



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

PRODUÇÃO DE ACETOÍNA POR *Bacillus polymyxa*

ROGÉRIO DE FARIA LUERCE

Engenheiro Químico – FURG

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

Orientador: Prof. Dr. Agenor Furigo Jr.

Co Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow

Florianópolis

2002

Aos meus pais, Helena e Antônio Feliciano

Para Raquel, Lílian, Ricardo e Diego

Em memória de minhas avós, Eunice e Altamira

**"...Pois a vida é mais forte e apaixonada do que a morte
e a crença bem mais poderosa do que a dúvida!"**

Hermann Hesse (em: Debaixo das Rodas)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Helena e Antônio Feliciano, por todo amor que sempre me dedicaram.

Aos meus familiares, que mesmo distantes sempre estiveram torcendo por mim, em especial à amiga Almira pelo carinho e atenção.

Aos amigos Meiga Fátima, Ernandes, Fernanda, Ana Paula e Rita pela agradável companhia, amizade e compreensão.

À Sílvia por todo carinho, apoio, confiança e pela companhia nos finais de semana, feriados e noites de fermentação.

Às sempre presentes colegas e amigas Denise e Roberta pelas valiosas informações e pela inestimável ajuda dispensada.

Aos amigos Régis, Ana Maria e Vinícius Roberto pela amizade e incentivo.

À mestra e amiga Marilene Zepka, que me acompanhou durante minha iniciação na pesquisa científica, pelo exemplo, amizade, confiança e motivação que me conduziram à realização deste trabalho.

Aos professores Agenor e Jorge pela orientação, confiança e amizade.

Aos professores Hugo Soares e Jean Pierre Rosier por tomarem parte na banca examinadora.

Aos professores Regina de Fátima Moreira, Luciane Juliano e Adelamar Novais pela orientação durante o estágio de docência.

Aos colegas do ENGEBIO e redondezas: Beatriz, Luciana, Silas, Cíntia Marangoni, Alexandra, Fátima, Marcos, Toni, Rafael, Roseli, Alex, Cláudia, Thiago, Cristiane, Franciny, Patrícia, Elaine, Márcio, Leandro, Cinthia Vecchi, Vanessa e Fernanda pela agradável companhia e apoio dados para a realização deste trabalho.

Ao Edevílson por sua imensa solicitude.

À amiga Estela pela troca de informações.

Ao João (paz, irmão!) pela ajuda prestada durante as análises cromatográficas.

Ao Professor Humberto Riella, que gentilmente disponibilizou o cromatógrafo no qual foram feitas as dosagens de acetoína, e também aos colegas do LABMAC: Kênia, Juliane, Prof. Adelamar e Anderson pela atenção dispensada.

Aos colegas do mestrado: Carlos Darlan, Fabrício, Lorena, Ticiane, Gercino, Carlos Henrique, Henry, Fábio, Angelina e Gabriela pelo companherismo.

Ao Sr. Toninho pelos reparos no fermentador e cromatógrafo.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A DEUS, ao TODO, UNIVERSO ou o que se convencionar chamar, por tudo!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	X
NOMENCLATURA	XI
RESUMO.....	XIII
ABSTRACT.....	XIV

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Aromas.....	3
2.1.1 Aroma artificial.....	3
2.1.2 Aroma natural.....	4
2.2 Produção de aromas por processos biotecnológicos.....	4
2.3 Microrganismos produtores de aromas.....	5
2.4 <i>Bacillus polymyxa</i>	7
2.5 Acetoína.....	8
2.5.1 Biossíntese de acetoína.....	8
2.5.2 Fatores que afetam a produção de acetoína.....	10
2.5.2.1 Temperatura.....	10
2.5.2.2 Aeração.....	11
2.5.2.3 Potencial hidrogeniônico.....	11
2.5.2.4 Concentração inicial de substrato.....	12
2.5.2.5 Volume do meio de cultura.....	12
2.5.2.6 Inóculo.....	13

3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1 Microrganismo.....	14
3.2 Meio de manutenção.....	14
3.3 Preparo do inóculo para os ensaios fermentativos.....	14
3.4 Meio de cultivo utilizado nos ensaios fermentativos.....	16
3.5 Ensaios fermentativos.....	16
3.5.1 Ensaios preliminares em frascos agitados.....	16
3.5.2 Ensaios em fermentador.....	17
3.6 Métodos analíticos.....	18
3.6.1 Amostragem.....	18
3.6.1.1 Ensaios preliminares em frascos agitados.....	18
3.6.1.2 Ensaios em fermentador.....	18
3.6.2 Avaliação da contaminação.....	18
3.6.3 Determinação da concentração celular.....	18
3.6.4 Dosagem de glicose.....	19
3.6.5 Determinação da concentração de acetoína.....	20
3.7 Planejamento experimental.....	20
3.8 Metodologia utilizada nos cálculos.....	25
3.8.1 Fatores de conversão.....	25
3.8.2 Velocidades específicas de crescimento na fase exponencial.....	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 Ensaios preliminares em frascos agitados.....	27
4.2 Ensaios em fermentador.....	31
4.2.1 Planejamento experimental.....	31
4.2.2 Cinética de crescimento celular e produção de acetoína.....	36
5. CONCLUSÕES	42
6. SUGESTÕES	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
APÊNDICES.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Principais espécies de bactérias e leveduras produtoras de acetoína..	6
Tabela 3.1 - Meio AN para manutenção da bactéria.....	14
Tabela 3.2 - Meio de cultivo YM.....	15
Tabela 3.3 - Meio PAY.....	16
Tabela 3.4 - Valores referentes aos níveis codificados para as variáveis independentes.....	22
Tabela 3.5 - Ensaios realizados no planejamento 2^2 completo com ponto central.....	22
Tabela 3.6 - Tabela de análise de variância para o ajuste dos parâmetros do modelo pelo método dos mínimos quadrados.....	24
Tabela 4.1 - Resultados obtidos nos ensaios preliminares em frascos agitados.....	27
Tabela 4.2 - Fator de conversão substrato em células ($Y_{X/S}$), fator de conversão substrato em produto ($Y_{P/S}$) para os ensaios preliminares.....	30
Tabela 4.3 - Resultados do planejamento fatorial 2^2 adicionado de ponto central.....	31
Tabela 4.4 - Efeitos das variáveis independentes sobre a resposta em concentração máxima de acetoína ($C_{\text{acetoína}}$).....	32
Tabela 4.5 - Coeficientes de regressão (codificados) para o modelo estimado para concentração máxima de acetoína.....	33
Tabela 4.6 - Análise da variância para avaliação da significância estatística do modelo da concentração máxima em acetoína	33
Tabela 4.7 - Fator de conversão substrato em células ($Y_{X/S}$), fator de conversão substrato em produto ($Y_{P/S}$) e velocidade específica de crescimento da fase exponencial (μ).....	40
Tabela 4.8 - Concentrações máximas de acetoína ($C_{\text{acetoína}}$) produzidas pela levedura <i>Hanseniaspora guilliermondii</i> comparadas com a produzida neste estudo pela bactéria <i>Bacillus polymyxa</i>	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - <i>Bacillus polymyxa</i> CCT 2479 (x 1500).....	8
Figura 2.2 - Formação de acetoína a partir de hidroxietiltiamina pirofosfato.....	9
Figura 3.1 - Shaker Braun modelo CERTOMAT BS-1.....	15
Figura 3.2 - Biorreator New Brunswick Scientific– Modelo BIOFLO III.....	17
Figura 4.1 - Produção de acetoína e células e consumo de glicose no ensaio A ([glicose]=30 g/L; pH=5,5).....	28
Figura 4.2 - Produção de acetoína e células e consumo de glicose no ensaio B ([glicose]=50 g/L; pH=5,5).....	28
Figura 4.3 - Produção de acetoína e células e consumo de glicose no ensaio C ([glicose]=30 g/L; pH=6,5).....	29
Figura 4.4 - Produção de acetoína e células e consumo de glicose no ensaio D ([glicose]=50 g/L; pH=6,5).....	29
Figura 4.5 - Carta de Pareto para os efeitos das variáveis sobre a concentração máxima em acetoína	32
Figura 4.6 - Concentrações de acetoína observadas em função das concentrações de acetoína previstas pelo modelo experimental.....	34
Figura 4.7 - Superfície de resposta obtida para o modelo estimado para a concentração máxima em acetoína	35
Figura 4.8 - Curvas de nível do modelo obtido para a concentração máxima em acetoína	36
Figura 4.9 - Produção de acetoína e células e consumo de glicose no ensaio 1 ([glicose]=30 g/L; pH=5,5).....	36
Figura 4.10 - Produção de acetoína e células e consumo de glicose no ensaio 2 ([glicose]=30 g/L; pH=6,5).....	37
Figura 4.11 - Produção de acetoína e células e consumo de glicose no ensaio 3 ([glicose]=50 g/L; pH=5,5).....	37
Figura 4.12 - Produção de acetoína e células e consumo de glicose no ensaio 4 ([glicose]=50 g/L; pH=6,5).....	38
Figura 4.13 - Produção de acetoína e células e consumo de glicose no ensaio 5 ([glicose]=40 g/L; pH=6,0).....	38
Figura 4.14 - Produção de acetoína e células e consumo de glicose no ensaio 5 (réplica) ([glicose]=40 g/L; pH=6,0).....	39

