razões justificam a escolha da via biotecnológica para a produção de aromas, tais como, a complexidade estrutural que alguns compostos responsáveis por aromas de interesse comercial apresentam, inviabilizando sua produção por via sintética e tornando-se economicamente inviável; ou o fato de que os aromas produzidos por vias biotecnológicas são considerados naturais, mesmo como aditivos, se forem produzidos por microrganismos GRAS (*generally recognized as safe*).

Neste aspecto, a biotecnologia tem papel fundamental na produção de alimentos. O investimento feito pelas indústrias de biotecnologia é grande, uma vez que são necessários muitos anos de estudos, desenvolvimento e testes de segurança para que o produto possa estar disponível comercialmente. No Brasil, a indústria da biotecnologia é expressiva, desenvolvendo produtos e, principalmente insumos biotecnológicos (LERAYER, 2004).

Segundo LERAYER, 2004, são conhecidas 16.400 fragrâncias e *flavors*, um mercado avaliado em US\$ 12 bilhões. No mercado brasileiro, os mais consumidos são glutamato monossódico, proteína vegetal hidrolisada e extrato de levedura.

Nem a associação que reúne 45 empresas do setor sabe avaliar de quanto é o faturamento desse mercado no país. Segundo informa a Abifra (Associação Brasileira das



Indústrias de Óleos Essenciais, Produtos Químicos, Fragrâncias, Aromas e Afins) o mercado atingiu US\$ 113 milhões em 2003, contudo, acredita-se que esse número seja muito maior (GERHARDT, 2004).

O crescimento desse setor da indústria deve-se ao fato de que os aromas sintéticos derivados da petroquímica ou outra natureza química vêm sendo substituídos gradativamente pelos de origem enzimática ou fermentativa, em função das novas exigências do consumidor e também pelo fato de que os aromatizantes sintéticos são artificiais. Em alguns países, como o Japão, por exemplo, o consumo de aromas sintetizados quimicamente tem diminuído em função de regulamentações que favorecem os produtos obtidos de fontes naturais.

Além de serem legalmente reconhecidos como naturais, os bioprocessos são vantajosos por outras razões: a estereoseletividade, garantida pela alta especificidade dos biocatalisadores e o fato das influências externas adversas como fatores climáticos e problemas ambientais poderem ser negligenciados.

Numa época em que se fala tanto em qualidade de vida, tendo em vista a necessidade de novos produtos naturais na indústria alimentícia e o alto custo de extração e purificação destes, diversos grupos de pesquisa vêm se dedicando ao estudo de bioprocessos capazes de produzir compostos naturais de interesse comercial.

Na Universidade Federal de Santa Catarina, especificamente no Departamento de Engenharia Química e de Engenharia 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. *diacetylactis*. Posteriormente, foram desenvolvidos novos estudos por TEIXEIRA (1999) e MELLO (2001) ainda referentes à produção de acetoína por *Hanseniaspora*

---

*guilliermondii*. Posteriormente, LUERCE (2002) realizou o primeiro estudo local da produção de acetoína utilizando a bactéria *Bacillus polymyxa*.

A acetoína, que foi o objetivo deste trabalho, atua como potencializador de aromas de compostos como café, vinagre e principalmente manteiga. Neste trabalho foi investigada a produção de acetoína pela bactéria *Bacillus polymyxa*, avaliando-se a influência do pH inicial, da concentração inicial de substrato (glicose) e do tempo de cultivo do inóculo na cinética de crescimento da bactéria e na produção de acetoína.

# *REVISÃO BIBLIOGRÁFICA*

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O comércio das especiarias teve importante papel na História Universal. Foi na Idade Média que se desenvolveu o uso de ervas flavorizantes. Como estas eram consideradas naquele tempo possuidoras de poderes mágicos, passaram para o domínio médico, farmacêutico e do alquimista, desenvolvendo assim a indústria de flavorizantes, atualmente uma das mais complexas, produzindo substâncias sintéticas, algumas das quais nunca encontradas na natureza (FRAZIER, 1979 *apud* MORITZ, 1998).

Há muito tempo o homem usa direta ou indiretamente microrganismos para melhorar as características organolépticas e de conservação de alimentos, por exemplo, a cerveja, o vinho, o vinagre, queijos, pães e carne, em todos os casos, é a atuação de microrganismos específicos que gera uma série de transformações que enriquecem o aroma, o sabor, a textura e as características nutricionais do produto. O desenvolvimento de tais produtos ao longo dos séculos não só é base da produção biotecnológica de aromas, como também sedimentou a opinião generalizada de que alimentos modificados pela ação de microrganismos são naturais e, portanto inócuos (MORITZ, 1998).

### 2.1 Aromas

Os aromas estão entre os mais valiosos constituintes de alimentos, bebidas e cosméticos. Em se tratando de alimentos, apesar das ótimas características nutricionais, eles são consumidos devido às características organolépticas: aroma, sabor e textura.

Muitas vezes se faz necessária a adição de substâncias químicas, puras ou misturas, para tornar um produto mais atrativo para o consumidor, reforçando ou mascarando o aroma e sabor deste produto, que podem ter sofrido alterações durante seu processamento ou armazenagem, desta forma tornaram-se indispensáveis na indústria de alimentos a aplicação de aromatizantes.

Segundo a legislação brasileira, Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (Resolução 22/76 da CNNPA do MS 1976),

“Aromatizante é uma substância ou mistura de substâncias de propriedades odoríferas ou também sápidas capazes de conferir ou intensificar o aroma ou ainda o sabor dos alimentos, incluindo-se bebidas. Excluem-se desta definição os produtos que apresentam apenas sabor doce, salgado ou ácido” (LUERCE, 2002).

O *Federal Food Drug and Cosmetic Act* (novembro de 1966), regulamentado pela FDA (*Food and Drug Administration*) no parágrafo 121.1164 declara que as substâncias flavorizantes sintéticas e adjuvantes podem ser usadas em alimentos quando sujeitas às seguintes condições:

1. Usadas em quantidades mínimas requeridas para reproduzir efeito pretendido e de acordo como todos os princípios da boa prática de manufatura.
2. Os ingredientes flavorizantes sintéticos constituírem-se de uma ou mais formas apropriadas, usadas sozinhas ou em combinação geralmente reconhecidas como seguras, e previamente autorizadas para uso em alimentos (BERGER, 1995 *apud* TEIXEIRA, 1999).

De acordo com a legislação brasileira, os aromatizantes podem ser classificados em naturais ou artificiais. O preço, a eficácia e o tipo de produto final determinam a seleção do agente flavorizante (SIMÃO, 1985 *apud* MELLO, 2001).

### *2.1.1 Aroma Artificial*

É aquele em cuja elaboração utilizou-se:

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

apresenta a estrutura idêntica à da substância natural, tais como vanilina sintética, mentol sintético, etc. (FABRE, 1995 *apud* MORITZ, 1998).

### *2.1.2 Aroma Natural*

É aquele em cuja elaboração utilizou-se exclusivamente matéria-prima aromatizante natural, quimicamente definida ou também produto aromatizante natural, obtidos a partir de matérias vegetais ou de animais, seja por extração (processos físicos) ou por processos biotecnológicos (enzimáticos ou microbiológicos). No primeiro caso, a extração é feita a partir de matérias-primas tradicionais; no segundo caso, o desenvolvimento dos processos biotecnológicos permite facilitar certas limitações de processo (FABRE, 1995 *apud* MORITZ, 1998).

## ***2.2 Funções Químicas***

Compostos aromatizantes pertencem a diversas funções orgânicas, mas em geral possuem heteroátomos (O, N, S) e um peso molecular relativamente baixo (40-250). Frequentemente apresentam mais de um grupo funcional, sendo os mais comuns os álcoois, éteres, cetonas, aldeídos, ésteres, isoprenóides, fenóis, outros compostos contendo anéis aromáticos ou anéis com N ou O como heteroátomo. Além das características odoríferas, alguns compostos possuem outras características: antimicrobianos, inibidores específicos do crescimento de espécies competidoras, repelentes de predadores, atratores de insetos, estimulantes de crescimento, etc. (CARVALHO, 1999).

## ***2.3 Produção Biotecnológica***

Diversas motivações impulsionam o desenvolvimento de processos fermentativos de produção de aromas. O preço de produtos biotecnológicos ainda não se justifica para alguns álcoois e cetonas sintetizados com relativa facilidade a partir de hidrocarbonetos, no entanto, o fato de a matéria-prima para essa síntese ser não-renovável (petróleo) sugere a busca e o desenvolvimento de alternativas de produção (SEREBRENNIKOV, 1995 *apud* LUERCE, 2002). Por outro lado, o preço de aromas

sintéticos mais complexos (por exemplo, a vanilina, cerca de 3 vezes mais cara via sintética do que via extrativa) em geral é maior que os de produtos de fermentação.

É igualmente importante notar que os processos químicos atuais carecem de estereoseletividade (às vezes essencial para a geração de compostos com características adequadas), enquanto os processos enzimáticos são bastante específicos (CHEETHAM, 1993 *apud* TEIXEIRA, 1999).

A via mais utilizada pelos sistemas tradicionais baseia-se na síntese de substâncias aromáticas por bioprodução, a qual se dá através de processo fermentativo, de modo que a cultura microbiana pode ser melhorada pela otimização das condições de cultivo (FABRE, 1995 *apud* MORITZ, 1998).

A idéia de que produtos naturais são em geral saudáveis e de que aditivos sintéticos são geralmente ruins, extremamente difundida hoje, é outra forte motivação para alternativas fermentativas de produção de aromas. A necessidade de substâncias “naturais”, ou *nature-identical* para adição a produtos favorece grandemente os processos biotecnológicos, mesmo quando se podem obter substâncias quimicamente idênticas por via sintética (BERGER, 1995 *apud* TEIXEIRA, 1999). Além disso, processos biotecnológicos em geral são menos agressivos ao meio ambiente que seus similares sintéticos.

Finalmente, lembremos que as qualidades aromáticas de produtos sintéticos nem sempre se igualam às de produtos naturais. Como alguns aromas são constituídos de uma série de substâncias complexas em dosagens determinadas, às vezes, as únicas formas de produzir um aroma “convicente” são usando fontes naturais ou microrganismos.

Graças aos progressos realizados no domínio do conhecimento e do funcionamento dos organismos vivos, o campo de ação dos processos utilizando microrganismos ou enzimas purificadas para a produção de aromas é consideravelmente amplo. A multiplicidade das espécies naturais utilizando uma variabilidade nas condições

de cultura e uma variabilidade suplementar induzida pela escolha dos processos realizados no domínio da engenharia genética permite a modificação dos sistemas biológicos ao nível molecular. Assim é possível obter-se, de uma parte os microrganismos recombinantes apresentando novas propriedades metabólicas, e de outra parte enzimas capazes de superproduzir certos aromas (LERCH E SCHILLING, *apud* FABRE, 1996).

### ***2.4 Mercado Mundial***

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

Em 2000, incluindo vendas de componentes de aromas, fragrâncias e óleos essenciais foi estimado em cerca de 14 bilhões de dólares, a uma velocidade de crescimento anual de 4%, desde 1997. A partir de 1996, a demanda de aromas tem crescido cerca de 2,7% por ano, com consumo avaliado a uma estimativa de 1,7 bilhões de dólares em 2000. nos EUA, espera-se um crescimento anual de 5-6% até 2005. Na Europa Ocidental e no Japão estima-se que o consumo permaneça no mesmo nível. Já para o mercado da Ásia Meridional, provavelmente, o consumo crescerá a uma taxa anual de 7-8% durante o referido período (SOMOGY & KISHI, 2001 *apud* LUERCE, 2002).

### ***2.5 Microrganismos produtores de acetoína***

Os microrganismos são fontes em potencial de essenciais naturais (PASTORE, 1994 *apud* TEIXEIRA, 1999). A produção de voláteis por microrganismos pode ser feita por bactérias, leveduras e fungos filamentosos.



A classe de fungos mais estudada para a produção de aromas são os basidiomicetos. As bactérias e leveduras apresentam vantagens consideráveis em relação aos fungos filamentosos, devido a sua fácil tecnologia, conhecimento biológico e às diversas modificações genéticas realizadas nestes microrganismos (FABRE, 1996).

Na Tabela 2.1 estão listadas algumas espécies de leveduras e bactérias produtoras de acetoína.

*Tabela 2.1 – Principais espécies de bactérias e leveduras produtoras de acetoína.*

<b>Gênero</b>	<b>Espécies</b>	<b>Produtos finais secundários</b>	<b>Referências bibliográficas</b>
<i>Streptococcus</i>	<i>S. thermophilus</i>	acetoína, acetaldeído, acetona, diacetil, etanol	Berger, 1995
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. bulgaricus</i>	acetoína, acetaldeído, acetona, diacetil, etanol	Granata & Morr, 1996
<i>Bacillus</i>	<i>B. subtilis</i>	ácido acético, acetaldeído, 2,3-butanodiol, acetoína, diacetil	Dettwiller et al., 1993 Renna et al., 1993
	<i>B. polymyxa</i>	acetoína, diacetil, etanol, 2-acetolactato, acetato de etila, 2,3-butanodiol	De Mas et al., 1988
<i>Pediococcus</i>	<i>P. acidilactici</i>	acetoína, diacetil	Berger, 1995
<i>Leuconostoc</i>	<i>L. cremoris</i>	acetoína, etanol, diacetil	Berger, 1995
	<i>L. dextranicum</i>	Acetoína, diacetil	Kaneko et al., 1991
	<i>L. Lactis</i>	Acetoína, diacetil	Kaneko et al., 1991
	<i>L. mesenteroides</i>	acetoína, acetolactato, diacetil, acetato de etila	Cañas & Owens, 1999
<i>Aerobacter</i>	<i>A. aerogenes</i>	acetoína, 2,3-butanodiol, etanol	Sablaylorles & Goma, 1984
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. breve</i>	acetoína, ácido fórmico, ácido succínico, acetaldeído, acetona, diacetil, etanol	Berger, 1995
	<i>B. bifidum</i>		
	<i>B. longum</i>		
	<i>B. infantis</i>		
<i>Listeria</i>	<i>L. monocytogenes</i>	acetoína, 2,3-butanodiol	Romick & Fleming, 1998
<i>Hanseniaspora</i>	<i>H. gulliermondii</i>	acetoína, acetato de etila, etanol	Moritz, 1998
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i>	acetoína, diacetil, etanol, 2,3-pentanodiona, 2-acetolactato, 2-acetohidroxibutirato	Haukeli & Lie, 1972
	<i>S. carlbergensis</i>	acetoína, diacetil, etanol, 2,3-pentanodiona, 2-acetolactato	
	<i>S. diastaticus</i>	acetoína, diacetil, etanol, 2,3-pentanodiona,	
	<i>S. sake</i>	acetoína, diacetil, etanol, 2-acetohidroxibutirato	
<i>Hansebula</i>	<i>H. anomala</i>	acetoína, acetato de etila, etanol	Moritz, 1998
<i>Kloeckera</i>	<i>K. apiculata</i>	acetoína, 2,3-butanodiol, 2-acetolactato, etanol	Romano et al., 1996
<i>Candida</i>	<i>C. stellata</i>	acetoína, 2,3-butanodiol, 2-acetolactato, etanol	Romano et al., 1996
<i>Saccharomycodes</i>	<i>S. ludwigii</i>	acetoína, 2,3-butanodiol, etanol	Romano et al., 1996

\* Adaptado de Luerce, 2002

## 2.6 *Bacillus polymyxa*

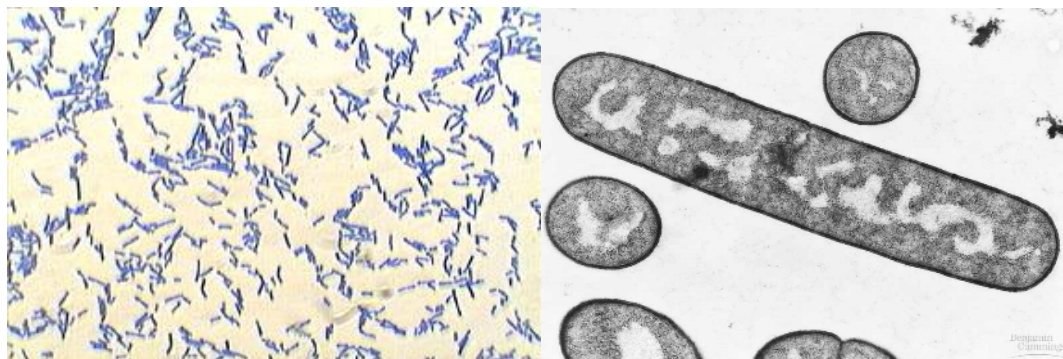
As bactérias do gênero *Bacillus*, em geral, estão classificadas dentro dos microrganismos aeróbicos ou facultativos e produtores de catalase. Podem ser gram positivos ou gram variáveis e crescem favoravelmente em meios sintéticos que contêm açúcares, ácidos orgânicos, álcoois, etc., como únicas fontes 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 (toleram 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.

Algumas bactérias desse gênero produzem enzimas hidrofílicas extracelulares que decompõem polissacarídeos, ácidos nucleicos e lipídeos, permitindo que o organismo empregue tais produtos como fontes de carbono e doadores de elétrons. Antibióticos como a bacitracina, polimixina, tirocidina, gramicidina e circlina são produzidos por essa classe de microrganismos.

Alguns testes adicionais que contribuem para a identificação dessa classe de bactérias envolvem a produção de ácido e ou gás a partir de glicose, teste de Voges-Proskauer (para os redutores de butanodiol), redução de nitrato, capacidade de crescimento sob forma anaeróbia e motilidade. O método de cultivo enriquecido utilizado para o isolamento das espécies consiste de ausência de luz, incubação aeróbia com ingredientes principais a base de amido e amônio e oxigênio como acceptor de elétrons (BIO LAND – Características Del NUTRI-COMPOST™, 2001).

*Bacillus polymyxa*, é uma bactéria caracterizada por produzir 2,3-butanodiol e acetoína, produzindo também acetato de etila, etanol e diacetil, sendo fixadora de nitrogênio. São bactérias gram positivas, mesófilas e produzem esporos ovais, com paredes grossas. Também é conhecida como *Aerobacillus polymyxa*, *Granulobacter polymyxa*, *Clostridium polymyxa* ou ainda *Paenebacillus polymyxa*.

A Figura 2.1 mostra uma imagem de microscópio da bactéria *Bacillus polymyxa* CCT2479 (LUERCE, 2002).



**Figura 2.1 – *Bacillus polymyxa* CCT 2479**

## **2.7 Acetoína**

A acetoína (3-hidroxi-2-butanona, acetil metil carbinol, dimeticetol ou  $\gamma$ -hidroxi- $\beta$ -oxobutano), é uma cetona de odor agradável, cuja massa molecular é 88,10, fórmula química  $C_4H_8O_2$ , ponto de ebulição  $148^\circ\text{C}$  e ponto de fusão  $15^\circ\text{C}$ . O composto atua como potencializador de aromas como o de manteiga, vinagre e café (TEIXEIRA, 1999).

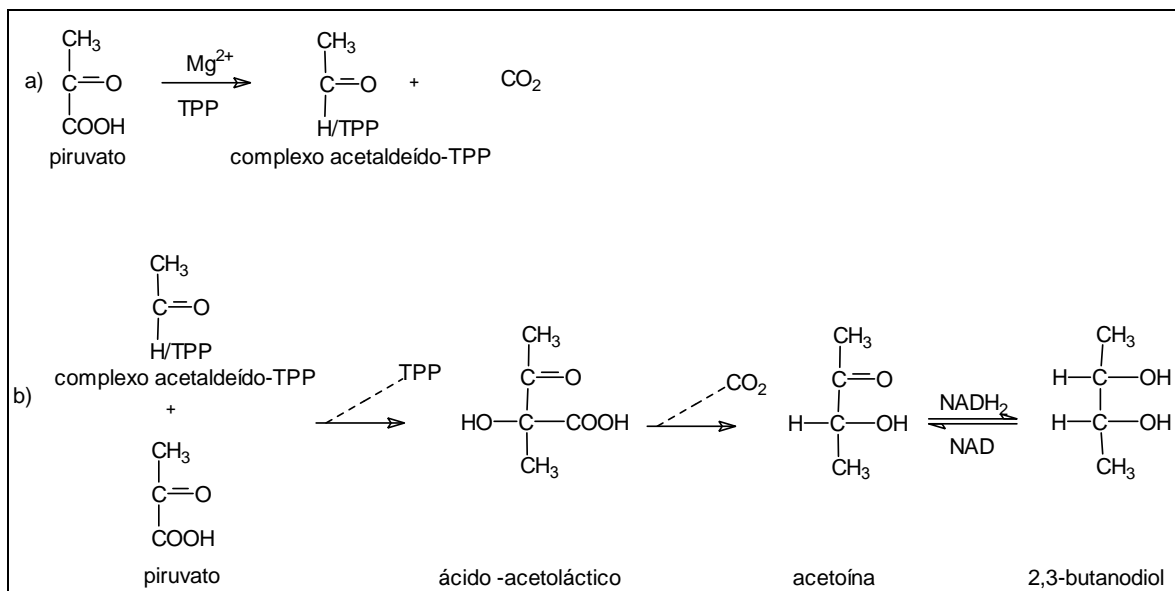
É um produto comumente produzido em processos fermentativos tanto por leveduras como por bactérias. Juntamente com o diacetil e 2,3-butanodiol, é um importante componente dos aromas de uma vasta gama de produtos lácteos, tais como queijo e manteiga. Seu teor em vinhos geralmente é baixo e sua presença nestes não é muito desejada principalmente por se tratar de uma substância derivada do diacetil, o qual apresenta um forte odor característico. Em vinagres, o teor encontrado é muito superior aos vinhos e sua determinação está associada a genuidade do produto (TAKEMOTO, 2000).

### **2.7.1 Biossíntese da Acetoína**

Na maioria das bactérias, a acetoína é formada a partir do piruvato, sendo, desta forma, um produto do metabolismo de carboidratos.

A reação principal na utilização do piruvato proveniente da glicólise é a sua descarboxilação à hidroxietiltiamina pirofosfato (complexo acetaldeído-TPP), a qual requer tiamina pirofosfato e um metal divalente (COLLINS, 1972 *apud* TEIXEIRA, 1999).

As bactérias, exceto *Escherichia coli*, utilizam o mecanismo descrito na Figura 2.2 para a produção de acetoina a partir de hidroxietiltiamina pirofosfato. Conforme se observa na Figura 2.2, o complexo hidroxietiltiamina pirofosfato reage com outra molécula de piruvato, formando o ácido  $\alpha$ -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 (LUERCE, 2002).



**Figura 2.2 – Mecanismo de formação de acetoina a partir de hidroxietiltiamina pirofosfato (LUERCE, 2002)**

### 2.7.2 Fatores Ambientais

Os microrganismos necessitam de energia para o seu desenvolvimento e produção de metabólitos. Essa energia é obtida através do catabolismo de substâncias orgânicas, e para que isso aconteça são necessárias condições bioquímicas, fisiológicas e ambientais adequadas. Os principais fatores ambientais que podem influenciar na

biossíntese podem ser: substâncias nutritivas, pH, temperatura, pressão osmótica, aeração e frequência de agitação, entre outros (MELLO, 2001).

#### 2.7.2.1 Temperatura

SEREBRENNIKOV (1995 *apud* LUERCE, 2002), estudando os efeitos da temperatura na biossíntese de acetoína e 2,3-butanodiol por uma cepa de *Bacillus polymyxa*, verificou, através de experimentos separados envolvendo extratos de células livres e a preparação parcialmente purificada de butanodiol desidrogenase, que as enzimas produtoras de acetoína (acetolactato sintase e acetolactato descarboxilase) possuíam atividade ótima na faixa de 37-40°C, enquanto que para a enzima produtora de 2,3-butanodiol (NADH-dehidrogenase) a temperatura ótima situava-se por volta de 70°C.

#### 2.7.2.2 Aeração

NAKASHIMADA *et al* (1998), verificaram que a altas taxas de aeração (500mL ar/min) concentrações maiores de acetoína foram produzidas por *Bacillus polymyxa*. Em taxas de aeração de 200mL ar/min o rendimento em 2,3-butanodiol foi máximo. Em meio anaeróbico uma quantidade intermediária de butanodiol foi produzida e apenas traços de acetoína foram encontrados.

SEREBRENNIKOV (1995, *apud* LUERCE, 2002), encontrou concentrações maiores de acetoína em meios mais aerados ( $K_{La} = 90h^{-1}$ ); com aeração mais baixa ( $K_{La} = 10h^{-1}$ ) a produção de 2,3-butanodiol era favorecida.

DE MAS *et al* (1988) verificaram que a altas taxas de transferência de oxigênio (superiores a 50mmol/L/h), baixas concentrações de 2,3-butanodiol foram encontradas, enquanto quantidades maiores de acetoína e acetato foram produzidos.

JANSEN *et al* (1983) em experimentos com *Klebsiella oxytoca*, bem como CAÑAS *et al* (1999), utilizando a bactéria *Leuconostoc mesenteroides*, encontram maiores teores de acetoína em meios com alta taxa de transferência de oxigênio que o observado em meios menos aerados.

### 2.7.2.3 Potencial Hidrogeniônico (pH)

Segundo LUERCE (2002), a produção de acetoína pela bactéria *Bacillus polymyxa*, tem maior rendimento na condição de pH 5,5.

Como a maioria das bactérias cresce 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).

### 2.8.2.4 Concentração inicial de substrato

TEIXEIRA (1999) realizou ensaios em frascos agitados com *Hanseniaspora guilhermondii* e encontrou maiores concentrações de acetoína nos experimentos nos quais utilizou-se maior concentração inicial de glicose (64g/L).

Segundo LUERCE (2002), realizando ensaios com a bactéria *Bacillus polymyxa*, nos testes a 30, 40 e 50g/L, a produção de acetoína atingiu maiores valores em concentração inicial de glicose de 50g/L.

### 2.7.2.5 Volume do meio de cultura

Em estudos realizados por NAKASHIMADA *et al* (1998), em frascos agitados verificou-se que o volume do meio de cultivo teve influência sobre a produção de acetoína pela bactéria *Bacillus polymyxa* devido a alteração provocada na transferência de oxigênio, que diminui quando se aumenta o volume do meio, favorecendo a produção de 2,3-butanodiol.

### 2.7.2.6 Inóculo

Segundo BADINO JR. (2000), geralmente, o tamanho ideal do inóculo está situado entre 5 e 10% do volume total do meio de cultivo. É recomendável ainda que haja um percentual considerável de células viáveis em fase de crescimento exponencial.

LUERCE (2002), utilizando 10% do volume do meio de cultura em inóculo estimou uma concentração de inóculo entre 0,9 e 1,1g/L de células, após tê-lo deixado incubado por 24h (final da fase exponencial).

# *MATERIAL E MÉTODOS*



### 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 *Microrganismo*

O microrganismo utilizado nos cultivo foi a bactéria *Bacillus polymyxa* CCT 2479 (referência ATCC 842) fornecida pela Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Toselo” (Campinas, SP).

#### 3.2 *Meio de Manutenção*

O meio utilizado para a manutenção da bactéria foi o Meio AN (Agar Nutrient), cuja composição é apresentada na Tabela 3.1.

*Tabela 3.1 – Composição do Meio AN para manutenção do microrganismo*

<b>Componentes</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
Extrato de carne (Biológica)	3
Peptona bacteriológica (Biológica)	5
Agar pó fino (Biológica)	15

Os ingredientes foram pesados em balança analítica, dissolvidos em água destilada e aquecidos até completa dissolução, sob constante agitação. A seguir, o meio distribuído em tubos de ensaio com tampões de algodão, os quais foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos. Os tubos contendo o meio ainda quente foram inclinados sob a bancada num ângulo de 30° até completo resfriamento.

A bactéria foi inoculada e incubada em estufa bacteriológica a 30°C por 24 horas. Posteriormente, os tubos foram mantidos sob refrigeração a 4°C. A repicagem foi efetuada a cada dois meses.

### 3.3 Preparo do inóculo para os ensaios fermentativos

O inóculo para as fermentações foi preparado utilizando-se o meio YM (*Yeast Malt Extract*), apresentado na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Composição do Meio de cultivo YM

Componentes	Concentração (g/L)
Extrato de Levedura (Biológica)	3
Extrato de Malte (Biológica)	3
Peptona Bacteriológica (Biológica)	5
Glicose (Nuclear)	30

Transferiram-se três alçadas de células da cultura estoque para o frasco erlenmeyer aletado (200mL para os ensaios em frascos agitados em frascos de 1000mL) com o caldo de cultivo. Os frascos foram cobertos com tampões de algodão hidrófobo, a fim de evitar possíveis contaminações e permitir aeração, e incubados em *shaker* incubador refrigerado modelo *TE-421 TECNAL*, mostrado na Figura 3.1, com agitação orbital de 150rpm, a 37°C. Após um período de 16 a 24 horas o inóculo estava em fase exponencial de crescimento celular e pronto para uso.



Figura 3.1 – Incubador Refrigerado com Agitação Orbital modelo TE-421 TECNAL

O crescimento das células foi acompanhado por turbidimetria e gravimetria para indicar o período no qual as células atingem a fase exponencial de crescimento, conforme metodologia descrita no item 3.6.3. O volume de inóculo adicionado ao meio de cultura utilizado nos cultivos foi equivalente a 10% (dez por cento) do volume total.

### ***3.4 Meio de cultivo utilizado nos ensaios fermentativos***

Os cultivos foram realizados utilizando-se o meio PAY (*Phosphate Ammonium Yeast*, descrito por DE MAS *et al.*, 1988), mostrado na Tabela 3.3.

*Tabela 3.3 – Composição do Meio PAY*

<b>Componente</b>	<b>Concentração</b>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9,16g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,75g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,9g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HSO <sub>4</sub>	5,8g/L
Extrato de Levedura	13,1g/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	219mg/L
FeSO <sub>2</sub> .7H <sub>2</sub> O	44mg/L
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	8,8mg/L
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,9mg/L
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,9mg/L
EDTA	44mg/L
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	150mg/L
Glicose	30g/L, 50g/L

O meio foi esterilizado em duas partes separadas: uma solução contendo os sais de fosfato e de amônio, juntamente com o extrato de levedura e uma segunda solução contendo a glicose, os demais sais e o ácido sulfúrico. Tal procedimento faz-se necessário a fim de impedir a ocorrência de reações indesejáveis e também para evitar a precipitação de

sais. O pH foi ajustado utilizando uma solução de concentração 2M de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) antes da inoculação do meio.

### ***3.5 Ensaios Fermentativos***

Foram realizados cultivos em frascos agitados para verificar as características do crescimento da bactéria e também para avaliar a influência do pH inicial, da concentração inicial de substrato e do tempo de cultivo do inóculo sobre a produção de acetoína.

Os experimentos foram realizados em frascos erlenmeyers (1000mL) contendo 450mL de meio PAY (mostrado na Tabela 3.3), inoculados com 50mL de inóculo (preparado conforme descrito no item 3.3). Os frascos foram cobertos com tampões de algodão hidrófobo, para evitar possíveis contaminações e permitir aeração e mantidos a 37°C, sob agitação de 150rpm em *shaker*.

### ***3.6 Métodos analíticos***

#### ***3.6.1 Amostragem***

Foram retiradas alíquotas de aproximadamente 1,5mL do caldo fermentativo em intervalos de tempo de 4 horas na fase inicial do processo, 1 hora durante a fase exponencial de crescimento e 2 horas (ou mais, dependendo do ensaio) no decorrer do cultivo. As amostras foram coletadas com pipetas estéreis, junto à chama do bico de Bunsen em câmara de fluxo laminar.

#### ***3.6.2 Avaliação da contaminação***

Corou-se lâminas através do Teste de Gram para análise em microscópio óptico, a fim de verificar a incidência de outros microrganismos no caldo fermentativo. Sobre o esfregaço confeccionado com a amostra coletada no último ponto do ensaio verteu-se cristal-violeta durante 1 minuto e lavou-se com água destilada; a seguir, cobriu-se com lugol por mais 1 minuto, lavando com água destilada novamente; verteu-se álcool etílico 70% e água destilada logo em seguida e, finalmente, a lâmina foi coberta com fucsina

durante 30 segundos, lavada e seca com papel absorvente, sendo posteriormente observada e avaliada e microscópio.

### 3.6.3 Determinação da concentração celular

A concentração celular no decorrer dos cultivos foi determinada por dois métodos: indiretamente por turbidimetria e diretamente por gravimetria (LEVEAU & BOUIX, 1984 *apud* TEIXEIRA, 1999).

A absorbância das amostras foi medida a um comprimento de onda de 540nm em espectrofotômetro CELM modelo E225D, em cubetas cilíndricas de vidro com 1cm de diâmetro. As amostras foram diluídas sempre que a absorbância fosse superior a 0,300 (DE MAS *et al.*, 1988). 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 experimento.

Para a construção da curva de calibração (mostradas no Anexo II) coletou-se 10mL da suspensão celular no final do cultivo, os quais foram filtrados a vácuo, em filtro milipore com membrana de acetato de celulose (Sartorius) de 0,2 $\mu$ m, seca em estufa a 105°C por 24 horas e previamente tarada. Após secagem a 105°C até massa constante, a membrana contendo as células foi pesada e a biomassa determinada pela diferença de massa. Esta etapa foi realizada em triplicata. A concentração celular (g/L) foi obtida dividindo-se a massa média de células seca (g) pelo volume de suspensão filtrado (10mL).

Simultaneamente, coletou-se 15mL do caldo fermentativo, os quais foram divididos em cinco alíquotas que foram diluídas na faixa de 1:10 a 1:50, de acordo com o experimento. Para cada diluição fez-se a leitura da absorbância a 540nm. A concentração celular obtida por gravimetria foi dividida por cada um dos fatores de diluição utilizados. A curva de calibração foi então plotada correlacionando-se a concentração celular (g/L) com a absorbância lida a 540nm.

### 3.6.4 Dosagem de glicose

A concentração de glicose foi determinada através do kit colorimétrico Glicose-PP (Gold Analisa Diagnóstica). Adicionou-se 2mL do reagente glicose a alíquotas de 20µL das amostras e do padrão, os quais foram homogeneizados e incubados durante 10 minutos a 37°C. A absorbância da coloração obtida foi lida contra o branco do reagente, a um comprimento de onda de 500nm, em espectrofotômetro CELM modelo E225D com cubetas de vidro cilíndricas de 1cm de diâmetro. A concentração de glicose foi determinada através da equação 3.1.

$$\text{Concentração de glicose(g/L)} = \frac{\text{absorbância da amostra}}{\text{absorbância do padrão}} * \text{diluição} \quad (3.1)$$

A relação apresenta comportamento linear até 4g/L, assim, em concentrações superiores à citada, a amostra foi diluída e a resposta foi multiplicada pelo respectivo fator de diluição.

### 3.6.5 Determinação da concentração de acetoína

As amostras coletadas no decorrer dos cultivos foram centrifugadas a 14000rpm durante 15 minutos em centrífuga *Hsiangtai Machinery Ind. Co. Ltda* modelo MCD-2000, e armazenadas sob refrigeração a -4°C, para posterior análise cromatográfica.

As dosagens de acetoína foram realizadas em cromatógrafo a gás Ciola & Gregori modelo CG90 equipado com: detector de ionização de chama e coluna HP-1 (Crosslinked Methyl Siloxane 53mm de diâmetro e 30m de comprimento); sistema de aquecimento de rampa de temperatura iniciando a 40°C até 200°C a uma taxa de 20°C/min, temperatura do injetor 165°C, e do detector 230°C. Os cromatogramas foram obtidos e analisados com o programa *Clarite Lite v.2.2* da *DataApex Ltda* (Anexo III).

### 3.7 Cinética microbiana

#### 3.7.1 Identificação das fases de crescimento

Após a inoculação de um meio de cultura, favorável ao desenvolvimento do microrganismo em estudo, sob temperatura controlada e agitação adequada, observa-se um comportamento nos valores da concentração celular conforme indica a Figura 3.1. Nesta figura podemos observar as seguintes fases de crescimento (SCRIBAN, 1985; SCHMIDELL, 2001):

- *Fase 1*: Conhecida como fase *lag* ou de latência, que se segue imediatamente após a inoculação do meio com o microrganismo. Trata-se de um período de adaptação durante o qual a célula sintetiza as enzimas necessárias ao metabolismo dos componentes presentes no meio. No curso dessa primeira fase, não há reprodução celular:  $X = \text{cte} = X_0$ . A velocidade de crescimento (g/L.h) é nula:

$$\frac{dX}{dt} = 0 \quad (3.2)$$

A duração desta fase varia, principalmente com o tamanho do inóculo que serviu para a sementeira; com a idade das células que contém, mas também e, sobretudo, com seu estado bioquímico. Se se trata de células provenientes de um meio de cultura de composição diferente, a adaptação enzimática pode levar tempo.

- *Fase 2*: Essa é a fase de transição, em que se observa o início da reprodução microbiana.

- *Fase 3*: Denominada fase logarítmica ou exponencial é a fase onde a velocidade específica de crescimento ( $\mu_X = \mu_m$ ) é constante e máxima. Nessas circunstâncias a equação 3.3 permite concluir que a velocidade de crescimento é diretamente proporcional à concentração de células, isto é:

$$\mu_x = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (3.3)$$

$$\Rightarrow \frac{dX}{dt} = \mu_m \cdot X \quad (3.4)$$

Assim, as velocidades específicas de crescimento microbiano para cada ensaio foram determinadas a partir das curvas de concentração celular, de acordo com a equação 3.5:

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (3.5)$$

Traçando-se as curvas em coordenadas semilogarítmicas, do tipo  $\ln X = f(t)$ , obtém-se uma fase em que a velocidade específica é constante (crescimento exponencial), onde a distribuição dos pontos pode ser ajustada por uma reta. O coeficiente angular da reta ajustada corresponde à velocidade específica de crescimento da fase exponencial.

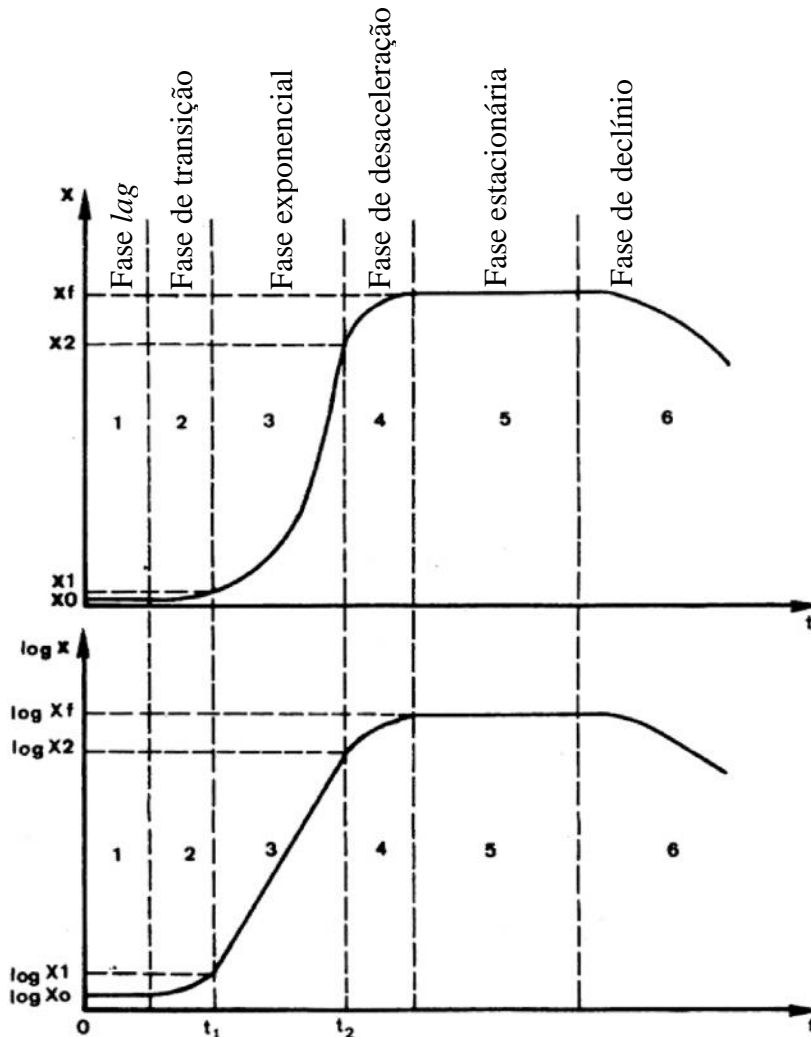


Figura 3.2 – Fases do Crescimento Microbiano (SCRIBAN, 1985)



- *Fase 4*: Fase de desaceleração do ritmo de crescimento onde ocorre o esgotamento do meio de cultura devido ao desaparecimento de um ou vários compostos necessários ao crescimento, e também ao acúmulo de metabólitos inibitórios. A concentração celular continua a aumentar, mas  $dX/dt$  e a velocidade específica passam a diminuir.