NOMENCLATURA

AN	Agar Nutriente
ATCC	American Type Culture Collection (EUA)
b_0, b_1, b_2, b_{12}	coeficientes de regressão relativos aos efeitos principais lineares (x_1, x_2) e efeitos de interação (x_1x_2)
$b'_1, b'_2, b''_{12}, b'''_{12}, b'''_{12}$	coeficientes de regressão relativos aos efeitos principais quadráticos (x_1^2, x_2^2) e efeitos de interação ($x_1^2x_2, x_1x_2^2, x_1^2x_2^2$)
$C_{\text{acetoína}}$	concentração máxima de acetoína (g/L)
CCT	Coleção de Culturas Tropical
F	teste de significância estatística
[glicose]	concentração de glicose (g/L)
k	número de fatores
k_La	coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (h^{-1})
m	número dos diferentes níveis
MQ_{ep}	média quadrática do erro puro
MQ_{faj}	média quadrática da falta de ajuste
MQ_R	média dos quadrados da regressão
MQ_r	média dos quadrados do resíduo
n	número total de observações (ensaios)
n_i	número de repetições do nível i
p	número de parâmetros do modelo
P	concentração do produto (acetoína) (g/L)
R^2	coeficiente de correlação linear
S	concentração de substrato (glicose) (g/L)
SQ_{ep}	soma quadrática devido ao erro puro

SQ_{faj}	soma quadrática devido a falta de ajuste do modelo em relação às respostas observadas
SQ_R	soma dos quadrados da regressão
SQ_r	soma dos quadrados dos resíduos
SQ_T	soma quadrática total
t	tempo (h)
x_1	concentração inicial de glicose (g/L)
x_2	pH
X	concentração celular (g/L)
X_{max}	concentração celular máxima (g/L)
\bar{y}	média global das respostas
y	estimativa dos valores populacionais das respostas
y_1	resposta em concentração máxima de acetoína (g/L)
y_{ij}	respostas observadas
\hat{y}	valor estimado pelo modelo
YM	Yeast Malt Extract
$Y_{P/S}$	fator de conversão substrato em produto (g/g)
$Y_{X/S}$	fator de conversão substrato em células (g/g)
μ	velocidade específica de crescimento (h^{-1})
v	graus de liberdade
v_1	graus de liberdade da regressão
v_2	graus de liberdade do resíduo

RESUMO

A produção de acetoína pela bactéria *Bacillus polymyxa* CCT 2479 utilizando glicose como fonte de carbono em condições aeróbias foi estudada. Primeiramente, foram realizados ensaios em frascos agitados em meio PAY para verificar algumas características de crescimento e produção de acetoína. Numa segunda etapa, desenvolveu-se um planejamento fatorial completo em dois níveis (concentração inicial de glicose em 30 e 50 g/L e pH 5,5 e 6,5) adicionado de ponto central (concentração inicial de glicose em 40 g/L e pH 6,0) para avaliar a influência da concentração inicial de substrato e do pH sobre a produção de acetoína nos ensaios em biorreator. Os efeitos principais do pH e concentração inicial de substrato mostraram-se significativos no modelo proposto para a concentração máxima em acetoína. A concentração máxima de acetoína (7,97 g/L) foi obtida no ensaio conduzido em pH 5,5 e concentração inicial de glicose de 50 g/L. Os resultados observados indicaram que a produção de acetoína esteve associada ao crescimento celular nos ensaios em biorreator.

ABSTRACT

Acetoin formation from glucose by *Bacillus polymyxa* CCT 2479 under aerobic conditions was studied. Preliminary studies in shake flasks in PAY medium were performed to determine some characteristics of the growth and the acetoin production. In a second stage an experimental design with two-level factors (30 and 50 g/L initial glucose concentration, pH 5,5 and 6,5) with center point (40 g/L initial glucose concentration, pH 6,0) was developed to evaluate the influence of initial glucose concentration and pH on the acetoin production in the bioreactor assays. The effects of initial glucose concentration and pH have shown significant on the maximum acetoin concentration proposed model. The maximum acetoin concentration (7,97 g/L) was obtained in the assay at pH 5,5 and 50 g/L initial glucose concentration. The observed results have indicated that acetoin production have been associated to cellular growth in the bioreactor assays.

1. INTRODUÇÃO

Os aromas alimentares podem ser obtidos através de processos sintéticos (química fina), por ação microbiana, originários de metabólitos de plantas ou ainda do metabolismo animal.

Em 2000, o mercado mundial de aromas e fragâncias, incluindo vendas de componentes de aromas, fragâncias e óleos essenciais foi estimado em cerca de 14 bilhões de dólares, a uma taxa média 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 Estados Unidos, 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 (Somogyi & Kishi, 2001).

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.

Desde a antiguidade, os processos fermentativos têm sido empregados para a produção de produtos alimentares. No entanto, a produção em potencial de aromas produzidos por microrganismos passou a ser investigada em tempos mais recentes. Em decorrência das vantagens esperadas, tem havido um crescente interesse por este campo de pesquisa, resultando no desenvolvimento dos bioprocessos como alternativa para substituir a síntese química.

Os bioprocessos são vantajosos por uma série de razões: os produtos são legalmente reconhecidos como substâncias naturais, a estereosseletividade é garantida pela alta especificidade dos biocatalisadores e as influências externas adversas como fatores climáticos e problemas ambientais podem 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.

No Laboratório de Engenharia Bioquímica, do Departamento de Engenharia Química e de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, onde o presente trabalho foi desenvolvido, há uma linha de pesquisa relacionada à produção de aromas que teve início com os estudos desenvolvidos por Moritz (1998), onde a produção de acetoína por três leveduras (*Hanseniaspora guilliermondii*, *Kloeckera apiculata* e *Hansenula anomala*) foi investigada, e por Carvalho (1999), que estudou a produção de acetoína pela bactéria *Lactococcus 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*.

A acetoína, objeto deste estudo, atua como potencializador de aromas de compostos como café, vinagre e principalmente manteiga. Neste trabalho, investigou-se a sua produção pela bactéria *Bacillus polymyxa*, avaliando-se a influência de fatores como o pH e a concentração inicial de substrato (glicose).