- *Fase 5*: Fase estacionária. Nesta fase, a concentração celular atinge o valor máximo e constante, existindo um balanço entre a velocidade de crescimento e a velocidade de morte do microrganismo, ocorrendo também mudanças na estrutura bioquímica da célula.

- *Fase 6*: Fase de Declínio ou lise. O valor da concentração celular diminui a uma velocidade que excede a velocidade de produção de células.

### 3.7.2 Fatores de conversão

O fator de conversão de substrato (glicose) em células é um parâmetro que define a relação entre a produção de células e o consumo de substrato, podendo ser definido como:

$$Y_{x/s} = -\frac{\mu_x}{\mu_s} (g/g) \quad (3.6)$$

onde

$\mu_x$  = velocidade específica de crescimento celular ( $h^{-1}$ )

$\mu_s$  = velocidade específica de consumo de substrato ( $gS/gX.h$ )

Por um balanço de massa para as células e o substrato em processo descontínuo de volume constante, chega-se que:

$$\mu_x = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (3.7)$$

$$\mu_s = -\frac{1}{X} \frac{dS}{dt} \quad (3.8)$$

Rearranjando as equações 3.6, 3.7 e 3.8, chega-se:

$$Y_{x/s} = -\frac{dX}{dS}(g/g) \quad (3.9)$$

Plotando-se os valores de concentração celular contra o consumo de substrato associado ao crescimento de células obtêm-se uma reta cujo coeficiente angular é o fator de conversão de substrato em células ( $Y_{x/s}$ ).

O fator de conversão de substrato (glicose) em produto (acetoína) é um parâmetro que define a relação entre a produção de produto e o consumo de substrato, podendo ser definido como:

$$Y_{p/s} = -\frac{\mu_p}{\mu_s}(g/g) \quad (3.10)$$

onde

$\mu_p$  = velocidade específica de crescimento celular ( $h^{-1}$ )

$\mu_s$  = velocidade específica de consumo de substrato (gS/gP.h)

Por um balanço de massa para produto e o substrato em processo descontínuo de volume constante, chega-se que:

$$\mu_p = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \quad (3.11)$$

$$\mu_s = -\frac{1}{X} \frac{dS}{dt} \quad (3.12)$$

Rearranjando as equações 3.10, 3.11 e 3.12, chega-se:

$$Y_{p/s} = \frac{dP}{dS}(g/g) \quad (3.13)$$

Plotando-se os valores de concentração celular contra o consumo de substrato associado ao crescimento de células obtêm-se uma reta cujo coeficiente angular é o fator de conversão de substrato em células ( $Y_{x/s}$ ).

A relação entre a produção de células e a formação produto (acetoina), de forma análoga aos fatores de conversão, é determinada pela equação 3.14:

$$Y_{P/X} = -\frac{dP}{dX} (g / g) \quad (3.14)$$

Plotando-se os valores de concentração de produto contra a concentração de células associada a sua formação obtém-se uma reta cujo coeficiente angular é o fator de conversão de célula em produto ( $Y_{P/X}$ ).

## *RESULTADOS E DISCUSSÃO*

## 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ensaios foram conduzidos com o objetivo de avaliar o efeito das condições do meio onde se encontra o microrganismo na produção de acetoina. Desta forma, foram realizados testes de pH inicial, concentração inicial de substrato (glicose) e de tempo de cultivo do inóculo. Os ensaios foram realizados em frascos agitados de 1000mL, com 500mL de meio, nas condições de temperatura e agitação determinadas ótimas de acordo com a literatura, mantendo-se fixos os valores da temperatura em 37°C e da agitação em 150rpm (LUERCE, 2002).

### 4.1 Estudo do efeito do pH

Segundo LUERCE (2002), testando pHs entre 5,5 e 6,5, a máxima produção de acetoina pela bactéria *Bacillus polymyxa*, foi obtida em pH 5,5 com uma concentração inicial de glicose de 50g/L. Desta forma, a ordem escolhida para a realização dos ensaios foi partir de valores de pH mais baixos até o ideal sugerido por LUERCE (2002), uma vez que na literatura não encontramos estudos de cultivo desse microrganismo para uma faixa de concentração hidrogeniônica mais baixa que 5,5 (pHs mais ácidos). Os valores de pH escolhidos foram 4,5, 5,0 e 5,5.

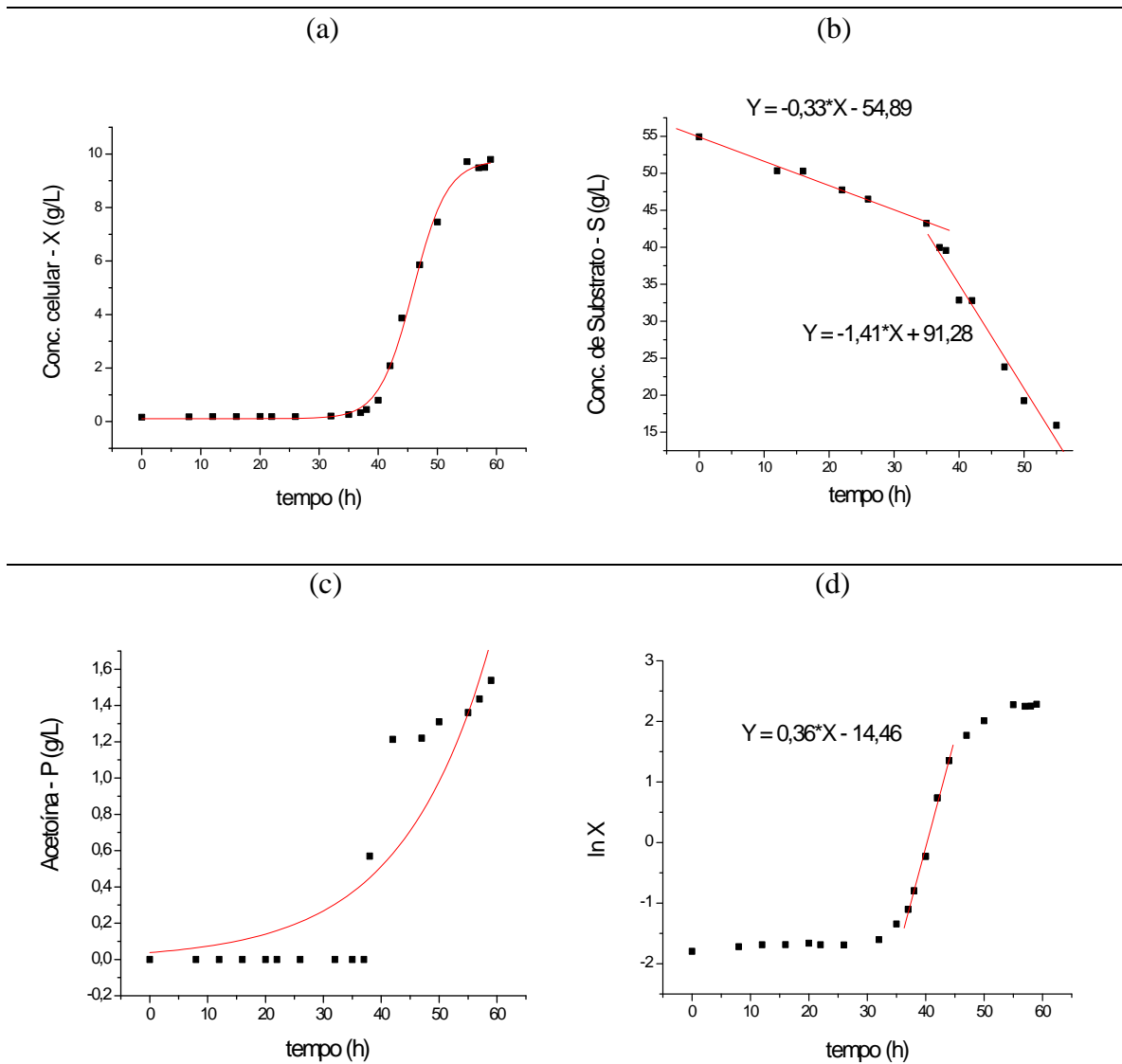
#### 4.1.1 Ensaio a pH inicial 4,5

Para o ajuste do pH inicial foi utilizada uma solução concentrada (2M) de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) sendo adicionada antes da inoculação do caldo fermentativo.

Nas Figuras 4.1(a) e 4.1(d), podemos verificar a existência de uma fase exponencial de crescimento celular bem definida, porém, observada num intervalo de tempo de aproximadamente 7h (de 37 a 44h). Neste caso, o valor da velocidade específica de crescimento na fase exponencial ( $\mu$ ) foi de 0,36h<sup>-1</sup>.

Também foi verificado que a fase de adaptação do microrganismo (fase *lag*) foi muito prolongada, tendo uma duração próxima a 37h com uma concentração celular de

aproximadamente 0,2g/L. Este fato pode estar relacionado com a fase de crescimento em que se encontra o inóculo no momento da inoculação, bem como pode estar ligado a uma dificuldade de adaptação do microrganismo, que deve ser efeito do pH inicial do meio (pH 4,5), diferente do pH de cultivo do inóculo de aproximadamente 6,5.



**Figura 4.1 – Comportamento dinâmico da concentração de células (a), da concentração de substrato (b), da concentração de acetoina (c) e do logaritmo da concentração de células (d) a pH inicial 4,5,  $S_0 = 50\text{g/L}$ ,  $T = 37^\circ\text{C}$ , agitação de 150rpm,  $t_{ci} = 24\text{h}$ .**

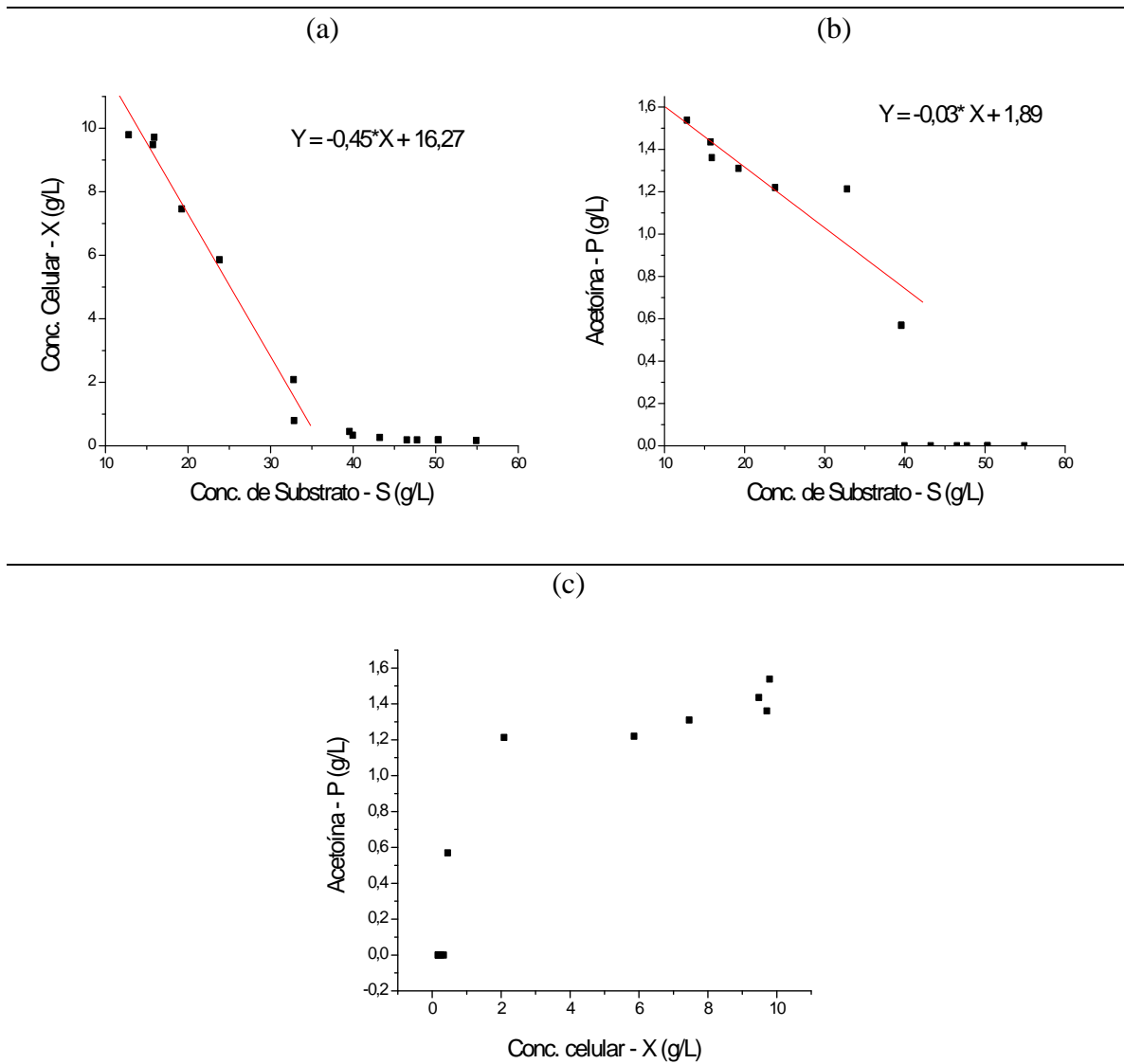
Analisando as Figuras 4.1(a), 4.1(b), e 4.1(c), pode-se notar que durante a fase *lag* de crescimento celular, além de não haver geração de células, não ocorre também produção de acetoína, apesar de haver um grande consumo de substrato, como mostra a velocidade de consumo de substrato de 0,33g/L.h, representada pela inclinação das retas da Figura 4.1(b). Observa-se que a produção de acetoína inicia-se durante a fase exponencial do crescimento celular (Figura 4.1(c)).

Ao término da fase *lag* e início da fase exponencial de crescimento celular é possível identificar uma relação direta entre o consumo de substrato e a geração de células, como pode ser observado na Figura 4.2(a), de onde se obtém o fator de conversão de substrato em células ( $Y_{X/S}$ ) de 0,45g/g, indicando que o substrato está sendo utilizado preferencialmente para o crescimento celular, o que pode ser justificado pela alta velocidade de consumo de substrato verificada para essa etapa (1,41g/L.h) como mostra a Figura 4.1(b).

Na Figura 4.2(b) pode-se estabelecer uma relação entre a produção de acetoína e o consumo de glicose, obtendo-se um fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) de 0,03g/g, confirmando que nesta etapa do processo apenas uma pequena fração do substrato consumido é utilizado para a produção de acetoína, estando a maior parte destinada a geração de células.

Contudo, não é possível estabelecer uma relação entre a produção de células e a produção de acetoína, pois, apesar da produção de acetoína aparecer com a geração de células, não existe uma proporcionalidade entre as suas concentrações, como mostrado na Figura 4.2(c). Constata-se ainda que neste ensaio, apesar da elevada concentração celular atingida (9,7g/L) e do alto consumo de glicose durante as 55h de processo, a produção de acetoína foi muito baixa, atingindo uma concentração de 1,54g/L em relação aos ensaios que serão demonstrados a seguir, sem atingir um ponto de máximo, uma vez que ao final do processo a sua concentração no meio apresenta tendência de aumento.

Devido à impossibilidade de obtenção de mais amostras do processo, pois o volume máximo retirado de meio não deve ser maior que 10% do volume total (no caso 50mL), foi necessário encerrar o processo antes do consumo total de glicose, restando no meio uma concentração de aproximadamente 12g/L de substrato.



**Figura 4.2 – Comportamento estequiométrico da conversão de substrato em célula (a), de substrato em produto (b) e de célula em produto (c) a pH inicial 4,5,  $S_0 = 50\text{g/L}$ ,  $T = 37^\circ\text{C}$ , agitação de 150rpm,  $t_{ci} = 24\text{h}$ .**

Nota-se, contudo, que no término do processo, o crescimento celular já havia esgotado, mesmo havendo fonte de carbono residual. Não havendo mais crescimento



celular e continuando o consumo de substrato podemos esperar que este esteja sendo utilizado para a produção de acetoína, uma vez que existe aumento de sua concentração. Conclui-se ainda que esteja havendo inibição do crescimento por falta de algum nutriente, que não a fonte de carbono, como por exemplo, oxigênio.

Esta constatação é útil para viabilizar tecnologicamente a produção de acetoína, pois pode-se separar o processo em duas etapas: uma de crescimento de células e uma de produção de acetoína, nas quais se buscaria a melhor condição individualmente.

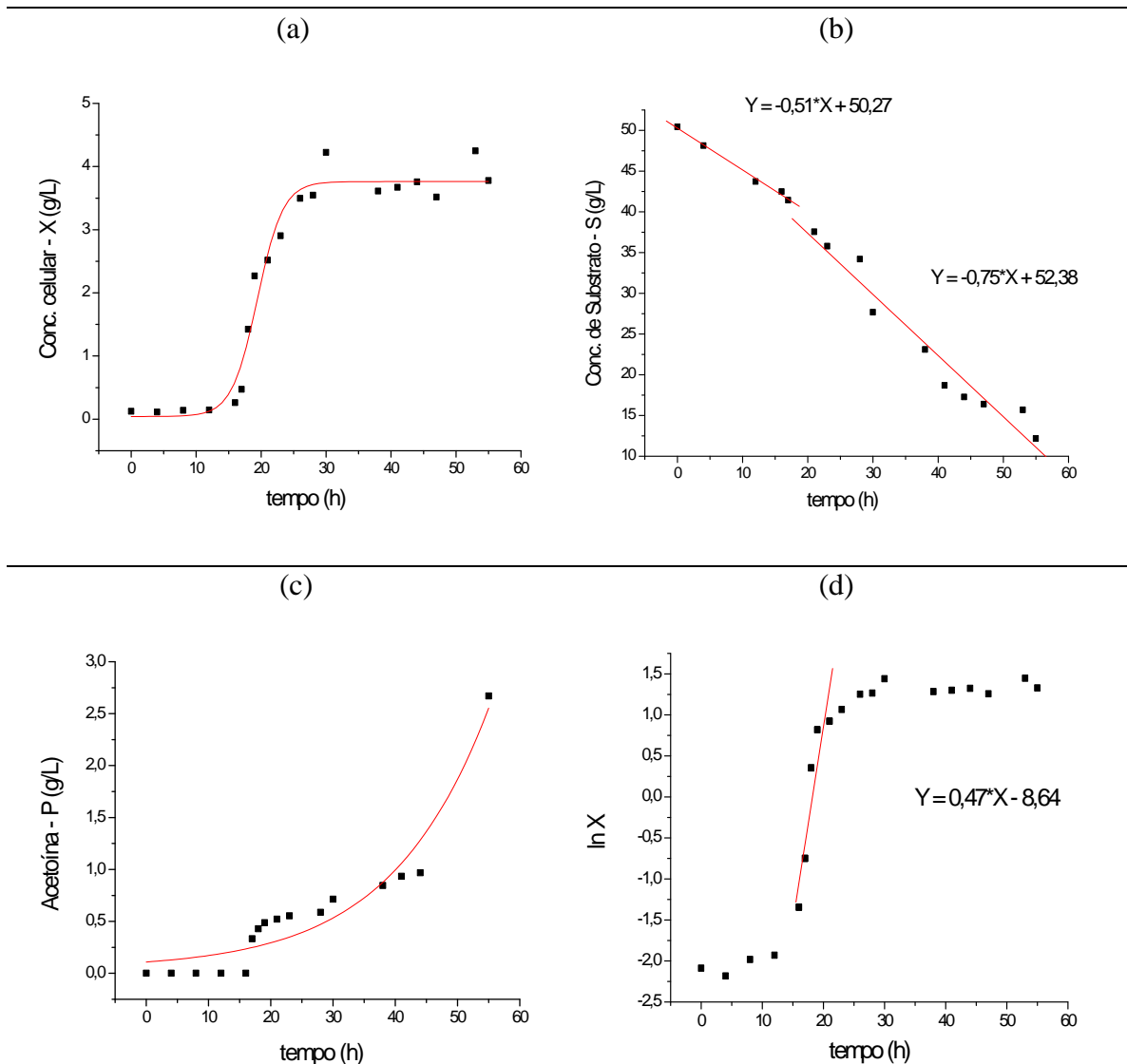
#### 4.1.2 Ensaio a pH inicial 5,0

Analisando as Figuras 4.3(a), 4.3(b) e 4.3(c), observa-se uma fase *lag* de crescimento celular também prolongada, menor que a observada a pH 4,5, porém ainda de duração prolongada, em torno de 16h. Nota-se que há um grande consumo de glicose durante esta etapa sem a produção de células, não tão acentuado quanto no ensaio anterior (item 4.1.1), como mostra a Figura 4.3(b) pela velocidade de consumo do substrato para as primeiras 17h (0,51g/L.h).

Na Figura 4.3(d) observa-se uma fase exponencial bem definida, porém de curta duração, cerca de 5h, onde foi possível determinar o valor da velocidade específica de crescimento celular ( $\mu = 0,47h^{-1}$ ). Contudo, uma concentração celular muito inferior àquela alcançada no ensaio a pH inicial 4,5 foi obtida, ficando em torno de 4,2g/L.

Percebe-se neste ensaio que a produção de acetoína iniciou-se na etapa em que o processo se encontra em fase exponencial de crescimento celular (17h), tendo aumento contínuo até o término do ensaio mesmo com a geração de células encerrada.

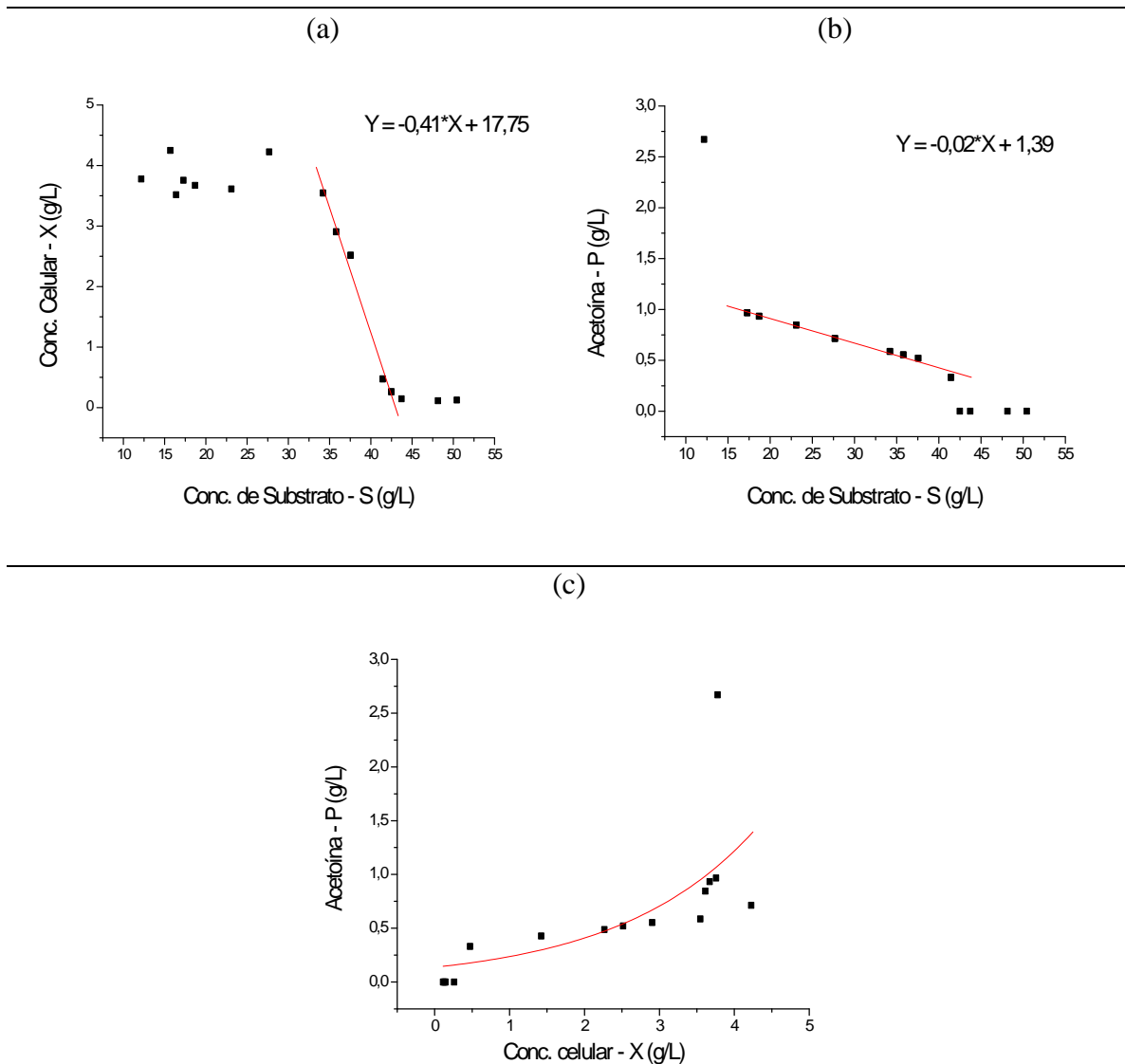
A velocidade de consumo de substrato verificada para a fase estacionária (0,75g/L.h) foi constante. O não crescimento celular e a baixa produção de acetoína, atingindo concentração de 2,7g/L indicam que a glicose pode estar sendo utilizada para a produção de algum outro metabólito, como etanol, acetato de etila ou diacetil, os quais não foram quantificados neste trabalho.



**Figura 4.3 - Comportamento dinâmico da concentração de células (a), da concentração de substrato (b), da concentração de acetoína (c) e do logaritmo da concentração de células (d) a pH inicial 5,0,  $S_0 = 50\text{g/L}$ ,  $T = 37^\circ\text{C}$ , agitação de 150rpm,  $t_{ci} = 24\text{h}$ .**

A Figura 4.4(a) mostra que existe uma relação entre a geração de células e o consumo de substrato desde o início da fase exponencial até a fase de desaceleração do crescimento celular, determinando o valor do fator de conversão de substrato em célula ( $Y_{X/S}$ ) em 0,41g/g. Assim, o consumo de substrato nesta etapa é preferencialmente conduzido para a produção de células. Nas fases seguintes temos uma estabilização no crescimento celular.

Pela Figura 4.4(b), foi determinado o valor do fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ), sendo seu valor 0,02g/g. Verificou-se também que o seu comportamento foi distinto do mostrado pela curva de conversão de substrato em célula, indicando que a produção de acetoina não foi dependente do crescimento celular, como pode ser observado na Figura 4.4(c). Desta forma, não é possível determinar uma relação entre a produção de células e de produto ( $Y_{P/X}$ ).



**Figura 4.4 – Comportamento estequiométrico da conversão de substrato em célula (a), de substrato em produto (b) e de célula em produto (c) a pH inicial 5,0,  $S_0 = 50\text{g/L}$ ,  $T = 37^\circ\text{C}$ , agitação de 150rpm,  $t_{ci} = 24\text{h}$ .**

#### 4.1.3 Ensaio a pH 5,5

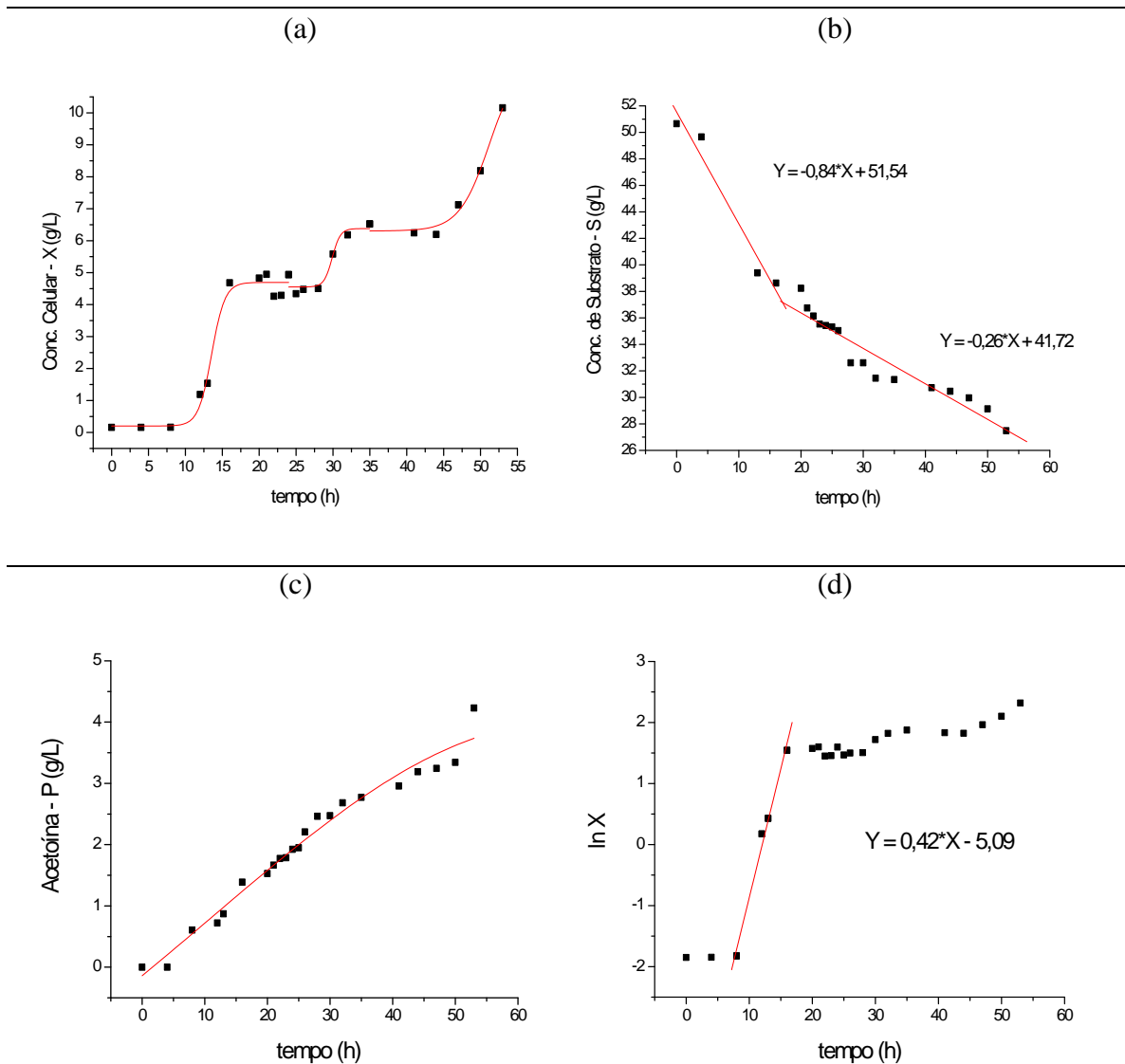
Neste ensaio foram utilizadas as mesmas condições ótimas para a produção de acetoína obtidas por LUERCE, 2002 (temperatura de 37°C, agitação de 150rpm, concentração de glicose de 50g/L e pH inicial 5,5).

Nesse ensaio houve uma sensível redução da fase *lag* de crescimento celular quando comparada aos outros dois ensaios realizados a pHs mais baixos, como é mostrado na Figura 4.5(a), onde também foi possível visualizar que esta fase do crescimento não ultrapassou 8h, ao passo que na Figura 4.5(c) observa-se a presença de traços de acetoína já durante esta etapa.

Verifica-se na Figura 4.5(b) que o consumo de glicose continuou sendo proporcionalmente à geração de célula, alto durante a fase *lag* do processo. Apesar da alta velocidade de consumo de substrato nas primeiras 16h (0,84g/L.h), o consumo de glicose foi ainda menor que o verificado nos outros ensaios, sendo que após 53h de processo ainda restaram cerca de 27g/L de glicose no meio, um pouco mais da metade da concentração inicial (50g/L). Após as 16h de processo, a velocidade de consumo de glicose diminuiu para 0,26g/L.h, porém, percebe-se ainda uma tendência de crescimento na concentração celular e na concentração de acetoína no meio ao final do experimento.

Nota-se que a concentração celular máxima (10g/L) é maior que a verificada no ensaio a pH 5,0 (4,2g/L) e próxima ao valor da obtida no ensaio a pH 4,5 (9,7g/L) e o valor da velocidade específica de crescimento celular para a fase exponencial ( $\mu$ ) foi de 0,42h<sup>-1</sup>.

A Figura 4.5(a) revela também a existência de pelo menos duas etapas de crescimento celular exponencial, fenômeno este que é denominado de diauxia (*diauxi*), porém não se conseguiu explicar a origem deste fato.



**Figura 4.5 - Comportamento dinâmico da concentração de células (a), da concentração de substrato (b), da concentração de acetoina (c) e do logaritmo da concentração de células (d) a pH inicial 5,5,  $S_0 = 50\text{g/L}$ ,  $T = 37^\circ\text{C}$ , agitação de 150rpm,  $t_{ci} = 24\text{h}$ .**

Ao analisar a Figura 4.6(a), verificamos a relação existente entre a geração celular e o consumo de substrato, obtendo um valor de 0,45g/g para o fator de conversão de substrato em célula ( $Y_{X/S}$ ). Percebe-se neste ensaio que não ocorreu estabilização do crescimento celular no término do ensaio, tendo aumentado durante quase todo o processo.

Pela Figura 4.6(b), obteve-se um fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) de 0,23g/g, mostrando que a glicose está sendo utilizada tanto para produção de células quanto para produção de acetoina.

A Figura 4.6(c) mostra que a produção de acetoina ocorreu durante praticamente todo o processo, atingindo o valor máximo de 4,23g/L, sendo superior ao obtido por LUERCE (2002) nas mesmas condições (pH = 5,5, T= 37°C, 150rpm).

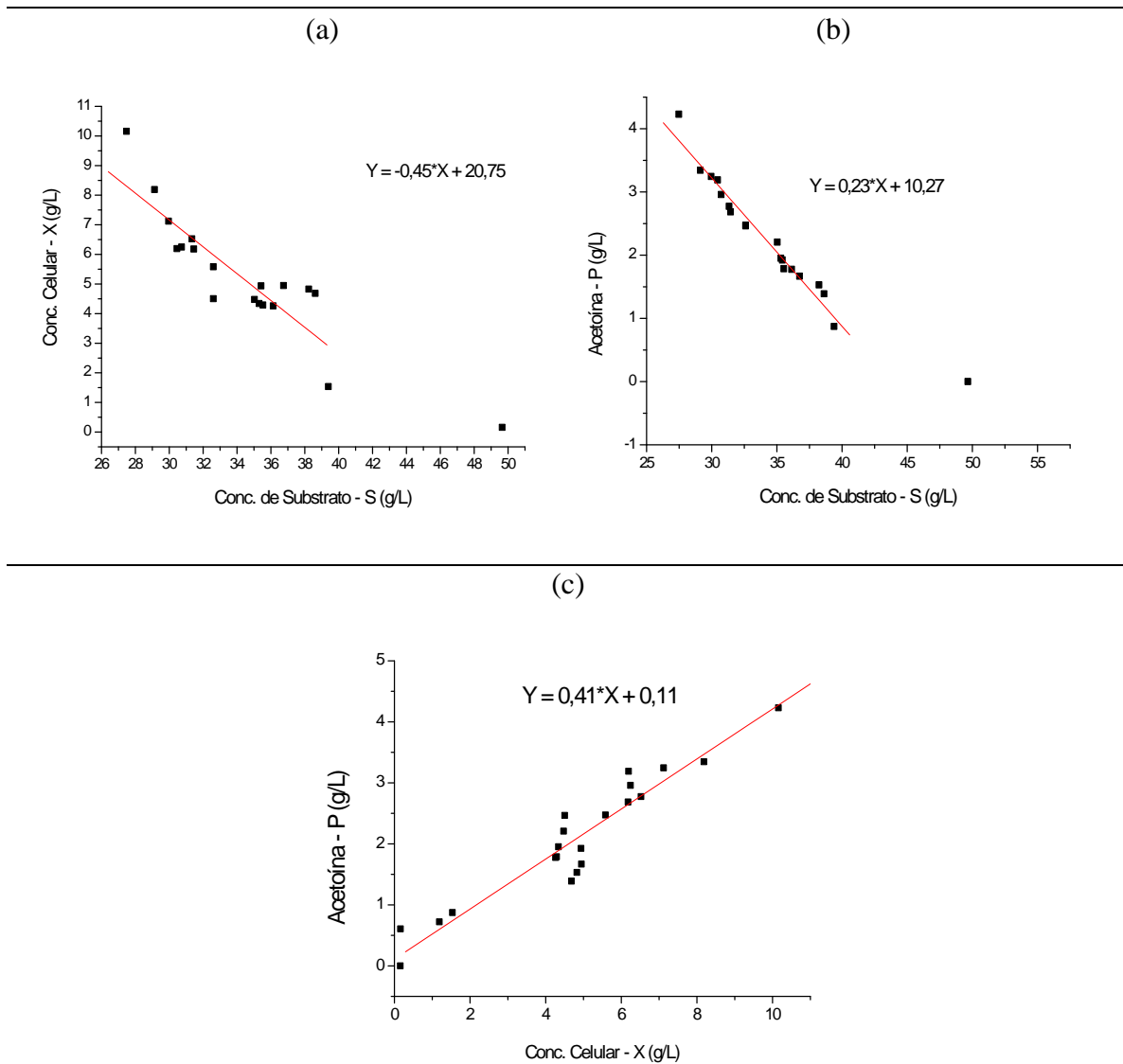
Através da Figura 4.6(c) pode-se determinar uma relação entre a produção de acetoina e a geração de células ( $Y_{P/X}$ ), obtendo-se um valor de 0,41g/g. Contudo não se pode afirmar que a produção de acetoina é dependente do crescimento celular, pois o comportamento de produção quase que constante de acetoina ao longo do tempo não foi verificado com a produção de células que apresentou uma fase exponencial de crescimento.

LUERCE, 2002, observou em seus experimentos que existia uma dependência entre a produção de acetoina e o crescimento celular. Embora os resultados obtidos para pH 5,5 pudessem confirmar essa hipótese, nota-se que para pH 4,5 e 5,0, ficou claro que não há relação constante entre o crescimento celular e a formação de produto. Obteve-se, inclusive nestes ensaios, acetoina durante o período em que a concentração celular manteve-se constante.

Porém, os experimentos realizados por LUERCE (2002) tiveram menor tempo de duração (40h) obtendo concentração de células de 1,34g/L, enquanto nos ensaios realizados neste trabalho, acompanhou-se a produção por aproximadamente 55h, o que pode explicar as altas concentrações celulares atingidas, aproximadamente 10,1g/L.

Comparando os valores de  $\mu$  para a fase exponencial dos ensaios a pH inicial 4,5 e 5,5, verificou-se que quanto mais baixo o pH menor o valor do parâmetro, fato esse também observado por LUERCE (2002), que obteve para o ensaio a pH 5,5 um  $\mu = 0,27h^{-1}$  e  $X = 1,34g/l$ , e para o ensaio a pH 6,5,  $\mu = 0,41h^{-1}$  e  $X = 3,49g/l$ . Apesar do ensaio a pH inicial ter apresentado uma velocidade específica um pouco acima da esperada, uma vez

que a curta duração de sua fase exponencial (5h) não permitiu uma boa amostragem, já que foram obtidos poucos pontos.



**Figura 4.6 – Comportamento estequiométrico da conversão de substrato em célula (a), de substrato em produto (b) e de célula em produto (c) a pH inicial 5,5,  $S_0 = 50\text{g/L}$ ,  $T = 37^\circ\text{C}$ , agitação de 150rpm,  $t_{ci} = 24\text{h}$ .**

Pode-se observar na Tabela 4.1 a influência do pH sobre o tempo de fase *lag* de processo, sendo este menor à medida que o pH aumenta. Porém, não há influência direta sobre o tempo de fase exponencial.

Os dados relatados por TEIXEIRA (1999) e por LUERCE (2002) mostram que o crescimento celular das bactérias é mais lento em pHs mais baixos, como observado neste trabalho. Nota-se também, que o fator de conversão de substrato em célula ( $Y_{X/S}$ ) apresenta um comportamento semelhante em todos os ensaios indicando que a rota metabólica é a mesma para os diferentes pHs.

Também pode ser observado na Tabela 4.1, que o fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) para o ensaio a pH inicial 5,5 foi o maior alcançado entre os ensaios realizados, 0,23g/g.

*Tabela 4.1: Parâmetros cinéticos e estequiométricos do teste de pH inicial à agitação de 150rpm,  $S_0 = 50\text{g/L}$ ,  $T = 37^\circ\text{C}$ ,  $t_{ci} = 24\text{h}$ .*

<b>pH</b>	$\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ ) fase exponencial	<b>X (g/L)</b> máxima	<b>S (g/L)</b> residual	<b>P (g/L)</b> máxima	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	$Y_{P/X}$ (g/g)
<b>4,5</b>	0,36	9,79	12,81	1,54	0,45	0,03	-
<b>5,0</b>	0,47	4,24	12,16	2,67	0,41	0,02	-
<b>5,5</b>	0,42	10,16	27,47	4,23	0,45	0,23	0,41

*Continuação da Tabela 4.1*

<b>pH</b>	$v_s$ (g/L.h) fase lag e exponencial	$v_s$ (g/L.h) fase estacionária	<b>tempo (h)</b> fase lag	<b>tempo (h)</b> fase exponencial
<b>4,5</b>	0,33	1,41	37	7
<b>5,0</b>	0,51	0,75	16	5
<b>5,5</b>	0,84	0,26	8	8

Pela Tabela 4.1, verifica-se que o pH apresenta uma influência sobre a velocidade de consumo de substrato nas fases *lag* e exponencial diretamente proporcional ao valor do pH, de forma que quanto maior o pH (5,5) maior a velocidade de consumo de



substrato (0,84g/L.h) nestas fases. E inversamente proporcional nas fases seguintes, sendo maior a velocidade de consumo (1,41g/L.h) no menor pH (4,5).