Numa etapa preliminar foram realizados ensaios em frascos agitados com a finalidade de avaliar alguns parâmetros relacionados ao crescimento celular e à produção de acetoína.

A etapa posterior envolveu a elaboração de um planejamento fatorial completo em dois níveis (concentração inicial de glicose em 30 e 50 g/L; pH 5,5 e 6,5) adicionado de ponto central (concentração inicial de glicose em 40 g/L e pH 6,0) com a finalidade de ajustar um modelo empírico representativo da concentração máxima de acetoína obtida nos ensaios em biorreator.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aromas

Os aromas alimentares consistem numa preparação concentrada de substâncias aromáticas, as quais são adicionadas a gêneros alimentícios para lhes conferir ou reforçar o odor ou mesmo o sabor (Moll & Moll, 1990; Fabre, 1995).

Segundo a legislação brasileira (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 as bebidas. Excluem-se desta definição os produtos que apresentam apenas sabor doce, salgado ou ácido.”

A expressão “potencializadores de aromas” surgiu recentemente, embora estes venham sendo usados por chineses e japoneses há centenas de anos para melhorar e realçar os aromas de sua dieta constituída basicamente de arroz, soja e vegetais. Em 1908, foi identificado o princípio ativo (monoglutamato de sódio) da alga *Laminaria japonica*, demonstrando a sua propriedade de realçar ou intensificar o aroma de alimentos de alto valor protéico, o qual é hoje utilizado em escala industrial, principalmente em enlatados, sopas, e tortas de carnes (Simão, 1986). Outro flavorizante que realça o aroma de carne é o inosinato de sódio, utilizado em hidrolisados de proteínas vegetais. A acetoína é um dos recentes potencializadores de aromas em estudo (Mello, 2001).

De acordo com a Legislação Brasileira (IFF ESSÊNCIAS E FRAGÂNCIAS LTDA, 1997), os aromatizantes podem ser classificados em naturais ou artificiais.

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 aromatizante idêntica à natural;
- Substância aromatizante “idêntica à 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; 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 recente dos processos biotecnológicos permite facilitar certas limitações (Fabre, 1995; Moritz, 1998).

2.2 Produção de aromas por processos biotecnológicos

Em anos recentes, a utilização de plantas de biomassa renováveis na fabricação de produtos químicos tem sido objeto de crescentes estudos em muitos países, devido ao renascimento do interesse pelos processos fermentativos, os quais já eram aplicados industrialmente no início do recente século passado (por exemplo, na produção de etanol, butanol, isopropanol e acetona a partir de carboidratos derivados de constituintes de matérias-primas de plantas). Durante a segunda guerra mundial, pesquisas intensas foram efetuadas para o desenvolvimento da produção fermentativa do 2,3-butanodiol, o qual pretendia-se utilizar na manufatura da borracha e certos solventes. O rápido desenvolvimento da indústria petroquímica por volta da década de 1950, porém, substituiu quase que completamente os processos fermentativos (Serebrennikov, 1995).

Tem sido crescente a demanda de produtos naturais em decorrência de uma maior conscientização por parte da população no que se refere aos aspectos nutricionais dos alimentos que consome. Sendo assim, os aromas sintéticos vêm sendo substituídos gradativamente pelos de origem biotecnológica, classificados como naturais (Mello, 2001).

Os aromas obtidos através de processos biotecnológicos podem ser produzidos por duas vias: bioprodução e bioconversão. 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; Moritz, 1998). Outro processo

que envolve reações múltiplas é a bioconversão, onde a partir de sistemas enzimáticos é possível ampliar degradar ou modificar o substrato, deste modo aumentando e mesmo substituindo a síntese química (Berger, 1995; Teixeira, 1999).

A produção de aromas por via biotecnológica apresenta vantagens na facilidade de ampliação de escala e independência de fatores agrícolas. A sua desvantagem reside ainda no seu alto custo de produção e o baixo rendimento (Pastore, 2000).

2.3 Microrganismos produtores de aromas

A tecnologia existente para a produção de aromas é baseada principalmente em materiais de plantas onde as flutuações sazonais são uma desvantagem. Por outro lado, a síntese química, geralmente, carece de estereosseletividade. Por essas razões, os microrganismos são uma fonte em potencial de essências naturais (Pastore, 1994; Teixeira, 1999).

A produção de voláteis por microrganismos pode ser feita por bactérias, leveduras e fungos filamentosos.

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

Gênero	Espécies	Produtos finais secundários	Referências bibliográficas
<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 <i>et al.</i> , 1993 Renna <i>et al.</i> , 1993
	<i>B. polymyxa</i>	acetoína, diacetil, acetato de etila, 2,3-butanodiol, 2-acetolactato, etanol	De Mas <i>et al.</i> , 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 <i>et al.</i> , 1991
	<i>L. lactis</i>	acetoína, diacetil	Kaneko <i>et al.</i> , 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	Sablayrolles & Goma, 1984
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. breve</i> <i>B. bifidum</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. infantis</i>	acetoína, ácido fórmico, ácido succínico, acetaldeído, acetona, diacetil, etanol	Berger, 1995
<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-pentonodiona, 2-acetohidroxibutirato, 2-acetolactato	Haukeli & Lie, 1972
	<i>S. carlbergensis</i>	acetoína, diacetil, etanol, 2,3-pentonodiona, 2-acetolactato	Haukeli & Lie, 1972
	<i>S. diastaticus</i>	acetoína, diacetil, etanol, 2,3-pentonodiona	Haukeli & Lie, 1972
	<i>S. sake</i>	acetoína, diacetil, etanol, acetohidroxibutirato	Haukeli & Lie, 1972
<i>Hansenula</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 <i>et al.</i> , 1996
<i>Candida</i>	<i>C. stellata</i>	acetoína, 2,3-butanodiol, 2-acetolactato, etanol	Romano <i>et al.</i> , 1996
<i>Saccharomycodes</i>	<i>S. ludwigii</i>	acetoína, 2,3-butanodiol, etanol	Romano <i>et al.</i> , 1996
<i>Torulaspora</i>	<i>T. belbrueckii</i>	acetoína, 2,3-butanodiol, etanol	Romano <i>et al.</i> , 1996

*Adaptado de Moritz, 1998

2.4 *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 circulina são produzidos por essa classe de microrganismos.

Os membros do grupo *Bacillus* são facilmente isolados do ar e da terra e encontram-se entre aqueles organismos que mais frequentemente aparecem. Quando amostras pasteurizadas são semeadas em placas e incubadas de forma aeróbia, as colônias que se desenvolvem são quase que exclusivamente as do gênero *Bacillus*.

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 aeróbica com os 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 ainda fixadora de nitrogênio. São bactérias gram positivas, mesófilas e produzem esporos ovais, com paredes grossas.

Esta bactéria também é conhecida como *Aerobacillus polymyxa*, *Granulobacter polymyxa*, *Clostridium polymyxa* ou ainda *Paenebacillus polymyxa*.

Na Figura 2.1 mostra-se uma fotografia da bactéria *Bacillus polymyxa* ampliada mil e quinhentas vezes.