De fato, a produção de acetoína foi melhor a pH inicial 5,5, comprovando desta forma os resultados obtidos por LUERCE (2002), que atingiu uma concentração de acetoína de 3,07g/L, com um  $Y_{P/S} = 0,18\text{g/g}$ , valores um pouco inferiores aos obtidos neste trabalho: concentração de acetoína de 4,23g/L e  $Y_{P/S} = 0,23\text{g/g}$ .

Entretanto, não foi verificada no conjunto dos experimentos realizados uma dependência da produção de acetoína com a geração de células para ensaios em frascos agitados, como sugerido por LUERCE (2002), para experimentos em biorreator.

O acompanhamento do pH ao longo do processo realizado para os três ensaios mostrou uma tendência comum de abaixamento do pH a valores próximos a 4,2. Isto é devido à produção e eliminação de ácidos durante o crescimento do microrganismo.

#### ***4.2 Estudo do Efeito do Tempo de Cultivo do Inóculo***

Uma vez que a fase de adaptação dos microrganismos foi bastante longa nos testes anteriores, mesmo a pH 5,5, decidiu-se realizar testes de tempo de cultivo do inóculo, visando escolher a melhor fase de crescimento para a utilização do inóculo no caldo fermentativo.

Os testes anteriores seguiram condições de experimentos da literatura que indicaram um tempo de aproximadamente 24h para cultivo do inóculo. Os novos testes foram realizados utilizando as melhores condições de produção de acetoína obtidas nos testes de pH (pH = 5,5, 150rpm, T = 37°C, S<sub>0</sub> = 50g/L) e para os tempos de cultivo do inóculo de 20h e 17h.

##### ***4.2.1 Ensaio com tempo de cultivo do inóculo de 20h***

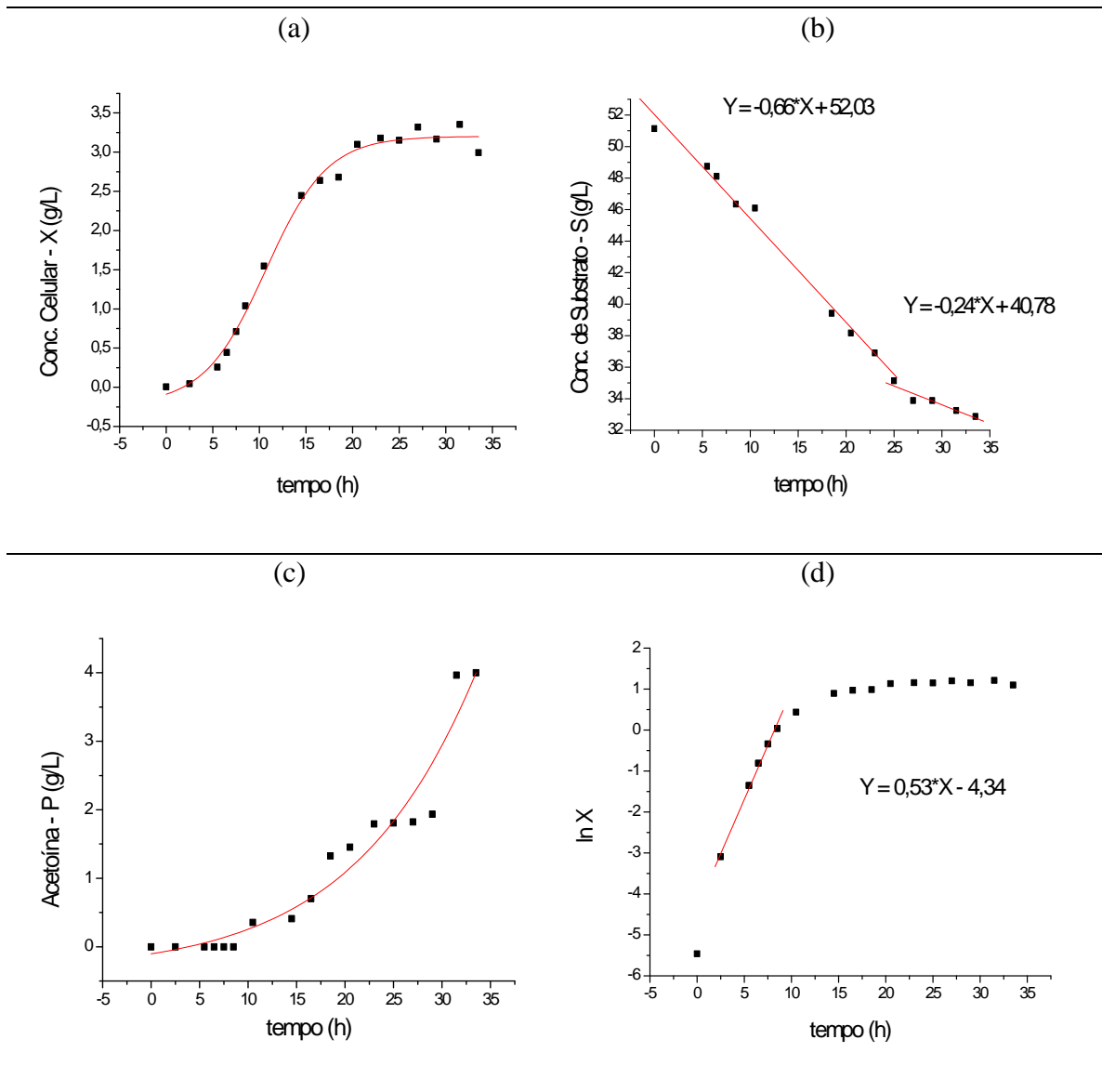
Diminuiu-se neste primeiro ensaio o tempo de incubação de 24 para 20h, de modo que este se encontre em final de fase exponencial de crescimento celular e não em

fase de desaceleração, como acontece quando o tempo de incubação é de 24h (LUERCE, 2002).

Verifica-se neste ensaio que existe uma influência positiva da diminuição do tempo de cultivo do inóculo sobre o processo, em especial na redução da fase *lag* de crescimento celular, como se observa na Figura 4.7(a), onde o tempo de adaptação é de aproximadamente 2,5h. Os ensaios realizados por LUERCE (2002), com um tempo de cultivo de 24h resultaram em uma fase *lag* de aproximadamente 7h, bem como neste trabalho (item 4.1.3).

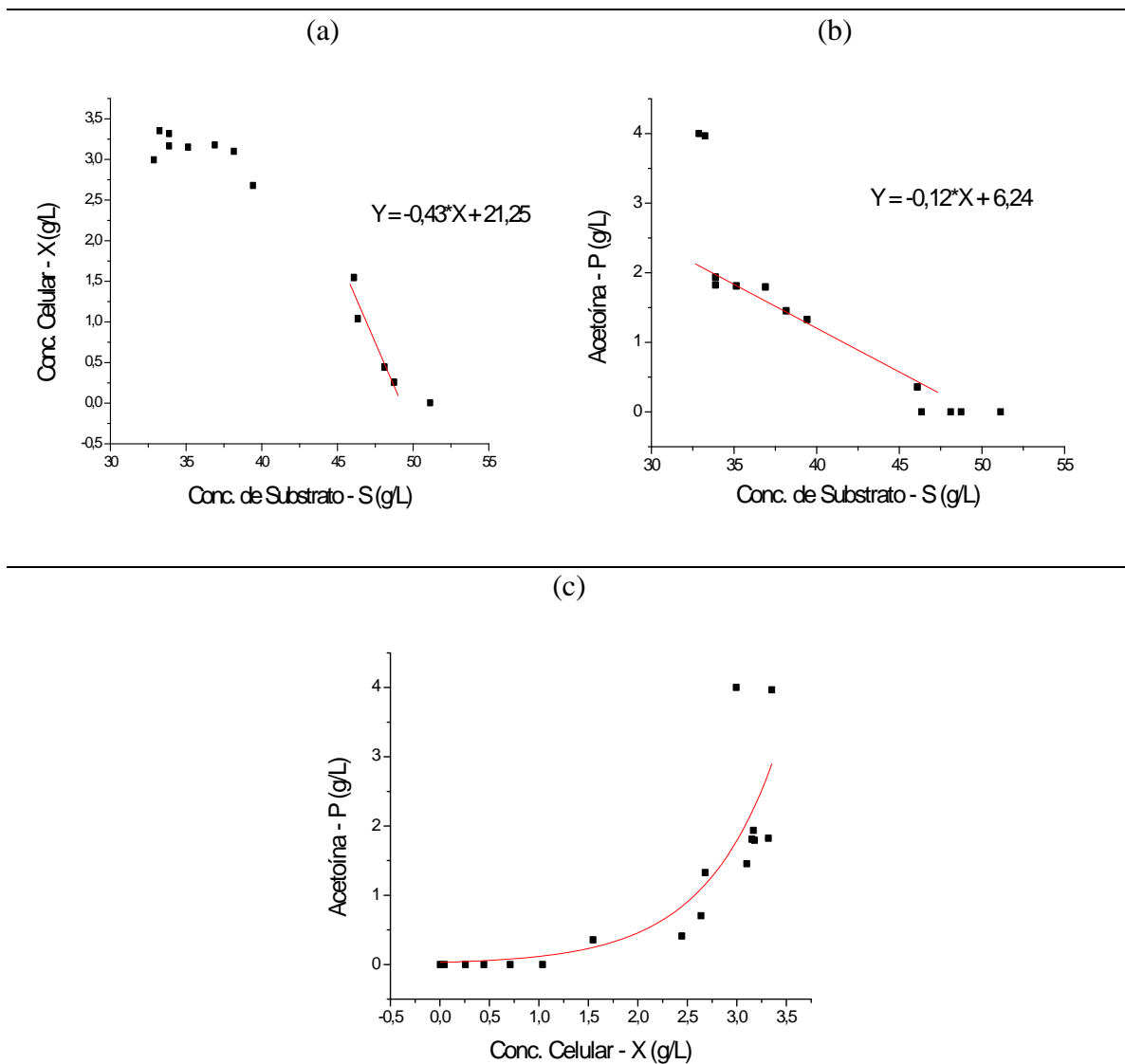
Nota-se que o maior consumo de substrato, consumo constante, ocorre durante as fases *lag*, exponencial e de desaceleração do crescimento celular, como mostra a Figura 4.7(b) de onde obtém-se uma velocidade de consumo de glicose de 0,66g/L.h, relativamente a produção de célula e de acetoína, contudo seu consumo não é total, pois se verifica que a concentração celular começa a diminuir a partir de 32h e a concentração de acetoína, após um ponto de máximo (3,97g/L), se estabiliza. Observa-se que este ponto de máximo ocorre num momento em que a geração de células já se encerrou e a velocidade de consumo de glicose passa a ser de 0,24g/L.h.

A Figura 4.7(c) indica que neste experimento a produção de acetoína só inicia ao término da fase exponencial, o que não foi observado em outros ensaios, fato que também foi observado por LUERCE (2002), sendo bem definida, como apresenta a Figura 4.7(d), de onde se obtém uma velocidade específica de crescimento, para esta fase, de  $0,53h^{-1}$ .



**Figura 4.7 - Comportamento dinâmico da concentração de células (a), da concentração de substrato (b), da concentração de acetoína (c) e do logaritmo da concentração de células (d) a pH inicial 5,5,  $S_0 = 50\text{g/L}$ ,  $T = 37^\circ\text{C}$ , agitação de 150rpm,  $t_{ci} = 20\text{h}$ .**

Pela Figura 4.8(a) é possível estabelecer uma relação entre o consumo de substrato e a geração de células, obtendo um fator de conversão  $Y_{X/S} = 0,43\text{g/g}$ , valor superior ao obtido por LUERCE (2002),  $0,17\text{g/g}$ . Contudo a velocidade específica  $\mu$  deste ensaio ( $0,53\text{h}^{-1}$ ) também apresentou maior valor que na referência ( $0,27\text{h}^{-1}$ ).



**Figura 4.8 – Comportamento estequiométrico da conversão de substrato em célula (a), de substrato em produto (b) e de célula em produto (c) a pH inicial 5,5,  $S_0 = 50\text{g/L}$ ,  $T = 37^\circ\text{C}$ , agitação de 150rpm,  $t_{ci} = 20\text{h}$ .**

Na Figura 4.8(b), pode-se verificar que apenas 50% da acetoina produzida apresenta relação direta com o maior consumo de glicose (aproximadamente entre 35 e 45g/L de substrato), apresentando um fator de conversão  $Y_{P/S} = 0,12\text{g/g}$ , sendo o restante produzido durante um consumo mínimo de substrato. Observando a Figura 4.8(c), nota-se que durante a maior produção de acetoina não há aumento da massa celular.

A Figura 4.8(c) mostra que não existe uma relação linear entre a geração de células e a produção de acetoína durante todo processo, pois tem-se uma produção elevada de acetoína num período em que a concentração celular está praticamente estável ( $X > 3\text{g/L}$ ) e uma pequena produção no período em que ocorre crescimento celular.

#### 4.2.2 Ensaio com tempo de cultivo do inóculo de 17h

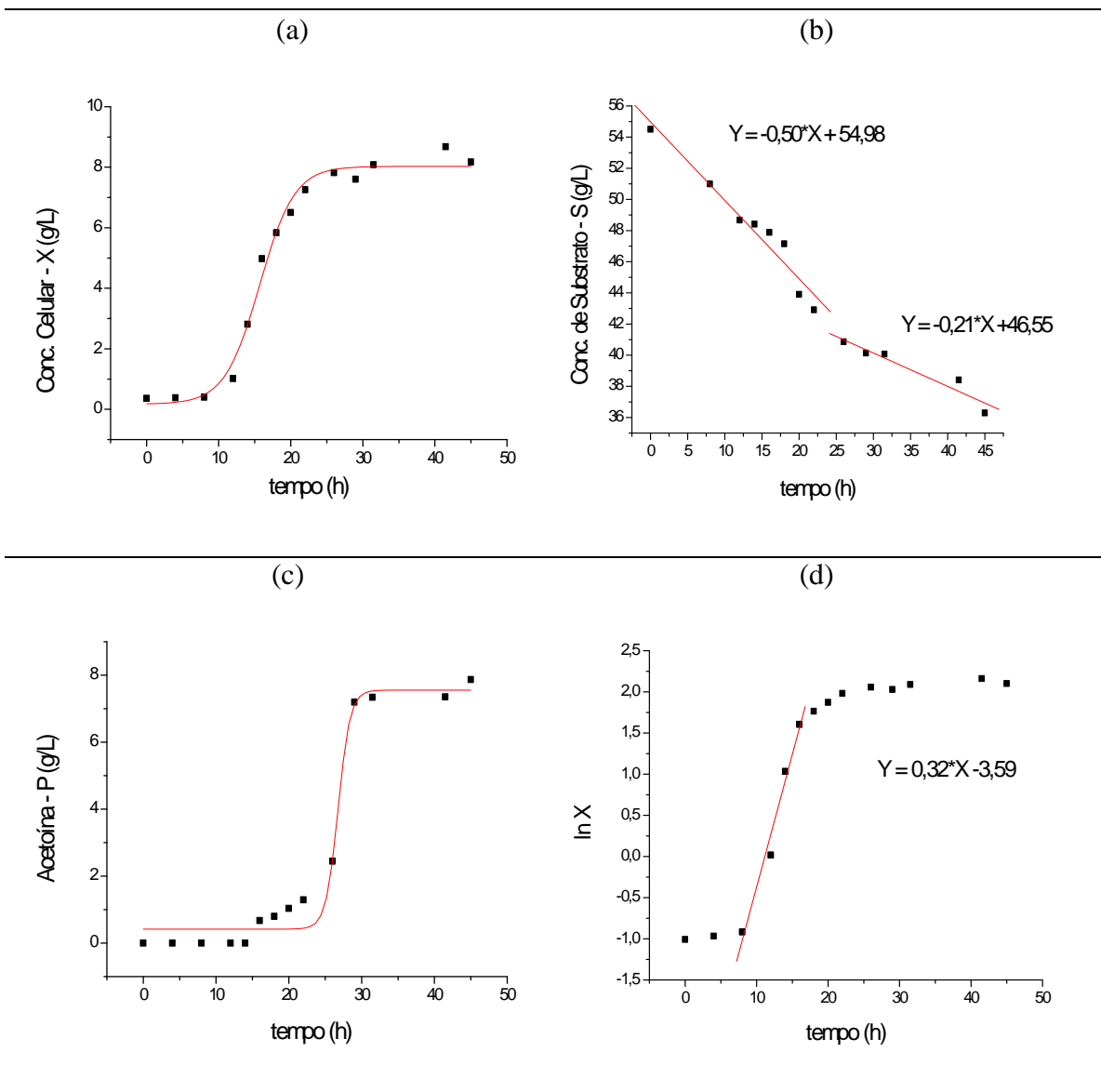
Neste ensaio o tempo de cultivo escolhido foi o de 17h, estando neste caso o inóculo em plena fase exponencial de crescimento celular.

Observa-se na Figura 4.9(a) um pequeno aumento do tempo de fase *lag*, ficando esta em torno de 8h. Não ocorre aqui também consumo total da concentração de substrato, como mostra a Figura 4.9(b). A produção de acetoína tem início durante a fase exponencial de crescimento celular como se pode perceber pela Figura 4.9(c).

As velocidades de consumo de substrato obtidas através da Figura 4.9(b), indicam um maior consumo de glicose ( $0,50\text{g/L.h}$ ) para a adaptação, crescimento exponencial e desaceleração do crescimento do microrganismo (aproximadamente 22h), e um menor consumo para a produção de acetoína ( $0,21\text{g/L.h}$ ), na fase estacionária.

Comparado ao ensaio anterior, com tempo de cultivo do inóculo de 20h, a velocidade específica de crescimento celular não é tão pronunciada, apresentando um valor de  $0,32\text{h}^{-1}$ , como mostra a Figura 4.9(d); contudo, a produção celular é elevada, atingido a concentração de  $8,67\text{g/L}$ .

A Figura 4.10(b) nos fornece um fator de conversão de substrato em produto não tão elevado, apresentando um valor de  $0,21\text{g/g}$ , indicando que no momento em que não ocorre geração de células o substrato é direcionado para a produção de acetoína. O que pode ser confirmado pelo grande acúmulo de acetoína verificado entre 26 e 29h (Figura 4.9(c)).



**Figura 4.9 - Comportamento dinâmico da concentração de células (a), da concentração de substrato (b), da concentração de acetoina (c) e do logaritmo da concentração de células (d) a pH inicial 5,5,  $S_0 = 50\text{g/L}$ ,  $T = 37^\circ\text{C}$ , agitação de 150rpm,  $t_{ci} = 17\text{h}$ .**

Nota-se pela Figura 4.10(a), que o fator de conversão de substrato em célula determinado para o período a partir da fase exponencial até o término do ensaio, não é tão elevado,  $Y_{X/S} = 0,39\text{g/g}$ . O que é confirmado pela queda na velocidade de consumo de substrato, verificada na Figura 4.9(d) entre a fase de desaceleração e a fase estacionária, para  $0,21\text{g/L.h}$ . Observa-se neste período a parada de crescimento celular.

Verifica-se neste ensaio também que não existe uma relação direta entre a produção celular e a produção de acetoína, apesar do produto só ser formado a partir do acúmulo de células, como mostra a Figura 4.10(c). Entretanto, há maior produção de acetoína na fase estacionária quando já não existe mais crescimento celular.

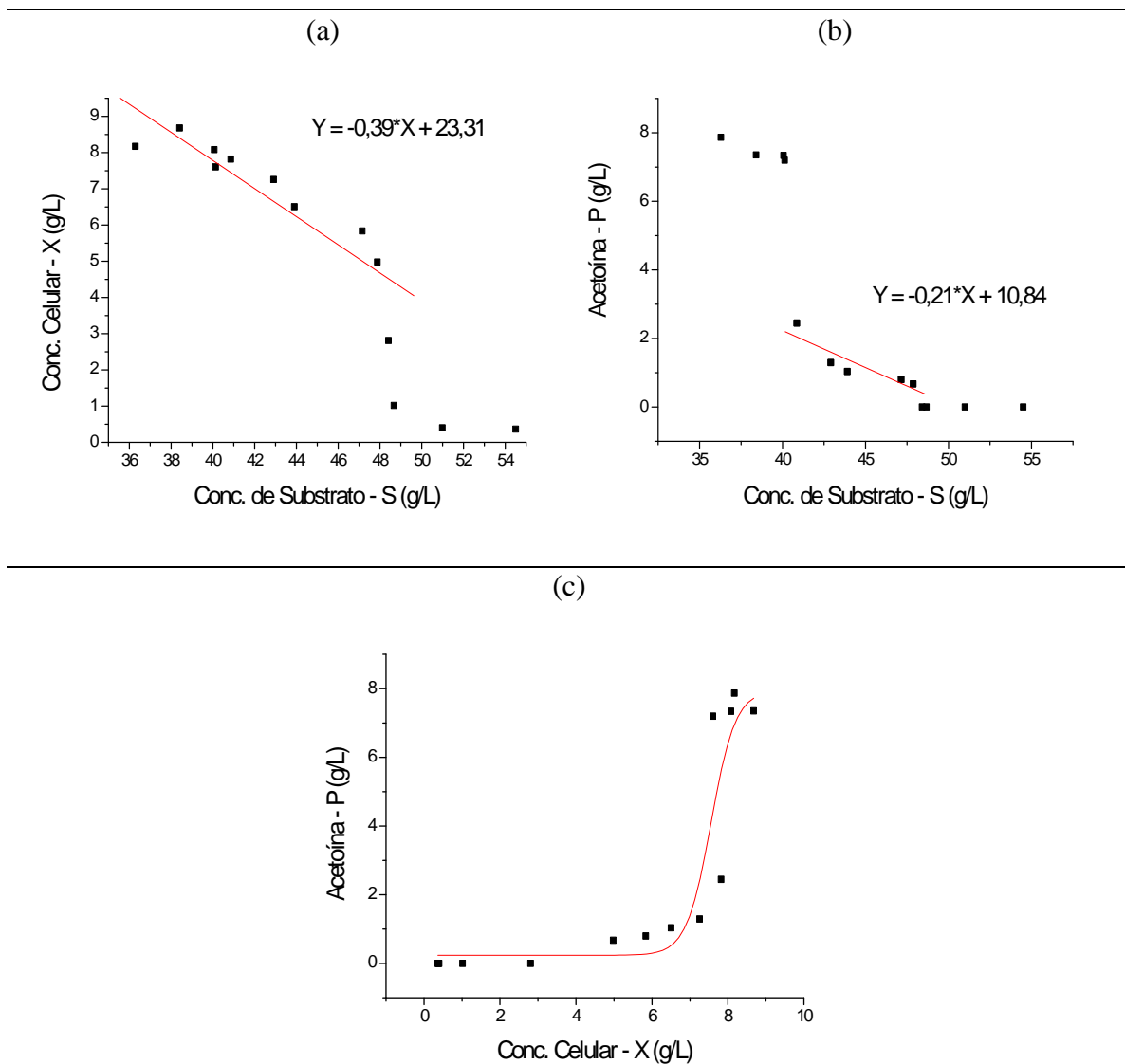


Figura 4.10 – Comportamento estequiométrico da conversão de substrato em célula (a), de substrato em produto (b) e de célula em produto (c) a pH inicial 5,5,  $S_0 = 50\text{g/L}$ ,  $T = 37^\circ\text{C}$ , agitação de 150rpm,  $t_{ci} = 17\text{h}$ .

Pode-se observar na Tabela 4.2, que a alteração do tempo de cultivo do inóculo ( $t_{ci}$ ) não apresentou influência sobre o valor da velocidade específica de crescimento celular para a fase exponencial, ficando estes valores pouco acima do obtido por LUERCE (2002) ( $0,27h^{-1}$ ), com um valor médio de  $0,42h^{-1}$ . Porém, observa-se que para a maior velocidade específica ( $\mu = 0,53h^{-1}$ ,  $t_{ci} = 20h$ ) o tempo de duração da fase exponencial é menor que para os outros ensaios, tendo uma duração de aproximadamente 6h. Fato este verificado no ensaio a pH inicial 5,0 (item 4.1.2), que apresentou  $\mu = 0,47h^{-1}$  durante aproximadamente 5h, e conseqüentemente, produzindo uma concentração celular bem menor que outros ensaios, como mostram as Tabelas 4.1 e 4.2.

Também se observa na Tabela 4.2, que quanto menor o tempo de cultivo do inóculo, menor é o consumo de substrato, restando maior concentração de carbono residual no meio. Contudo verifica-se que há uma alta concentração de acetoina produzida ( $7,87g/L$ ) para o ensaio com menor tempo de cultivo de inóculo (17h). O maior valor obtido em ensaios realizados em frascos agitados, indicando um alto rendimento em produto do processo.

*Tabela 4.2: Parâmetros cinéticos e estequiométricos para o Teste de Tempo de cultivo do Inóculo a pH = 5,5,  $S_0 = 50g/L$ ,  $T = 37^\circ C$ , agitação de 150rpm.*

$t_{ci}$ (h)	$\mu$ ( $h^{-1}$ ) fase exponencial	X (g/L) máxima	S (g/L) Residual	P (g/L) máxima	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	$Y_{P/X}$ (g/g)
24	0,42	10,16	27,47	4,23	0,45	0,23	0,41
20	0,53	3,35	32,87	4,0	0,43	0,12	-
17	0,32	8,67	36,29	7,87	0,39	0,21	-

*Continuação da Tabela 4.2*

$t_{ci}$ (h)	$v_s$ (g/L.h) fase lag à desaceleração	$v_s$ (g/L.h) fase estacionária	tempo (h) fase lag	tempo (h) fase exponencial
24	0,84	0,26	8	8
20	0,66	0,24	2,5	6
17	0,50	0,21	8	8



Nota-se pelos valores dos fatores de conversão de substrato em célula ( $Y_{X/S} = 0,42\text{g/g}$ , média), que este sofre uma pequena diminuição com a redução do tempo de cultivo do inóculo, e, portanto, a rota metabólica também não se altera com esta mudança de tempo de cultivo do inóculo.

Verifica-se também que a velocidade de consumo de substrato apresenta uma certa dependência com o tempo de cultivo do inóculo, uma vez que observa-se uma redução destas velocidades diretamente proporcional à redução do tempo de cultivo do inóculo.

### ***4.3 Teste de concentração de glicose a diferentes $t_{ci}$***

Observando a alta concentração de substrato residual dos ensaios anteriores, realizados com concentração de glicose de 50g/L, apesar de em alguns testes o consumo ter sido elevado, como nos testes a pHs mais baixos (ítems 4.1.1 e 4.1.2), decidiu-se neste ensaio reduzir a concentração de substrato buscando verificar se seu consumo pode ser total e a produção de acetoína aumentar. Assim, optou-se pela concentração de glicose de 30g/L a diferentes tempos de cultivo do inóculo (20 e 17h).

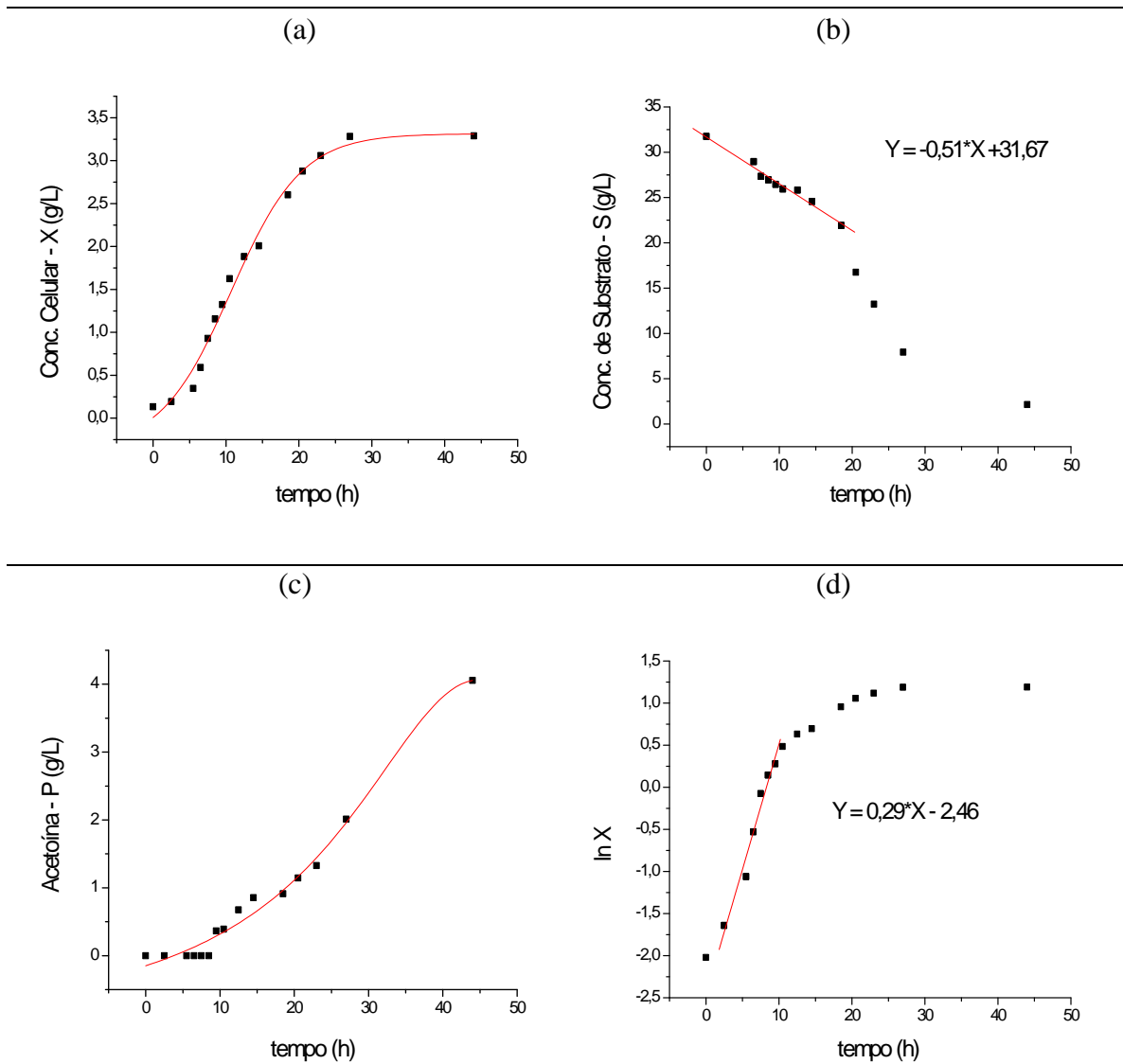
#### ***4.3.1 Ensaio a 30g/L e tempo de cultivo de 20h***

Tendo LUERCE (2002) realizado ensaios com concentração de substrato de 30g/L e com tempo de cultivo de inóculo de 24h, decidiu-se neste ensaio diminuir o tempo de cultivo para 20h.

As Figuras 4.11(a), 4.11(b) e 4.11(c), mostram que há também para este experimento uma sensível redução do tempo de fase *lag* de crescimento celular, ficando este valor em torno de 3h.

Observa-se na Figura 4.11(b) que o comportamento do consumo de substrato é semelhante proporcionalmente ao verificado nos primeiros ensaios, ou seja, ocorre um elevado consumo de glicose nas fases *lag*, exponencial e de desaceleração de crescimento celular, como indica a velocidade de consumo de substrato para este período

(0,51g/L.h). Após o período de consumo constante, a velocidade de consumo diminui gradativamente sendo o substrato quase todo consumido neste ensaio, restando cerca de 2,5g/L.



**Figura 4.11 - Comportamento dinâmico da concentração de células (a), da concentração de substrato (b), da concentração de acetoína (c) e do logaritmo da concentração de células (d) a pH inicial 5,5,  $S_0 = 30\text{g/L}$ ,  $T = 37^\circ\text{C}$ , agitação de 150rpm,  $t_{ci} = 20\text{h}$ .**

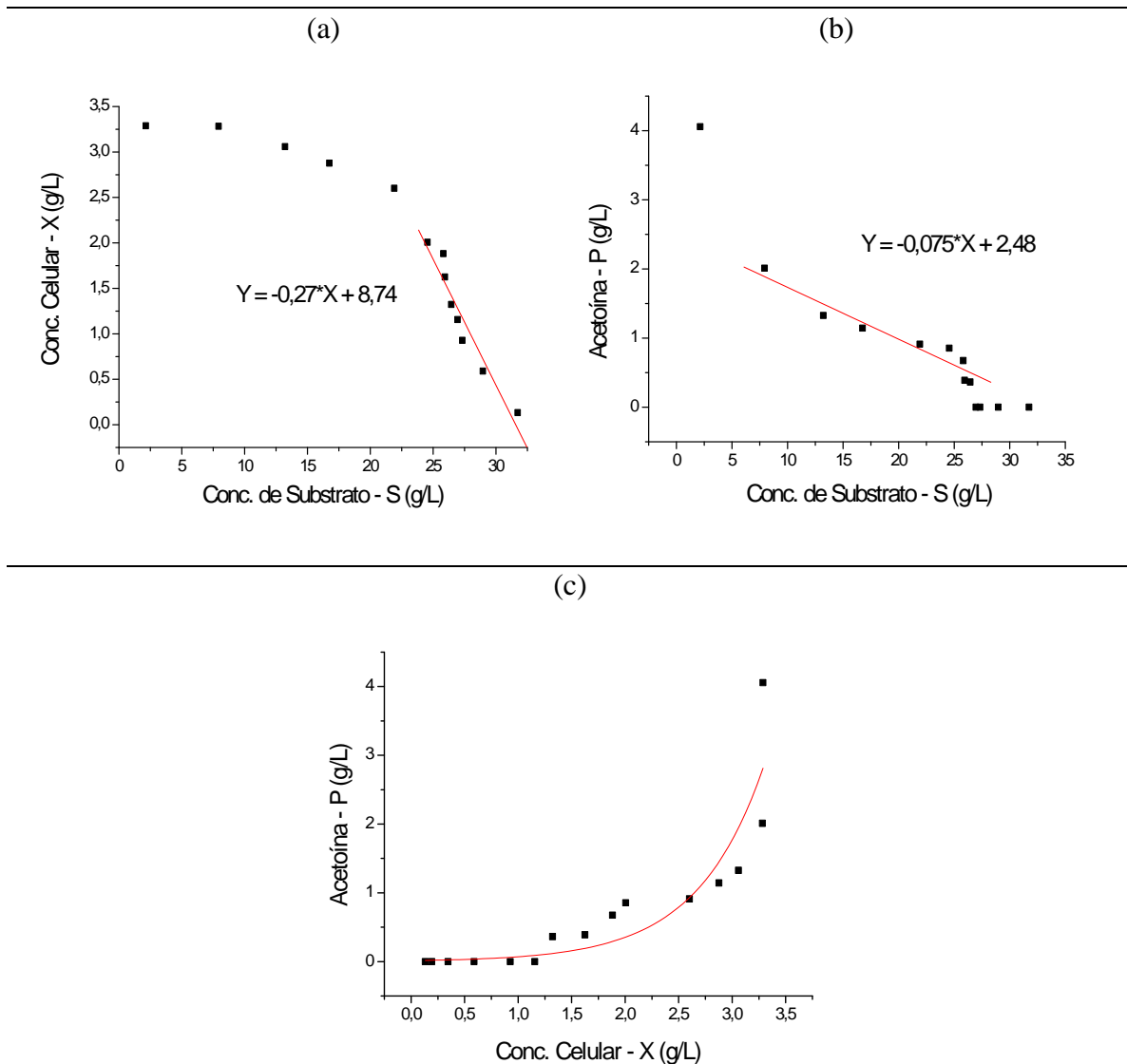
A concentração celular atinge um valor máximo de 3,8g/L e se estabiliza, não havendo mais crescimento, como mostra a Figura 4.11(a). A Figura 4.11(c) nos mostra que a produção de acetoína só tem início no final da fase exponencial, sendo contínua até o encerramento do processo atingindo o valor de 4,06g/L.

A fase exponencial, que possui uma duração de aproximadamente 7h, como mostra a Figura 4.11(d) determina um valor de  $0,29\text{h}^{-1}$  para a velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ).

Verifica-se na Figura 4.12(a), que o crescimento celular apresenta comportamentos distintos, em relação ao consumo de substrato, em dois períodos do processo. O primeiro durante as 20h iniciais, que inclui a fase *lag*, a fase exponencial, a fase de desaceleração e início da fase estacionária do crescimento celular, onde se verifica um valor para o fator de conversão de substrato em célula de 0,27g/g; e o segundo no tempo complementar, onde a geração de células é reduzida, apesar do consumo de substrato existir. Fato que explica a baixa concentração celular atingida

A Figura 4.12(b) mostra a conversão de substrato em produto indicando que a maior produção de acetoína ocorre com um pequeno consumo de glicose, pois verifica-se que no intervalo em que a concentração de acetoína dobra a concentração de substrato diminui pouco; enquanto que no período de maior consumo de substrato o valor do fator de conversão  $Y_{P/S}$  é de 0,075g/g, implicando na baixa concentração de produto alcançada nesta etapa.

Através da Figura 4.12(c), pode-se verificar, inicialmente, que a produção de acetoína tem aumento com a geração de células, contudo, quando a concentração de células se estabiliza, a concentração de acetoína dobra de quantidade. Assim, não é possível se estabelecer uma relação de dependência entre a geração de célula e a produção de acetoína, como já verificado em outros ensaios.



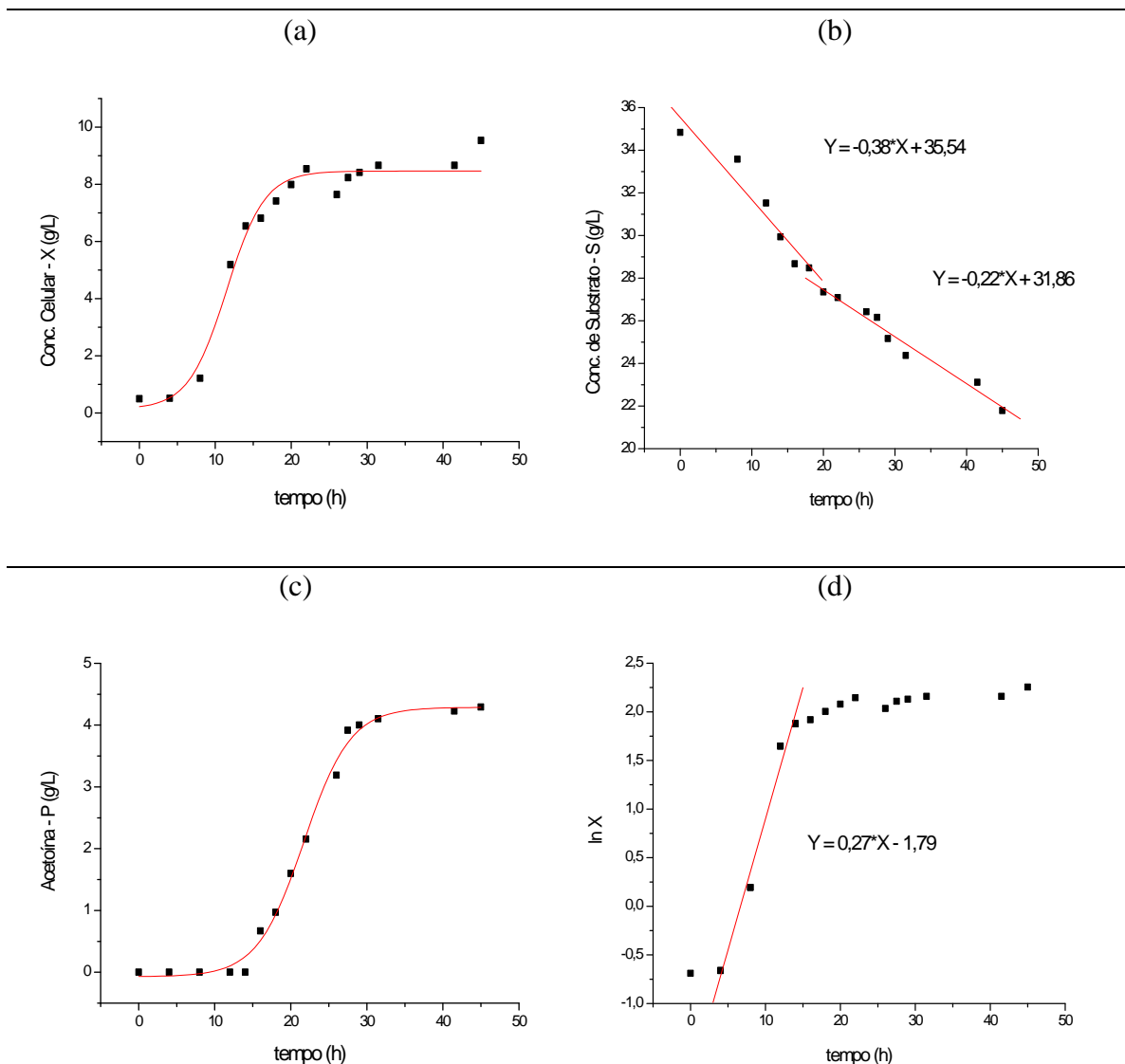
**Figura 4.12 – Comportamento estequiométrico da conversão de substrato em célula (a), de substrato em produto (b) e de célula em produto (c) a pH inicial 5,5,  $S_0 = 30\text{g/L}$ ,  $T = 37^\circ\text{C}$ , agitação de 150rpm,  $t_{ci} = 20\text{h}$ .**

#### 4.3.2 Ensaio a 30g/L e tempo de cultivo de 17h

Tendo em vista que no ensaio a concentração de glicose de 50g/L e com tempo de cultivo de 17h (item 4.2.2) obteve-se a maior concentração de acetoina, optou-se neste ensaio por este tempo de cultivo para o inóculo.