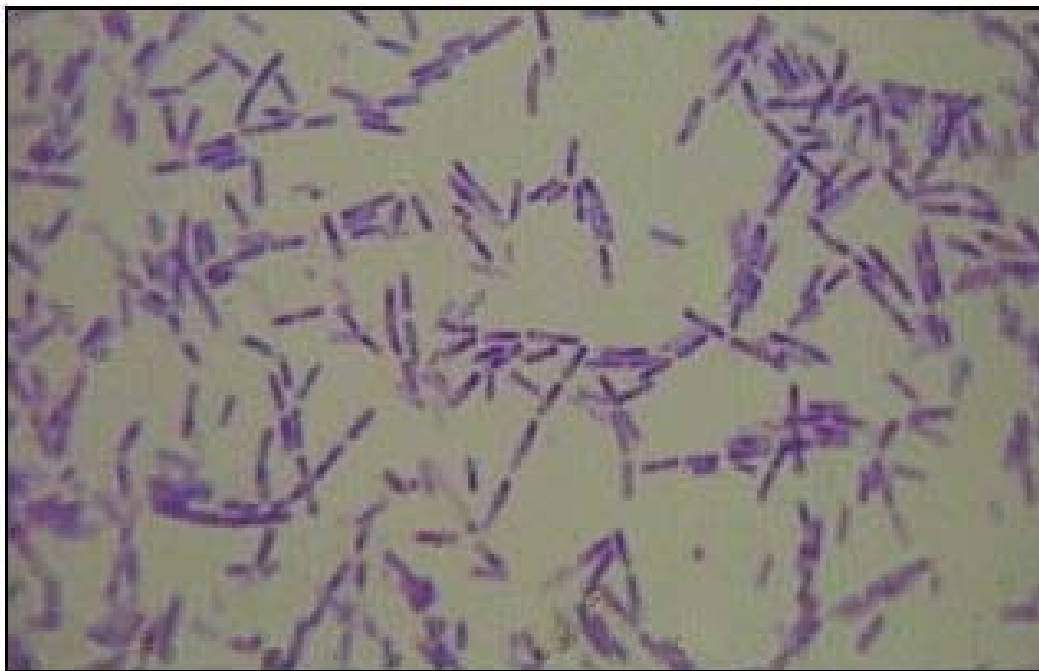


Figura 2.1 – *Bacillus polymyxa* CCT 2479 (x 1500)

2.5 Acetoína

A acetoína (3-hidroxi-2-butanona, acetil metil carbinol, dimetilcetol ou γ -hidroxi- β -oxobutano), é uma cetona de odor agradável; cuja massa molecular é 88,10, fórmula química $C_4H_8O_2$, ponto de ebulição 148°C e ponto de fusão 15°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 do aroma 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 tratar-se de uma substância derivada do diacetil, o qual apresenta um forte odor característico. Em vinagres, o teor encontrado é bastante superior ao dos vinhos e sua determinação está associada à genuidade do produto (Takemoto, 2000).

2.5.1 Biossíntese de acetoína

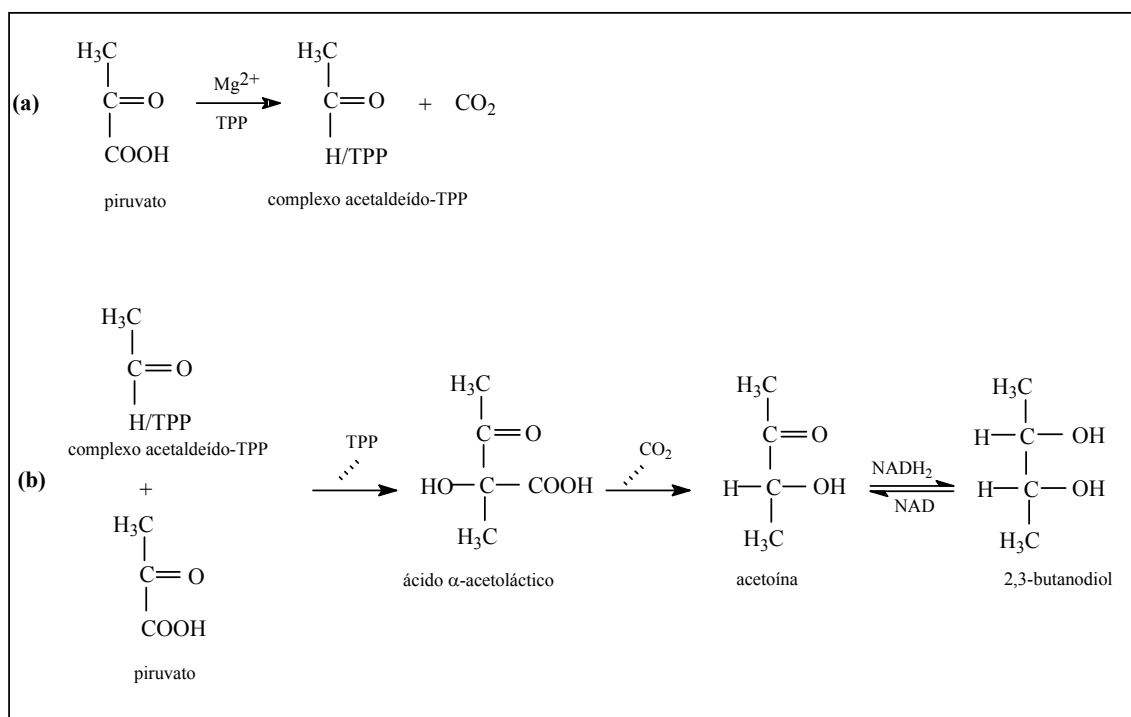
Historicamente, talvez a primeira substância produzida por via biotecnológica para modificar o aroma e sabor de alimentos tenha sido o ácido acético, produzido

quando o vinho é oxidado a vinagre, através de espécies do gênero *Acetobacter*. Diversas cepas de bactérias são capazes de produzir aromas específicos úteis como aditivos em produtos lácteos, tais como o diacetil e a acetoína. O diacetil é produzido por via sintética a partir da butanona e por via fermentativa através de diversos microrganismos (*Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Bacillus*), utilizando-se como substrato a glicose e outras fontes de carbono. A acetoína, objeto deste trabalho, também pode ser produzida por bactérias que produzem ácido láctico, e também a partir de espécies dos gêneros *Micrococcaceae*, *Enterobacteriaceae* e *Propionibacterium* entre outros (Mello, 2001).

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 de 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; Teixeira, 1999).

As bactérias, exceto *Escherichia coli*, utilizam o mecanismo descrito pela Figura 2.2 para a produção de acetoína a partir de hidroxietiltiamina pirofosfato.



*Fonte: Teixeira, 1999

Figura 2.2 - Mecanismo de formação de acetoína a partir de hidroxietiltiamina pirofosfato

Conforme observa-se na Figura 2.2, o complexo hidroxietiltiamina pirofosfato reage com outra molécula de piruvato, formando o ácido α -acetoláctico, o qual é descarboxilado para formar acetoína. Em presença de NAD reduzida e da enzima redutase, a acetoína pode ser reduzida a 2,3-butanodiol, com simultânea oxidação da NAD.

Nas leveduras do vinho, a acetoína é um importante subproduto do metabolismo de carboidratos, o qual dá-se somente em presença de carboidratos fermentescíveis ou de ácido pirúvico, necessário ao metabolismo dos microrganismos, particularmente para a síntese de material celular. (Romano & Suzzi, 1996; Teixeira, 1999).

2.5.2 Fatores que influenciam a produção de acetoína

Para se desenvolver ou para produzir metabólitos, os microrganismos precisam de energia, a qual é obtida através do catabolismo de substâncias orgânicas. Para que este evento ocorra, é necessário que as condições bioquímicas, fisiológicas e ambientais sejam adequadas ao microrganismo. Os principais fatores ambientais que podem influenciar na biossíntese de um determinado microrganismo podem ser: substâncias nutritivas, pH, temperatura, pressão osmótica, aeração e frequência de agitação, entre outros (Mello 2001).

2.5.2.1 Temperatura

A biossíntese de acetoína e 2,3-butanodiol começa a partir do piruvato e envolve três enzimas. Acetolactato sintase e acetolactato descarboxilase são responsáveis pela produção de acetoína, enquanto que a terceira enzima – NADH-dehidrogenase – converte acetoína em 2,3-butanodiol.

Serebrennikov (1995), 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 dehidrogenase, que as enzimas produtoras de acetoína possuíam atividade ótima na faixa de 37-40°C, enquanto que para a enzima produtora de 2,3-butanodiol a temperatura ótima situava-se por volta de 70°C.

2.5.2.2 Aeração

Jansen *et al.* (1983), em experimentos com *Klebsiella oxytoca* em xilose, constataram que em meios com alta taxa de transferência de oxigênio a produção de acetoína era favorecida; em meios menos aerados baixas concentrações do produto eram obtidas, prevalecendo a formação de 2,3-butanodiol.

Nakashimada *et al.* (1998) verificaram que a altas taxas de aeração (500 mL ar/min) concentrações maiores de acetoína foram produzidas por *Bacillus polymyxa*. Em taxas de aeração por volta de 200 mL 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 determinados.

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

De Mas *et al.* (1988) verificaram que a produção de metabólitos tais como acetoína, 2,3-butanodiol, acetato de etila, acetolactato e etanol por duas cepas de *Bacillus polymyxa* era dependente da disponibilidade relativa de oxigênio no meio de cultivo. A altas taxas de transferência de oxigênio (superiores a 50 mmol/L/h), baixas concentrações de 2,3-butanodiol foram encontradas, enquanto quantidades maiores de acetoína e acetato foram produzidas. Em baixas taxas de transferência de oxigênio (15 mmol/L/h), o rendimento de butanodiol foi máximo. Em taxas intermediárias (25-50 mmol/L/h) o rendimento em butanodiol começou a decair devido à formação de acetolactato e etanol.

Cañas *et al.* (1999), estudando a produção de acetoína pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides*, encontraram maiores teores de acetoína em meios aerados (600 mL ar/min), enquanto que em meios não aerados apenas traços de acetoína foram produzidos.

2.5.2.3 Potencial hidrogeniônico

O pH é um importante parâmetro na regulação do metabolismo microbiano. Condições alcalinas favorecem a produção de ácidos orgânicos, ao passo que a formação de acetoína e 2,3-butanodiol é favorecida em valores de pH ligeiramente ácidos (Jansen & Tsao, 1983).

Como a maioria das bactérias cresce mais lentamente em pH baixo, resulta em uma maior disponibilidade de piruvato para ser utilizado na produção de acetoína, visto

que, ao crescerem lentamente, as células requerem uma quantidade menor de piruvato para síntese de material celular (Teixeira, 1999).

Cañas *et al.* (1999) verificaram que em ensaios realizados com *Leuconostoc mesenteroides* em pH 5,0 obtinha-se uma concentração maior em acetoína do que nos ensaios em pH 6,0.

De acordo com Mello (2001), em bactérias, a produção de moléculas de quatro carbonos (diacetil, acetoína e 2,3-butanodiol) somente é observada quando altas concentrações de piruvato são acumuladas, ocorrendo durante a fermentação do citrato em pH ácido.

2.5.2.4 Concentração inicial de substrato

Moritz (1998), ao estudar a o crescimento de três leveduras produtoras de aromas (*Hanseniaspora guilliermondii*, *Hansenula anomala* e *Kloeckera apiculata*), verificou que não ocorria produção de acetoína nos experimentos com concentração inicial de glicose entre 15-30 g/L. O referido aroma começava a ser detectado nos ensaio cuja concentração inicial era de 30 g/L. Na faixa de concentração inicial de substrato estudada (15-40 g/L), nos experimentos com *Hanseniaspora guilliermondii* e *Kloeckera apiculata* cuja concentração inicial de glicose foi de 40 g/L, maiores teores de acetoína foram produzidos .

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

Segundo Sablaroylles & Goma (1984), o aumento da concentração inicial de glicose, dentro da faixa estudada – 22, 45, 107 e 195 g/L – favorecia a obtenção de concentrações mais elevadas de 2,3-butanodiol e etanol por *Aerobacter aerogenes* .

De acordo com Serebrennikov (1995), concentrações iniciais de glicose mais elevadas (100 g/L) favoreciam a produção de 2,3-butanodiol, enquanto que concentrações mais baixas de substrato (50 g/L) favoreciam a produção de acetoína. Tais dados foram verificados em ensaios em frascos agitados com a bactéria *Bacillus polymyxa*.

2.5.2.5 Volume do meio de cultura

O volume do meio de cultura apresentou influência na produção de 2,3-butanodiol, etanol, acetoína e acetato por *Paenibacillus polymyxa* (ou *Bacillus*

polymyxa) em estudos com frascos agitados realizados por Nakashimada *et. al* (1998). Quando este aumenta, a taxa de transferência de oxigênio diminui e também diminui a produção de acetoína e acetato, aumentando a produção de etanol e 2,3-butanodiol (Teixeira, 1999).

2.5.2.6 Inóculo

Segundo Romano & Suzzi (1996), a formação de acetoína depende também das cepas de microrganismos utilizados na fermentação, mas depende muito mais da quantidade de células viáveis presentes no processo.

A atividade metabólica das leveduras reduz rapidamente o diacetil a acetoína e esta a 2,3-butanodiol. Tal metabolismo é explicado pela ausência de grandes quantidades de diacetil durante a fase ativa da fermentação. Quanto mais leveduras estiverem presentes, tanto mais rapidamente o diacetil é reduzido e, conseqüentemente, mais acetoína é formada. Estimou-se uma concentração de inóculo em torno de 2,5 g/L de peso seco (Haukeli & Lie, 1972; Moritz, 1998).

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.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado nos ensaios fermentativos 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 manutenção da bactéria foi o Meio AN (Agar Nutriente), cuja composição é apresentada na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Meio AN para manutenção da bactéria

Componentes	Concentração (g/L)
Extrato de carne (BIOBRÁS)	3
Peptona bacteriológica (BIOBRÁS)	5
Agar pó fino (REAGEN)	15

Os ingredientes foram pesados em balança semi analítica, dissolvidos em água destilada e aquecidos até completa dissolução, sob constante agitação. A seguir, o meio foi 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 – Meio de cultivo YM

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

Transferiu-se três alçadas de células da cultura estoque para o frasco erlenmeyer aletado (400 mL para os ensaios em frascos agitados e 1000 mL para os ensaios em biorreator) com o caldo de cultivo. Os frascos foram cobertos com tampões de algodão hidrófobo, a fim de evitar possíveis contaminações e permitir a aeração adequada, e incubados em Shaker Braun modelo CERTOMAT BS-1, mostrado na Figura 3.1, com agitação orbital de 150 rpm, a 37°C. Após 22-24 horas (final da fase exponencial, 0,9-1,1 g células/L) o inóculo estava turvo e pronto para uso.

**Figura 3.1 – Shaker Braun modelo CERTOMAT BS-1**

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 ensaios fermentativos foi equivalente a dez por cento do volume total.

(No Apêndice I são mostradas a curva de crescimento celular, determinação da velocidade específica de crescimento e curva de calibração celular para o pré inóculo).

3.4 Meio de cultivo utilizado nos ensaios fermentativos

Os ensaios fermentativos foram realizados utilizando-se o meio PAY (De Mas *et al.*, 1988), mostrado na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Meio PAY

Composição	Concentração
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O (VETEC)	12 g/L
KH ₂ PO ₄ (VETEC)	1,75 g/L
(NH ₄) ₂ HPO ₄ (VETEC)	2,9 g/L
(NH ₄) ₂ HSO ₄ (NUCLEAR)	5,8 g/L
Extrato de Levedura (BIOBRÁS)	13,1 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O (ECIBRA)	219 mg/L
FeSO ₄ .7H ₂ O (VETEC)	44 mg/L
CaCl ₂ .2H ₂ O (RIEDEL DE HAËN)	8,8 mg/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O (REAGEN)	0,9 mg/L
MnSO ₄ .H ₂ O (ECIBRA)	0,9 mg/L
EDTA (VETEC)	44 mg/L
H ₂ SO ₄ (REAGEN)	150 mg/L
Glicose (NUCLEAR)	30 g/L; 40 g/L; 50 g/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.