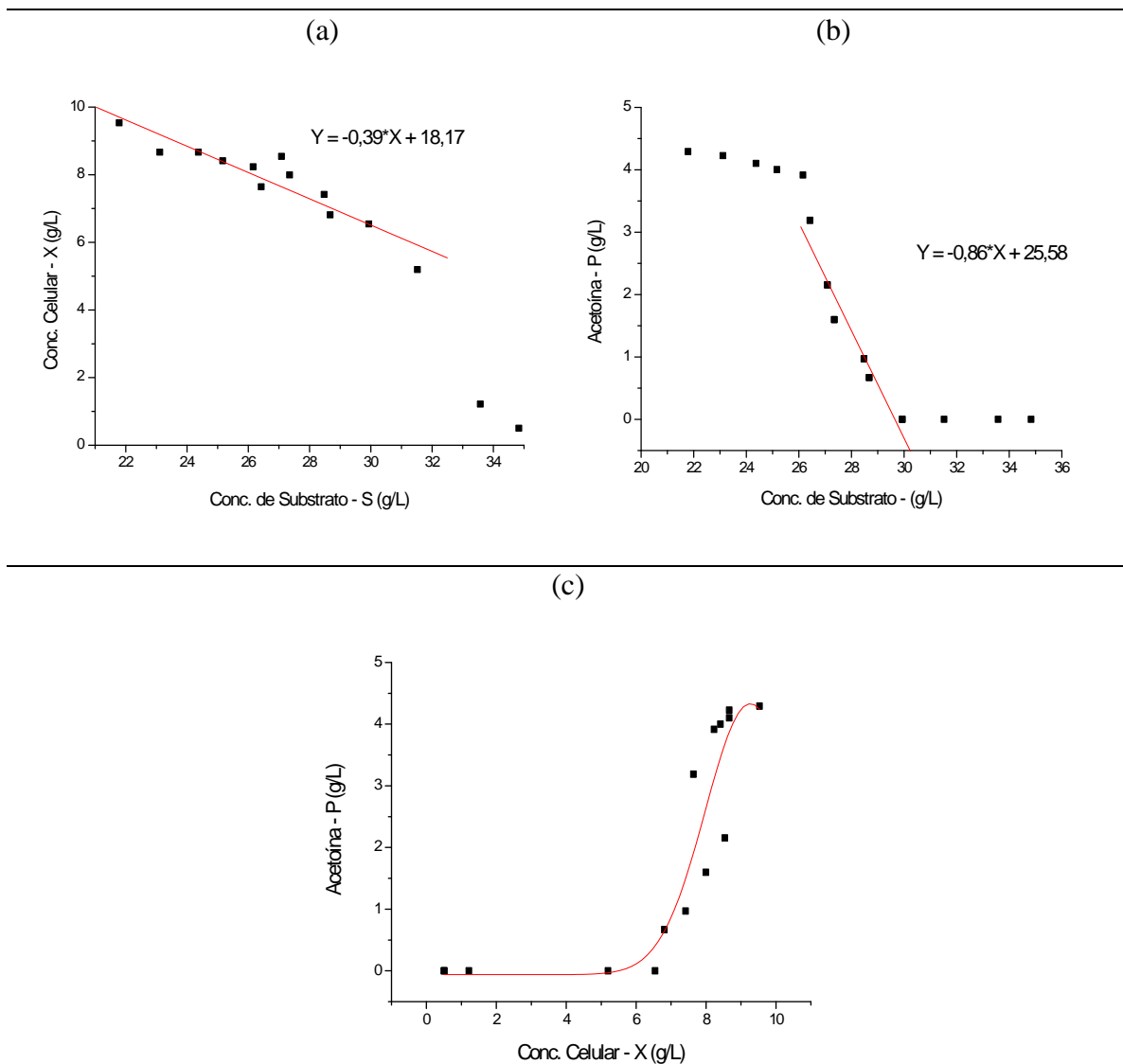
A Figura 4.13(a) nos mostra que há neste experimento um pequeno aumento da fase *lag* em relação ao teste realizado com um inóculo de 20h de cultivo (item 4.3.1),

apresentando um valor de aproximadamente 4h. Porém a concentração celular atingida foi muito superior, chegando a 9,5g/L de células. O consumo de substrato não foi tão elevado quanto no ensaio anterior, como mostra a Figura 4.13(b), onde verifica-se que a velocidade de consumo de substrato constante apresenta valores baixos tanto para o período das fases lag, exponencial e desaceleração (0,38g/L.h), quanto para a fase estacionária (0,22g/L.h.).



**Figura 4.13 - Comportamento dinâmico da concentração de células (a), da concentração de substrato (b), da concentração de acetoina (c) e do logaritmo da concentração de células (d) a pH inicial 5,5,  $S_0 = 30\text{g/L}$ ,  $T = 37^\circ\text{C}$ , agitação de 150rpm,  $t_{ci} = 17\text{h}$ .**

Observa-se na Figura 4.13(d), que a velocidade específica de crescimento celular não se diferencia da obtida anteriormente, sendo  $\mu = 0,27h^{-1}$ , apresentando uma fase exponencial bem definida e de longa duração, aproximadamente 10h. Através da Figura 4.13(c) verificamos que a produção de acetoina tem início ao final da fase exponencial, prosseguindo durante todo o período posterior e atingindo o valor máximo de 4,29g/L.



**Figura 4.14 – Comportamento estequiométrico da conversão de substrato em célula (a), de substrato em produto (b) e de célula em produto (c) a pH inicial 5,5,  $S_0 = 30g/L$ ,  $T = 37^\circ C$ , agitação de 150rpm,  $t_{ci} = 17h$ .**

A Figura 4.14(a) mostra uma relação muito estreita entre a geração de células e o consumo de glicose a partir da fase exponencial, apresentando um fator de conversão  $Y_{X/S} = 0,39\text{g/g}$ , levando em consideração a concentração celular atingida ( $9,5\text{g/L}$ ) e o tempo de fase exponencial.

A Figura 4.14(b) também nos revela um alto fator de conversão de substrato em produto,  $Y_{P/S} = 0,86\text{g/g}$ , porém os níveis atingidos de acetoina não são muito superiores aos do ensaio anterior, ficando a concentração máxima em  $4,30\text{g/L}$ .

Percebe-se na Figura 4.14(c) que também neste ensaio a relação entre a geração de células e a produção de acetoina não existe, como verificado em outros testes, apesar da figura mostrar que a concentração de produto tende a aumentar com a geração de célula. É possível notar, nas últimas horas de processo, que mesmo com a tendência de aumento da concentração celular a concentração de acetoina se estabilizou.

A Tabela 4.3 nos mostra que não existe uma influência da mudança do tempo de cultivo do inóculo na velocidade específica de crescimento celular da fase exponencial ( $\mu$ ), apesar de uma pequena redução neste valor com a redução do tempo de cultivo; e também uma vez que os valores obtidos neste trabalho são próximos ao obtido por LUERCE (2002) ( $0,23\text{h}^{-1}$ ).

Contudo, avaliando o tempo de fase exponencial dos ensaios, neste trabalho 7h (item 4.3.1) e 10h (item 4.3.2) e em LUERCE (2002) 4h, constata-se que pode existir uma influência do tempo de cultivo do inóculo nesta fase do crescimento, determinando as altas concentrações celulares obtidas nos ensaios aqui realizados devido ao maior tempo de fase exponencial.

Apesar das concentrações celulares maiores que as obtidas por LUERCE (2002), principalmente no ensaio com  $t_{ci} = 17\text{h}$  ( $X = 9,53\text{g/L}$ ) e seus altos fatores de conversão, verifica-se que as concentrações de acetoina produzidas não são tão elevadas quanto à alcançada no ensaio com concentração de substrato inicial  $50\text{g/L}$  ( $7,87\text{g/L}$  – item 4.2.2).

Observa-se que para o ensaio a tempo de cultivo do inóculo de 20h, as concentrações celulares são menores apesar do alto consumo de substrato. Esse fato indica que tanto células quanto substrato poderiam estar sendo direcionados para a produção de outro metabólito, como etanol, diacetil ou acetato de etila, não avaliado no presente trabalho, principalmente durante as fases iniciais do crescimento celular onde se pode verificar consumo constante de substrato a uma velocidade de 0,51g/L.h, bem como pelo baixo fator de conversão de substrato em produto (acetoína).

*Tabela 4.3: Parâmetros cinéticos e estequiométricos para o Teste de Concentração de Substrato a diferentes  $t_{ci}$  a  $pH = 5,5$ ,  $S_0 = 30g/L$ ,  $T = 37^\circ C$ , agitação de 150rpm .*

$t_{ci}$ (h)	$\mu$ ( $h^{-1}$ ) fase exponencial	X (g/L) máxima	S (g/L) residual	P (g/L) máxima	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	$Y_{P/X}$ (g/g)
20	0,29	3,29	2,14	4,06	0,27	0,075	-
17	0,27	9,53	21,79	4,30	0,39	0,86	-
24*	0,23	1,17	21	2,33	-	0,33	-

**\*Dados obtidos por LUERCE (2002).**

*Continuação da Tabela 4.3*

$t_{ci}$ (h)	$v_s$ (g/L.h) fase lag à desaceleração	$v_s$ (g/L.h) fase estacionária	tempo (h) fase lag	tempo (h) fase exponencial
20	0,51	-	4	10
17	0,38	0,22	2,5	7

Comparando as Tabelas 4.2 e 4.3, verifica-se que a redução da concentração de substrato tem influência sobre a velocidade específica de crescimento celular da fase exponencial, diminuindo seu valor, porém não se percebe efeito sobre a produção células, uma vez que as concentrações celulares atingidas apresentam valores próximos.

Também não se pode afirmar que exista influência da diminuição da concentração de glicose sobre o tempo de fase exponencial, contudo verifica-se redução da fase lag de processo.



Entretanto, para os testes realizados com tempo de cultivo de 17h, verifica-se nas tabelas que o consumo de glicose é bem menor, restando fonte de carbono residual em alta concentração, porém as concentrações celulares são mais altas (8,67 e 9,53g/L, Tabelas 4.2 e 4.3), e as concentrações de acetoína obtidas no ensaio com 50g/L de glicose são bem superiores (7,87g/L) às obtidas no ensaio a 30g/L de glicose (4,3g/L).

Também constata-se que existe uma redução na velocidade de consumo de substrato com a redução da concentração inicial de glicose.

# *CONCLUSÕES*

## 5. CONCLUSÕES

A partir do estudo da influência da concentração inicial de Glicose, pH inicial do meio e tempo de cultivo do inóculo na produção de acetoína pela bactéria *Bacillus polymyxa*, foram identificados parâmetros e respostas dos sistemas que são importantes para a viabilização tecnológica do processo em estudo, chegando-se às seguintes conclusões:

➤ A fase de adaptação (ou *lag*) mostrou ser bastante influenciada pelo pH inicial de cultivo. As células necessitam de um tempo para adaptar-se as condições de pH diferentes da do inóculo. O tempo de fase *lag* variou de 37h, para pH = 4,5, até 8h para pH 5,5. Não foi possível concluir nenhuma tendência de alteração da fase *lag* variando-se o tempo de cultivo do inóculo ou a concentração de substrato.

➤ Apesar de erros envolvidos na obtenção da velocidade específica de crescimento celular da fase exponencial ( $\mu$  - utilização de derivadas com poucos pontos experimentais), a velocidade específica não variou de maneira expressiva, apresentando valores médios de  $0,42\text{h}^{-1}$ .

➤ A velocidade de consumo de glicose é constante durante dois períodos do cultivo. Em geral o primeiro período envolve as fases *lag*, exponencial e de desaceleração e o segundo período a fase estacionária. A velocidade de consumo de substrato para o primeiro período aumenta com o aumento do pH, variando de  $0,33\text{g/L.h}$ , para pH = 4,5, a  $0,84\text{g/L.h}$ , para pH = 5,5. A variação é inversa para o segundo período, variando de  $1,23\text{g/L.h}$ , a pH = 4,5, para  $0,27\text{g/L.h}$  a pH = 5,5.

➤ Em alguns cultivos notou-se substrato residual na fase estacionária, indicando uma inibição que não foi identificada. Nesses experimentos a concentração final de células foi bem menor que o esperado.

➤ O fator de conversão de substrato em célula apresentou um valor próximo para a maioria dos ensaios realizados, em média  $Y_{X/S} = 0,43\text{g/g}$ . Logo, a alteração no pH ou no inóculo não altera a via metabólica do crescimento.

➤ A produção de acetoína inicia-se durante a fase exponencial de crescimento, mostrando que o crescimento celular é o responsável pelo início do acúmulo de acetoína. Porém, a produção de acetoína continua na fase estacionária, indicando que sua produção não está diretamente ligada ao crescimento. Não foi possível assim obter uma relação entre a geração de células e a produção de acetoína ( $Y_{P/X}$ ).

➤ Para as fases exponencial, de desaceleração e início da estacionária é possível obter um fator de conversão de glicose em acetoína ( $Y_{P/S}$ ) cujo valor máximo é obtido também para  $\text{pH} = 5,5$ . Para  $\text{pH}$ 's menores a conversão de glicose em acetoína é desprezível.

➤ O tempo de cultivo do inóculo não apresentou variações apreciáveis nos parâmetros cinéticos e estequiométricos de crescimento celular. Assim, o tempo de cultivo do inóculo pode ser diminuído, aumentando-se a produtividade do processo.

➤ A diminuição do tempo de cultivo do inóculo diminui o aproveitamento de substrato, porém, favorece o acúmulo de acetoína no sistema.

➤ A concentração de acetoína apresentou seu máximo para o pH inicial mais alto estudado (5,5). Baseando-se também em resultados da literatura, pode-se concluir que o pH inicial 5,5 otimiza a concentração obtida de acetoína, que neste trabalho chegou a atingir 7,8g/L.

➤ Portanto, chega-se aos seguintes parâmetros para otimização da concentração de acetoína: temperatura de 37°C, concentração de glicose de 50g/L, pH 5,5 e inóculo em fase exponencial de crescimento (tempo de cultivo de aproximadamente 17h).

# *SUGESTÕES*

## 6. SUGESTÕES

De posse dos resultados obtidos com a realização deste trabalho, são apresentadas algumas sugestões para futuros trabalhos referentes a acetoína e ao *Bacillus polymyxa*:

- Confirmar os resultados obtidos em frascos agitados para o processo em biorreator, que tem capacidade maior de controle das variáveis envolvidas.
- Realização de ensaios separados em duas etapas: uma de crescimento celular e uma de produção de acetoína, uma vez que foi detectado neste trabalho que pode haver grande produção de acetoína na fase estacionária.
- Realizar a dosagem de outros compostos formados durante o cultivo, etanol, acetato de etila, 2,3-butanodiol, a fim de verificar se a sua produção pode inibir a formação de acetoína e fechar o balanço de massa para o carbono.
- Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $K_La$ ) e estudar sua influência na produção de acetoína, tendo em vista que a aeração é um parâmetro de grande importância na produção de acetoína.

## *REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BADINO JR., A. C.. Tipos de Fermentação. **Apostila do Curso *Fermentation Technology* – Módulo II (Fermentação por Fungos Filamentosos)**. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, 2000.

BERGER, R. G.. **Aroma Biotechnology**. Ed. Springer – Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 24 Op, 1995. **Apud** TEIXEIRA, R. M. Otimização das Condições de Cultura para a Produção de Acetoína por *Hanseniaspora guilliermondii*. **Dissertação de Mestrado (Engenharia Química)**. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, 1999.

BIO LAND – Características del NUTRI-COMPOST™. Disponível em: <<http://www.red6.org/~bioland/nutricompoust-mo.htm>>. Acesso em 18 de março de 2004.

CAÑAS, A.; OWENS, J. D.. Acetoin production in growing *Leuconostoc mesenteroids*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 15:339-344, 1999.

CARVALHO, J. C.. Produção de Diacetil e Acetoína: desenvolvimento de um meio de cultivo e avaliação dos fatores que alteram o crescimento de *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* biovar. *Diacetlactis*. **Dissertação de Mestrado (Engenharia Química)**. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, 1999.

CHEETHAM, P. S. J.. **The use of biotransformations for the production of flavours and fragrances**. Trends in Biotechnology, 11: 478-488, 1993. **Apud** TEIXEIRA, R. M. Otimização das Condições de Cultura para a Produção de Acetoína por *Hanseniaspora guilliermondii*. **Dissertação de Mestrado (Engenharia Química)**. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, 1999.

COLLINS, E.. Biosynthesis of flavour compounds by microorganisms. **Journal of Dairy Science**, 55(7): 1022-1028, 1972. **Apud** TEIXEIRA, R. M. Otimização das Condições de Cultura para a Produção de Acetoína por *Hanseniaspora guilliermondii*. **Dissertação de Mestrado (Engenharia Química)**. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, 1999.

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

FABRE, C. E.; DUVIAU, BLANC, P. J.; GOMA, G.. Identification of Volatile Flavour Compounds Obtained in Culture of *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology Letters**, 17: 1207-1212, 1995. **Apud** MORITZ, D. E.. Estudo do Crescimento de Três Leveduras Produtoras de Aromas. **Dissertação de Mestrado (Biotecnologia)**. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, 1998.



FABRE, C. E.. Nouveaux Procèdes de Production D’Aromes Natureles par Bioconversion. **These de Doctorat (Biologie et genetique moleculaires et cellulaires – Biotechnologie)**. Toulouse: L’Institute National des Sciences Apliquées de Toulouse. Toulouse , França. 1996.

FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. C.. **Food Microbiology**. Thirrd Edition, McGraw-Hill Book Company, 1979. **Apud** MORITZ, D. E.. Estudo do Crescimento de Três Leveduras Produtoras de Aromas. **Dissertação de Mestrado (Biociencia)**. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, 1998.

GERHARDT, R.. **Indústria de alimentos sofisticada produção de aromas**. Disponível em: < <http://www.bevtech.com.br/noticias/n42.htm>>. Acesso em 12 de novembro de 2004.

JANSEN, N. B.; FLICKINGER, M. C.; TSAO, G. T.. Production of 2,3-butanediol from D-Xilose by *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724. **Biotechnology and Bioengineering**, 26: 362-369, 1983.

LERAYER, A.. Biotecnologia na Indústria de Alimentos. Disponível em: <[http://www.cib.org.br/apresentacao/texto\\_alda\\_lerayer.pdf](http://www.cib.org.br/apresentacao/texto_alda_lerayer.pdf)> Acesso em 10 de novembro de 2004.

LERCH, K.; SCHILLING, B.. **Towards applying molecular genetics for natural flavors**. In 12<sup>th</sup>. International Congress of Flavours, Fragrances and Essential Oils. Vienna, Áustria, 4-5 Octobre. 1992. pp 157-163. **Apud** FABRE, C. E.. Nouveaux Procèdes de Production D’Aromes Natureles par Bioconversion. **These de Doctorat (Biologie et genetique moleculaires et cellulaires – Biotechnologie)**. Toulouse: L’Institute National des Sciences Apliquées de Toulouse. Toulouse , França. 1996.

LEVEAU, J. Y.; BOUIX, M.. III. Cinéticas Microbianas. De: SCRIBAN, R.. **Biociencia**. Editora Manole Ltda., São Paulo, SP, 49Op. **Apud** TEIXEIRA, R. M. Otimização das Condições de Cultura para a Produção de Acetoína por *Hanseniaspora guilliermondii*. **Dissertação de Mestrado (Engenharia Química)**. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, 1999.