3.5 Ensaios fermentativos

3.5.1 Ensaios preliminares em frascos agitados

Foram realizados ensaios fermentativos em frascos agitados para verificar algumas características do crescimento da bactéria e também para avaliar a influência do pH inicial e da concentração inicial de substrato sobre a produção de acetoína.

Os experimentos foram realizados em frascos erlenmeyers (1000 mL) contendo 450 mL de meio PAY (mostrado na Tabela 3.3), inoculados com 50 mL de inóculo (preparado conforme descrito no item 3.3) contendo uma concentração conhecida de células (0,9-1,1 g/L). Os frascos foram cobertos com tampões de algodão hidrófobo, para evitar possíveis

contaminações e permitir a aeração adequada, e mantidos a 37°C, sob agitação de 140 rpm, em Shaker Braun modelo CERTOMAT BS – 1.

3.5.2 Ensaios em fermentador

Os experimentos foram realizados em regime batelada, no biorreator New Brunswick Scientific CO INC – Modelo BIOFLO III. mostrado na Figura 3.2.



Figura 3.2- Biorreator New Brunswick Scientific CO INC – Modelo BIOFLO III

O equipamento é provido de sondas automáticas para medição de pH, temperatura e nível de espuma. É dotado ainda de bombas peristálticas que permitem controlar o pH, pela adição de soluções ácidas e básicas, a formação de espuma, mediante adição de antiespumante, e ainda a adição de nutrientes, o que não foi utilizado no presente trabalho. A agitação do meio é realizada por duas turbinas que têm por finalidade agitar a solução (situada no centro do meio líquido) e quebrar a espuma formada no decorrer da fermentação (situada um pouco acima do nível de líquido). O ar, proveniente de um compressor, passa por um filtro estéril antes de ser alimentado ao meio, sendo sua vazão medida através de um rotâmetro.

Utilizou-se 3,6 L de meio PAY (mostrado na Tabela 3.3), inoculados com 400 mL de inóculo (preparado conforme descrito no item 3.3). A temperatura, a agitação e a vazão de ar foram mantidas constantes em todos os ensaios a 37°C, 700 rpm e 600 mL ar/min, respectivamente. O pH foi controlado mediante a adição de ácido sulfúrico 2N ou hidróxido

de potássio 5N para permanecer em 5,5, 6,0 ou 6,5, dependendo do ensaio. A formação de espuma foi controlada pela adição de 1 mL de antiespumante polipropilenoglicol (AVERAGE M_n ca. 2000 – ALDRICH CHEMICAL COMPANY, INC).

3.6 Métodos analíticos

3.6.1 Amostragem

3.6.1.1 Ensaio preliminares em frascos agitados

Foram retiradas alíquotas de aproximadamente 3mL 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 da fermentação. As amostras foram coletadas com pipetas estéreis, junto à chama do bico de Bunsen.

3.6.1.2 Ensaio em fermentador

Retirou-se alíquotas de aproximadamente 12 mL em intervalos de tempo de 2 horas na fase inicial do processo, 1 hora durante a fase exponencial e 2 horas no decorrer da fermentação. As amostras foram coletadas através de um coletor acoplado ao fermentador.

3.6.2 Avaliação da contaminação

Corou-se lâminas através do Teste de Gram para análise em microscópio, a fim de verificar a incidência de outros microrganismos no caldo fermentativo.

Sobre o esfregaço confeccionado com a amostra coletada no último ponto da fermentação 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.

3.6.3 Determinação da concentração celular

A concentração celular no decorrer dos ensaios fermentativos foi determinada por dois métodos: indiretamente por turbidimetria e diretamente por gravimetria (Leveau & Bouix, 1984; Teixeira, 1999).

A absorbância das amostras foi medida a um comprimento de onda de 540 nm em espectrofotômetro CELM modelo E225D, em cubetas cilíndricas de vidro com 1 cm 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 coletou-se 10 mL da suspensão celular no final do ensaio fermentativo, os quais foram filtrados a vácuo, em filtro Milipore com membrana de acetato de celulose (Sartorius) de 0,2 µm, seca em estufa a 105°C por 24 horas e previamente tarada. Após secagem a 105°C até peso constante, a membrana contendo as células foi pesada e a biomassa determinada pela diferença de peso seco. Esta etapa foi realizada em triplicata. A concentração celular (g/L) foi obtida dividindo-se a massa média de células seca (g) pelo volume de suspensão filtrado (10 mL).

Simultaneamente, coletou-se 15 mL do caldo fermentativo, os quais foram divididos em cinco alíquotas que foram diluídas na faixa de 1:4 a 1:60, de acordo com o experimento. Para cada diluição fez-se a leitura da absorbância a 540 nm. A concentração celular obtida por gravimetria foi dividida por cada um dos fatores de diluição utilizados. A curva de calibração foi então plotada correlacionando-se a concentração celular (g/L) com a absorbância lida a 540 nm.

3.6.4 Dosagem de glicose

A concentração de glicose foi determinada através do *kit* colorimétrico Enz Color (Biodiagnóstica Indústria Química Clínica Ltda.).

Adicionou-se 2 mL do reagente glicose Enz Color a alíquotas de 20 µL 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 500 nm, em espectrofotômetro CELM modelo E225D com cubetas de vidro cilíndricas de 1 cm de diâmetro.

A concentração de glicose foi determinada através da equação 3.1.

$$\text{conc. glicose (g/L)} = \frac{\text{absorbância da amostra}}{\text{absorbância do padrão}} \times \text{diluição} \quad (3.1)$$

A reação é linear até 4 g/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 ensaios fermentativos foram centrifugadas a 15000 rpm, 15°C, durante 5 minutos em centrífuga SIGMA Laboratory Centrifuges modelo 2K15 e armazenadas sob refrigeração a -4°C, para posterior análise cromatográfica.

As dosagens de acetoína foram realizadas em cromatógrafo a gás Ciola & Gregori modelo CG 86.10 equipado com detector de ionização de chama e coluna megabore Restek MXT-5 (53 mm de diâmetro e 15 m de comprimento).

Utilizou-se hélio como gás de arraste, a uma vazão de 10 mL/min. Como gases de chama foram utilizados hidrogênio a 18 mL/min e ar a 245 mL/min. A temperatura da coluna foi programada para permanecer em 180°C e as temperaturas do detector e do injetor foram, respectivamente, 240°C e 180°C. Injetou-se manualmente um volume de 0,5 µL de amostra. Os cromatogramas foram obtidos através do programa PEAKSIMPLE II - W (PK2 - W).

A curva de calibração foi construída a partir de um padrão de acetoína (Merck).

(No Apêndice II são mostrados alguns cromatogramas e a curva de calibração para dosagem de acetoína).

3.7 Planejamento Experimental

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

Para realizar um experimento de forma eficiente, deve ser utilizada uma abordagem científica para o seu planejamento. Tal abordagem é identificada por meio do termo "planejamento estatístico de experimentos", o qual se refere ao planejamento do experimento de forma que dados apropriados sejam coletados em tempo e custos mínimos. A análise destes dados por meio de técnicas estatísticas resultará em conclusões confiáveis. É importante ressaltar que a utilização das técnicas estatísticas é a única abordagem objetiva de análise quando o problema envolve dados que estão sujeitos a erros experimentais, tais como os dados coletados para o gerenciamento de processos. Assim, qualquer estudo experimental envolve duas etapas básicas: o planejamento do experimento e a análise estatística de dados. Estas etapas estão intimamente relacionadas, uma vez que a técnica de análise depende diretamente do planejamento utilizado (Werkema & Aguiar, 1996).

O planejamento experimental é frequentemente utilizado em estudos de processos para investigações qualitativas ou quantitativas, avaliando o efeito das variáveis de entrada (fatores) sobre as variáveis de saída (respostas) (Box *et al.*, 1978).

Uma vez definidos os fatores e respostas para o sistema em estudo, necessita-se ainda especificar os níveis (valores) nos quais cada fator será investigado para, então, elaborar o planejamento fatorial, em função do qual serão definidas as condições experimentais do processo.

O planejamento fatorial no qual todas as variáveis são estudadas em apenas dois níveis é o mais simples. Desta forma, havendo "k" fatores, ou seja, "k" variáveis controladas serão necessários 2^k ensaios para investigar todas as combinações possíveis destas variáveis.

Para avaliar o erro experimental associado aos ensaios e ao experimentador são realizados ensaios em duplicata ou triplicata nas condições intermediárias entre os dois níveis atribuídos a cada variável, que corresponde ao nível zero ou ponto central (Barros Neto *et al.*, 1995).

Uma vez determinados os resultados do planejamento, é possível estimar os efeitos principais e de interação das variáveis de entrada sobre as respostas do processo, especificar os efeitos significativos e ajustar o modelo que melhor correlaciona as variáveis de entrada e de saída.

O efeito de um determinado fator é definido como a mudança sofrida pela variável resposta quando passa do nível mais baixo para o nível mais alto do referido fator. Se o comportamento de um fator não é o mesmo nos outros níveis de um segundo fator, há interação entre os mesmos (Werkema & Aguiar, 1996).

A metodologia de superfície de resposta (RSM, de *Response Surface Methodology*) tem sido empregada satisfatoriamente na análise, modelagem e otimização de diversos processos industriais. A modelagem usualmente é feita através do ajuste de modelos lineares ou quadráticos aos resultados experimentais obtidos a partir de planejamentos fatoriais (Barros Neto *et al.*, 1995).

No caso do presente trabalho, foi elaborado um planejamento fatorial completo adicionado de ponto central, onde realizou-se ensaio em duplicata, para estimar-se o erro experimental. A modelagem do processo em estudo foi feita utilizando-se a metodologia de superfície de resposta.

A produção de acetoina por *Bacillus polymyxa*, neste trabalho, foi estudada a temperatura de 37°C, 700 rpm de agitação, 600 mL ar/min, com variação da concentração inicial de glicose (x_1) e pH do meio de cultura (x_2), que são as variáveis

independentes ou variáveis de entrada do processo; como resposta foi obtida a variável dependente ou variável de saída: concentração máxima de acetoína (y_1).

Na Tabela 3.4 são mostrados os valores fixados para as variáveis independentes e as respectivas codificações. para os níveis

Tabela 3.4 – Valores referentes aos níveis codificados para as variáveis independentes

Variáveis independentes	Símbolo	Código de níveis		
		-1	0	+1
concentração inicial de glicose (g/L)	x_1	30	40	50
pH do meio de cultivo	x_2	5,5	6,0	6,5

O planejamento fatorial completo adicionado de ponto central resultou num total de seis ensaios realizados em ordem aleatória, os quais são mostrados na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 – Ensaios realizados no planejamento 2^2 completo com ponto central

Ensaio	x_1	x_2
1	-1	-1
2	-1	+1
3	+1	-1
4	+1	+1
5	0	0
5 (réplica)	0	0

A aleatorização dos experimentos permite que os efeitos de fatores não controlados que afetam a variável resposta e que podem estar presentes durante a realização do experimento sejam balanceados entre todas as medidas. Tal balanceamento evita possíveis equívocos na avaliação dos resultados devido à atuação desses fatores (Werkema & Aguiar, 1996).

O modelo estatístico obtido pelo planejamento é representado genericamente pela equação 3.2.

$$y(x_1, x_2) = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b'_1x_1^2 + b'_2x_2^2 + b_{12}x_1x_2 + b''_{12}x_1^2x_2 + b'''_{12}x_1x_2^2 + b'''_{12}x_1^2x_2^2 \quad (3.2)$$

onde:

- y: estimativa dos valores populacionais das respostas
- b_0, b_1, b_2, b_{12} : coeficientes de regressão relativos aos efeitos principais lineares (x_1, x_2) e efeitos de interação (x_1x_2)
- $b'_1, b'_2, b''_{12}, b'''_{12}, b'''_{12}$: coeficientes de regressão relativos aos efeitos principais quadráticos (x_1^2, x_2^2) e efeitos de interação ($x_1^2x_2, x_1x_2^2, x_1^2x_2^2$)

A avaliação da eficiência do modelo foi analisada com relação à média global, a partir dos desvios das observações, conforme indicado por Barros Neto (1996):

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

onde:

- n_i : número de repetições do nível i
- m: número dos diferentes níveis
- \bar{y} : média global das respostas
- y_{ij} : respostas observadas
- SQ_T : soma quadrática total

A soma quadrática total corresponde a:

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

onde:

- SQ_R : soma dos quadrados da regressão
- SQ_r : soma dos quadrados do resíduo

A soma quadrática residual (SQ_r) é correspondente a:

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

onde:

- SQ_{ep} : soma quadrática devido ao erro puro, que mede o erro aleatório que afeta a resposta (Barros Neto *et al* 1995).
- SQ_{faj} : soma quadrática devido a falta de ajuste do modelo em relação às respostas observadas (Box *et al*, 1978).

Para o ajuste dos parâmetros do modelo pelo método dos mínimos quadrados fez-se a análise da variância, conforme mostrado na Tabela 3.6.

Tabela 3.6 – Tabela de análise de variância para o ajuste dos parâmetros do modelo pelo método dos mínimos quadrados

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática
Regressão	$SQ_R = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	$p - 1$	$MQ_R = \frac{SQ_R}{p - 1}$
Resíduos	$SQ_r = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_i - \hat{y}_i)^2$	$n - p$	$MQ_r = \frac{SQ_r}{n - p}$
Falta de ajuste	$SQ_{faj} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$	$m - p$	$MQ_{faj} = \frac{SQ_{faj}}{m - p}$
Erro puro	$SQ_{ep} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	$n - m$	$MQ_{ep} = \frac{SQ_{ep}}{n - m}$
Soma quadrática total	$SQ_T = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2$	$n - 1$	

$$\% \text{ de variação explicada: } \frac{SQ_R}{SQ_T}$$

$$\% \text{ máxima de variação explicada: } \frac{SQ_T - SQ_{ep}}{SQ_T}$$

onde:

- \hat{y}_i : valor estimado pelo modelo
- p : número de parâmetros do modelo
- n : número total de observações (ensaios)
- MQ_{faj} : média quadrática da falta de ajuste
- MQ_{ep} : média quadrática do erro puro

Segundo Barros Netos *et al.* (1995), o teste F de significância tem seu maior emprego nas análises de variância dos delineamentos experimentais, definindo-se o F calculado como sendo o quociente da média dos quadrados devido à regressão pela média dos quadrados do resíduo. Assim:

$$F = \frac{MQ_R}{MQ_r} \quad (3.6)$$

onde:

- MQ_R : média dos quadrados da regressão
- MQ_r : média dos quadrados do resíduo

O valor de F calculado pela equação (3.6) é então comparado ao valor de F tabelado, no nível de confiança desejado pelo método, de forma que:

$$F_{v_1, v_2} \approx \frac{MQ_R}{MQ_r} \quad (3.7)$$

onde:

- F_{v_1, v_2} : F tabelado, no nível de confiança desejado
- v_1 : graus de liberdade da regressão
- v_2 : graus de liberdade do resíduo

Para que a regressão tenha fins preditivos e não possua unicamente significância estatística, o valor de F calculado deve exceder, no mínimo, quatro vezes o valor de F tabelado, estabelecido a partir do intervalo de confiança aceito pelo método utilizado (Barros Neto *et al.*, 1995).