LUERCE, R. F.. Produção de Acetoína por *Bacillus polymyxa*. **Dissertação de Mestrado (Engenharia Química)**. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, 2002.

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

MORITZ, D. E.. Estudo do Crescimento de Três Leveduras Produtoras de Aromas. **Dissertação de Mestrado (Biociencia)**. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, 1998.

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**, 20(12): 1133-1138, 1998.

PASTORE, G.; SATO, H.; YANG, T.; PARK, Y.; MIN, D.. Production of fruit aroma by newly isolated yeast. **Biotechnology Letters**, 16(4): 389-392. **Apud** TEIXEIRA, R. M. Otimização das Condições de Cultura para a Produção de Acetoína por *Hanseniaspora guilliermondii*. **Dissertação de Mestrado (Engenharia Química)**. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, 1999.

PASTORE, G.. Produção Biotecnológica de Aromas e Oligossacarídeos. **Apostila do Curso Fermentation Technology – Módulo II (Fermentação por Fungos Filamentosos)**. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, 2000.

SCHMIDELL, W.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; LIMA, U. A.. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. V.2. Ed. Edgard Blücher Ltda. São Paulo, SP, 2001.

SCRIBAN, R.. **Biotecnologia**. Editora Manole, São Paulo, SP, 1985, 490p.

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**, 31(6): 537-542. 1995. **Apud** LUERCE, R. F.. Produção de Acetoína por *Bacillus polymyxa*. **Dissertação de Mestrado (Engenharia Química)**. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, 2002.

SIMÃO, A. M.. **Aditivos para Alimentos sob o Aspecto Toxicológico**, Livraria Nobel S. A., 1986, 274p. **Apud** MELLO, R.. Produção do bioaroma acetoína por *Hanseniaspora guilliermondii* CCT 3800 através do processo fermentativo em batelada alimentada. **Dissertação de Mestrado (Biotecnologia)**. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, 2001.

SOMOGY, L. P.; RHOMBERG, B.; TAKEI, N.. report obtido de <<http://www.cmrc.sri.com/CIN/JanuaryFebruary96/Article12.html>>, 1995. **Apud** CARVALHO, J. C.. Produção de Diacetil e Acetoína: desenvolvimento de um meio de cultivo e avaliação dos fatores que alteram o crescimento de *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* biovar. *Diacetlactis*. **Dissertação de Mestrado (Engenharia Química)**. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, 1999.

SOMOGY, L.; KISHI, A.. Aroma chemicals and the flavor and fragrance industry. Chemical Economics Handbook Report. Disponível em: <<http://ceh.sric.sri.com/Public/Reports/503.5000/>>, **apud** LUERCE, R. F.. Produção de Acetoína por *Bacillus polymyxa*. **Dissertação de Mestrado (Engenharia Química)**. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, 2002.

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

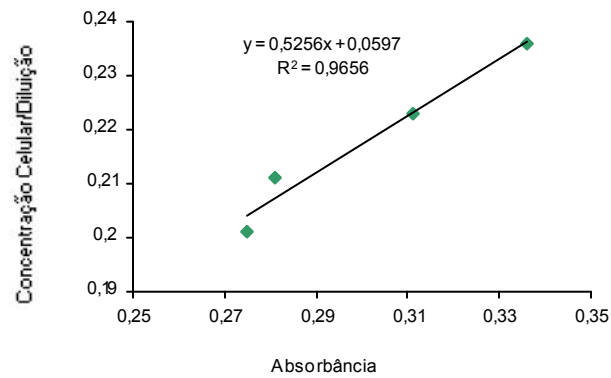
TEIXEIRA, R. M.. Otimização das Condições de Cultura para a Produção de Acetoína por *Hanseniaspora guilliermondii*. **Dissertação de Mestrado (Engenharia Química)**. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, 1999.

TOURSEL, P.. **Arômes: Condamnés à innover ...Process**, 1996. 1112, 34-37. **Apud MORITZ, D. E..** Estudo do Crescimento de Três Leveduras Produtoras de Aromas. **Dissertação de Mestrado (Biotecnologia)**. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, 1998.

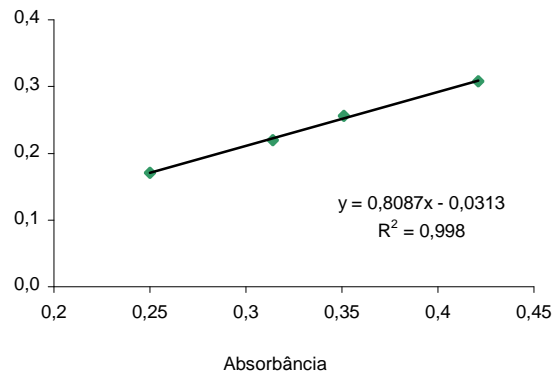
# *ANEXOS*

## 8. ANEXOS

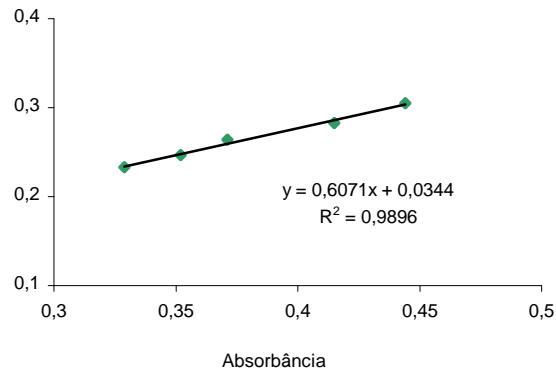
### *Anexo I – Curvas de calibração para determinação da concentração celular*



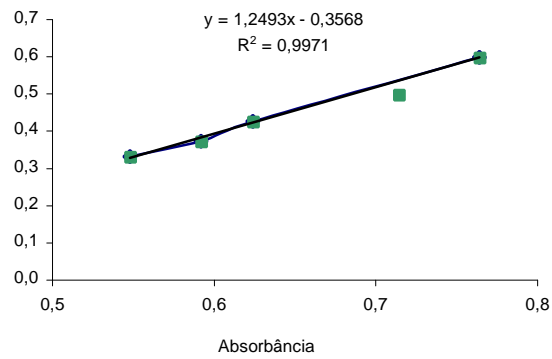
*Curva de Calibração da Concentração Celular para o Ensaio a pH inicial 4,5 (item 4.1.1)*



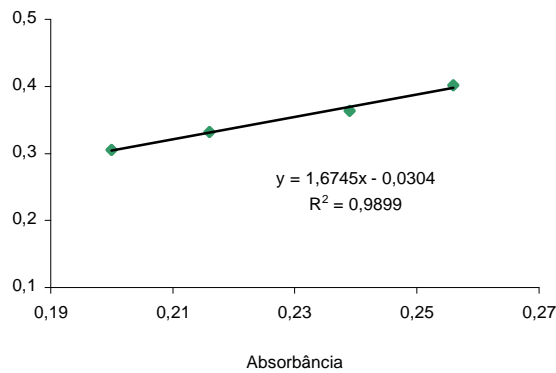
*Curva de Calibração da Concentração Celular para o Ensaio a pH inicial 5,0 (item 4.1.2)*



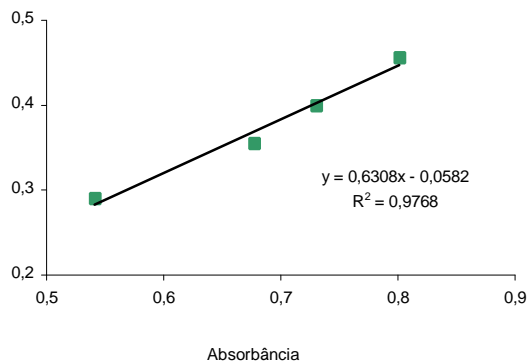
*Curva de Calibração da Concentração Celular para o Ensaio a pH inicial 5,5 (item 4.1.3)*



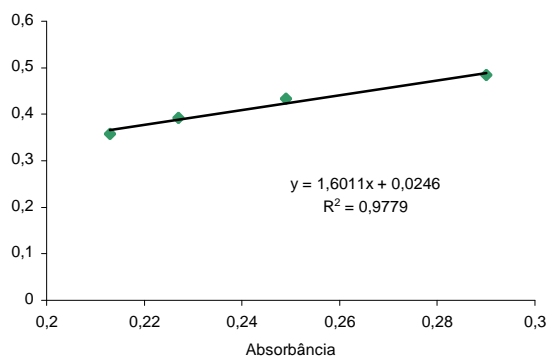
*Curva de Calibração da Concentração Celular para o Ensaio com  $t_{ci} = 20h$  (item 4.2.1)*



*Curva de Calibração da Concentração Celular para o Ensaio com  $t_{ci} = 17h$  (item 4.2.2)*



*Curva de Calibração da Concentração Celular para o Ensaio a 30g/L de glicose e  $t_{ci} = 20h$  (item 4.3.1)*

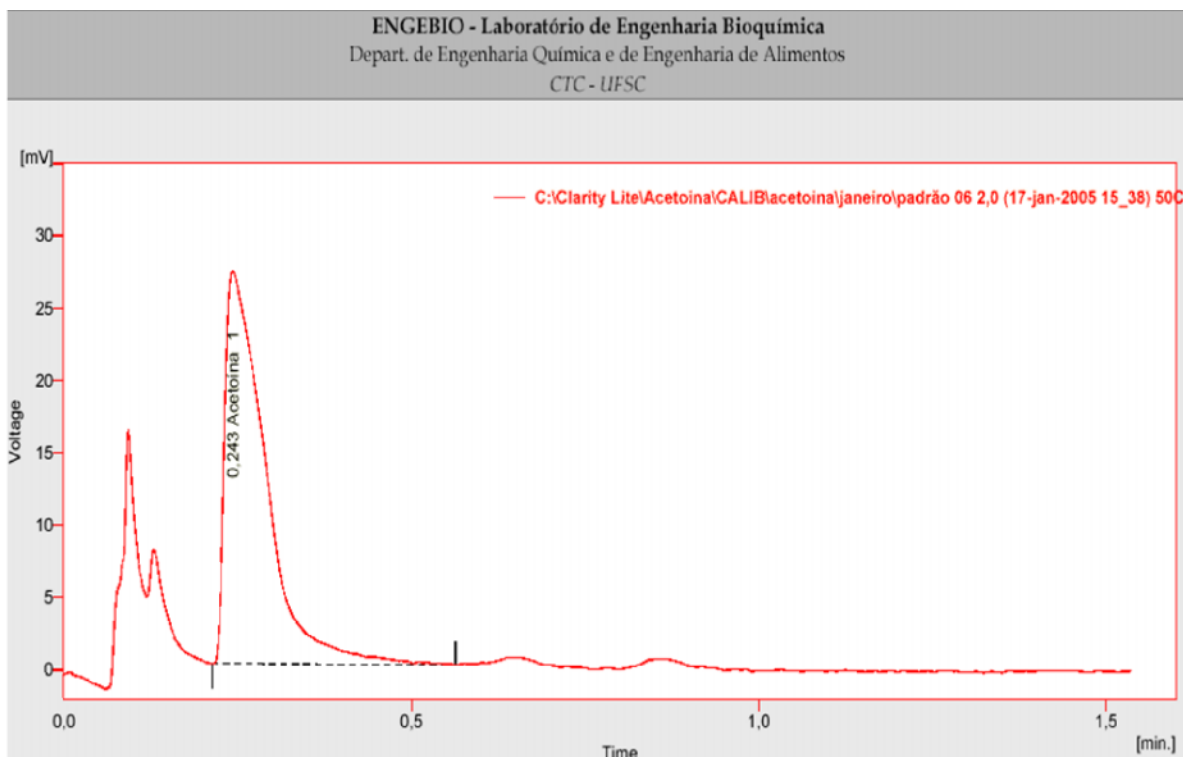


*Curva de Calibração da Concentração Celular para o Ensaio a 30g/L de glicose e  $t_{ci} = 17h$  (item 4.3.2)*



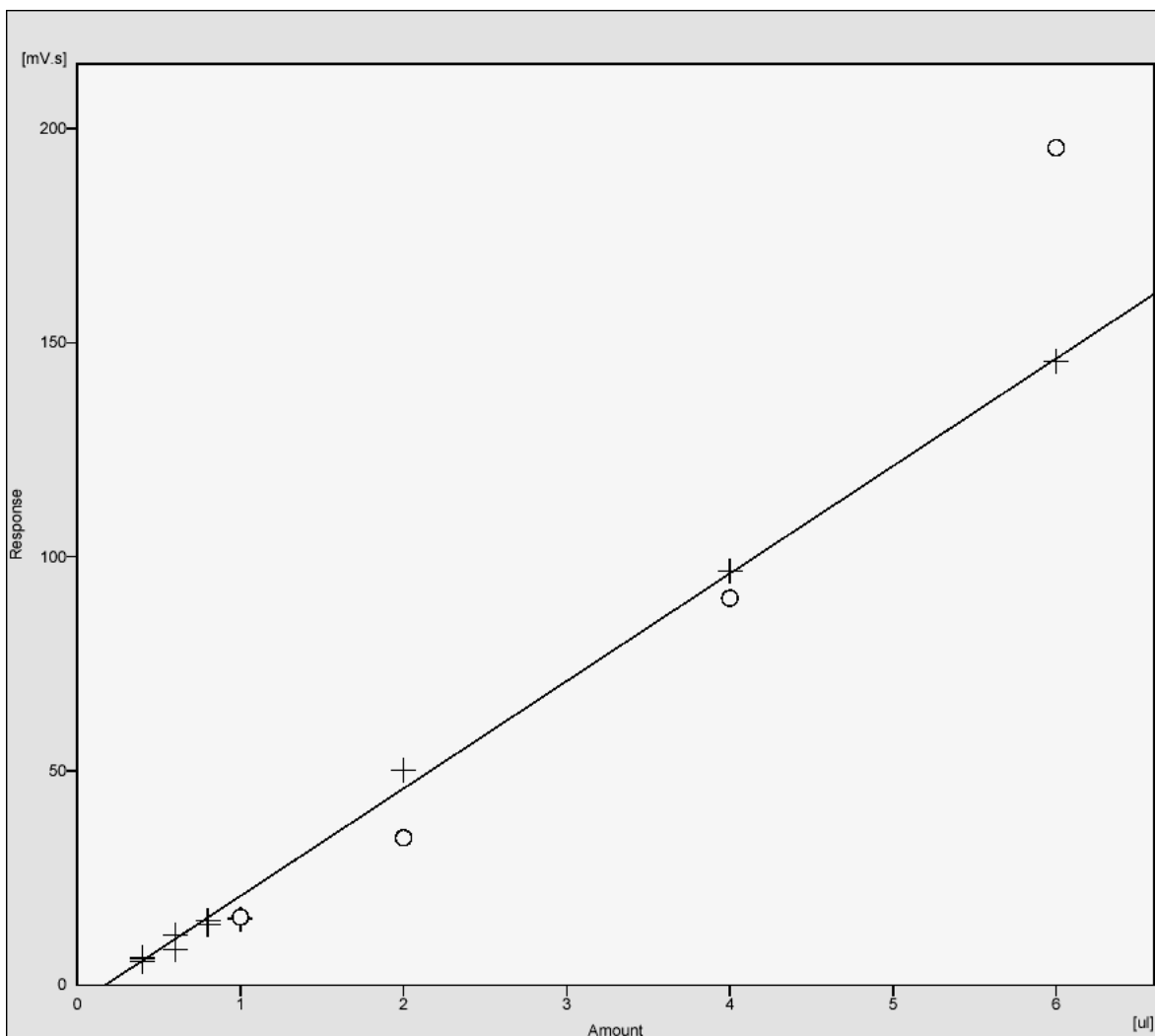


## *Anexo II – Curva de Calibração para Determinação da Concentração de Acetoína*



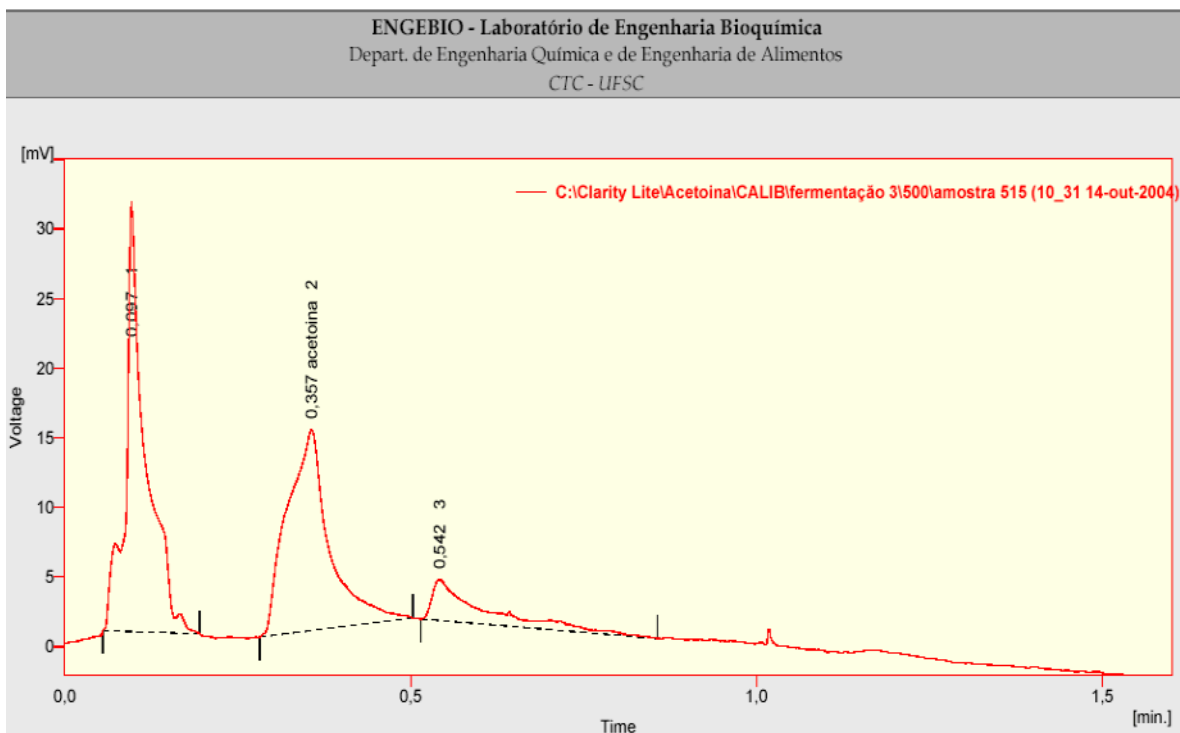
***Cromatograma de amostra padrão de acetoína de concentração 2,0g/L***

Cromatógrafo a gás Ciola & Gregori modelo CG90 equipado com detector de ionização de chama, coluna HP-1 (Crosslinked Methyl Siloxane 53mm de diâmetro e 30m de comprimento); sistema de aquecimento de rampa de temperatura iniciando a 40°C até 200°C a uma taxa de 20°C/min, temperatura do injetor 165°C, e do detector 230°C.



***Curva padrão para determinação da concentração de acetoína, amostras de 0,2 à 4,0g/L***

Cromatógrafo a gás Ciola & Gregori modelo CG90 equipado com: detector de ionização de chama e coluna HP-1 (Crosslinked Methyl Siloxane 53mm de diâmetro e 30m de comprimento); sistema de aquecimento de rampa de temperatura iniciando a 40°C até 200°C a uma taxa de 20°C/min, temperatura do injetor 165°C, e do detector 230°C.



***Amostra com maior concentração de acetoina detectada pela análise cromatográfica (7,8g/L). Ensaio à 50g/L de glicose, com tempo de cultivo de inóculo de 17h e pH 5,5.***

Cromatógrafo a gás Ciola & Gregori modelo CG90 equipado com: detector de ionização de chama e coluna HP-1 (Crosslinked Methyl Siloxane 53mm de diâmetro e 30m de comprimento); sistema de aquecimento de rampa de temperatura iniciando a 40°C até 200°C a uma taxa de 20°C/min, temperatura do injetor 165°C, e do detector 230°C.

***- Tabela de Resultados da Análise do Cromatograma***

**Result Table - Calculation Method ESTD**

	Reten. Time [min]	Response	RB	Amount [g/l]	Amount [%]	Peak Type	Compound Name
1	0,097	61,920	A	0,000	0,0		
2	0,357	60,976	A	7,807	780,7	Ordnr	acetoina
3	0,542	15,186	A	0,000	0,0		
	Total			1,000	780,7		