3.8 Metodologia utilizada nos cálculos

3.8.1 Fatores de conversão

O fator de conversão de substrato (glicose) em células foi determinado pela equação 3.8:

$$Y_{X/S} \text{ (g/g)} = -\frac{dX}{dS} \quad (3.8)$$

Plotando-se os valores de concentração celular *versus* o consumo de substrato associado ao crescimento de células obtém-se uma reta cujo coeficiente angular é o fator de conversão substrato em células ($Y_{X/S}$).

O fator de conversão de substrato (glicose) em produto (acetofina) foi determinado pela equação 3.9:

$$Y_{P/S} \text{ (g/g)} = -\frac{dP}{dS} \quad (3.9)$$

Plotando-se os valores de concentração de produto *versus* o consumo de substrato associado a sua formação obtém-se uma reta cujo coeficiente angular é o fator de conversão substrato em produto ($Y_{P/S}$).

3.8.2 Velocidades específicas de crescimento na fase exponencial

As velocidades específicas de crescimento microbiano para cada ensaio foram determinadas a partir das curvas de concentração celular, de acordo com a equação 3.10:

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (3.10)$$

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.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ensaios preliminares em frascos agitados

Com o objetivo de verificar algumas características da bactéria *Bacillus polymyxa* quanto ao seu crescimento e produção de acetoina foram realizados alguns ensaios em frascos agitados, avaliando-se a influência do pH inicial e da concentração inicial de glicose.

Na Tabela 4.1 são apresentados os resultados obtidos nos ensaios preliminares.

Tabela 4.1 – Resultados obtidos nos ensaios preliminares em frascos agitados

Ensaio	Glicose (g/L)	pH inicial	μ (h^{-1})	$X_{\text{máx}}$ (g/L)	C_{acetoina} (g/L)
A	30	5,5	0,23	1,17	2,33
B	50	5,5	0,27	1,34	3,07
C	30	6,5	0,33	3,49	1,25
D	50	6,5	0,41	3,49	2,37

* C_{acetoina} – concentração máxima de acetoina; $X_{\text{máx}}$ – concentração celular máxima
 μ - velocidade específica de crescimento

Observando-se a Tabela 4.1 constata-se que a concentração máxima em acetoina foi produzida no ensaio B (concentração inicial de glicose em 50 g/L e pH 5,5), enquanto que as concentrações celulares máximas foram obtidas nos ensaios C (concentração inicial de glicose em 30 g/L e pH 6,5) e D (concentração inicial de glicose em 50 g/L e pH 6,5).

As maiores velocidades específicas de crescimento (fase exponencial) foram obtidas nos ensaios em pH 6,5, conforme mostrado na Tabela 4.1. (A velocidade específica de crescimento da fase exponencial para cada ensaio foi determinada a partir dos gráficos do Apêndice III).

As Figuras 4.1 a 4.4 mostram as curvas de crescimento celular, consumo de substrato e produção de acetoina para os ensaios preliminares. (As tabelas geradoras dessas figuras encontram-se no Apêndice IV).

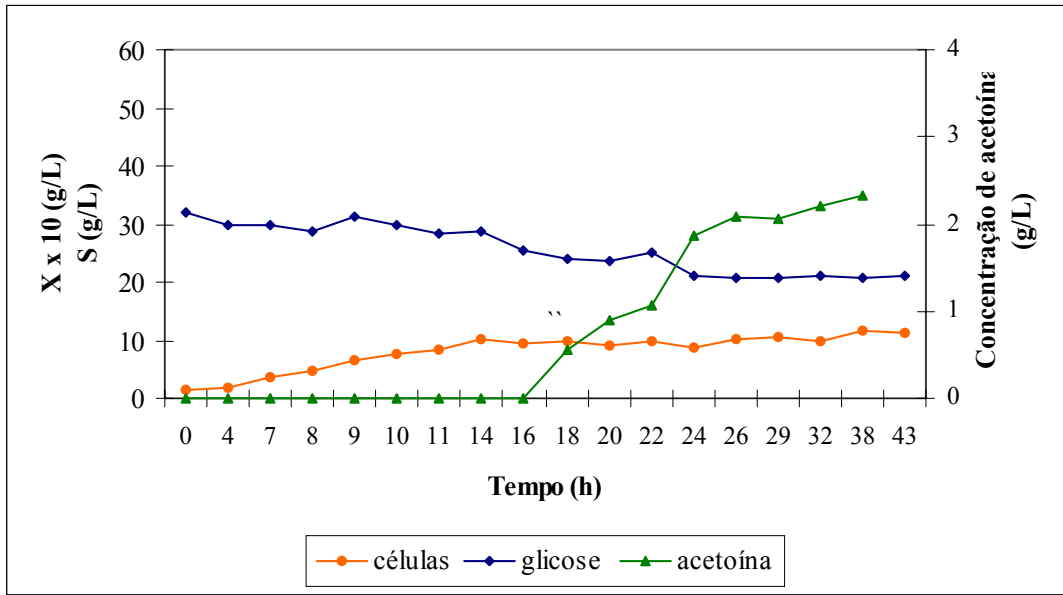


Figura 4.1 - Produção de acetoína e células e consumo de glicose para o ensaio A ([glicose]=30 g/L; pH=5,5)

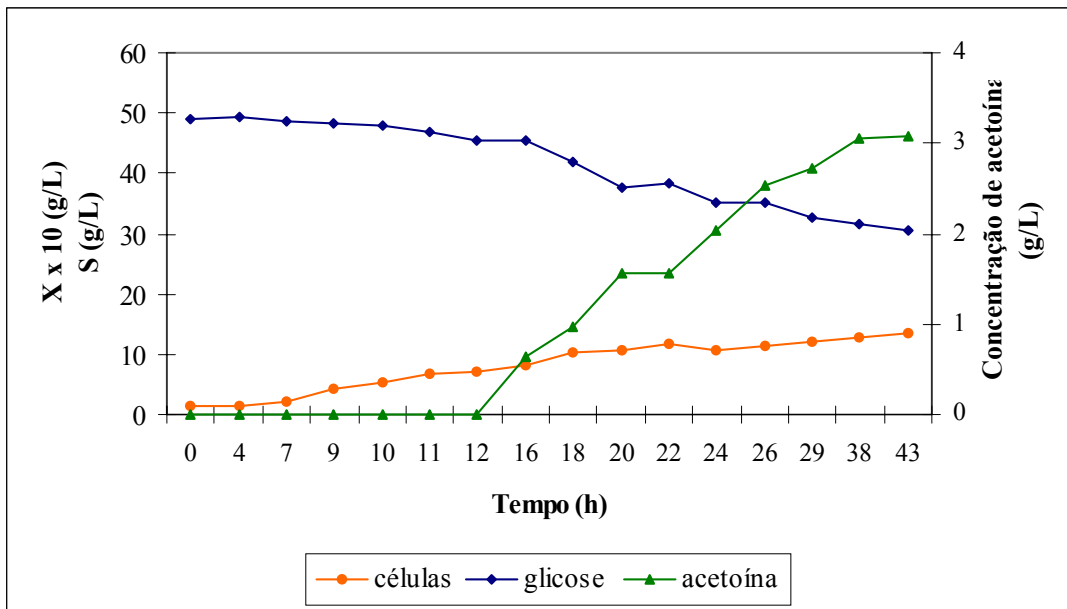


Figura 4.2- Produção de acetoína e células e consumo de glicose para o ensaio B ([glicose]=50 g/L; pH=5,5)

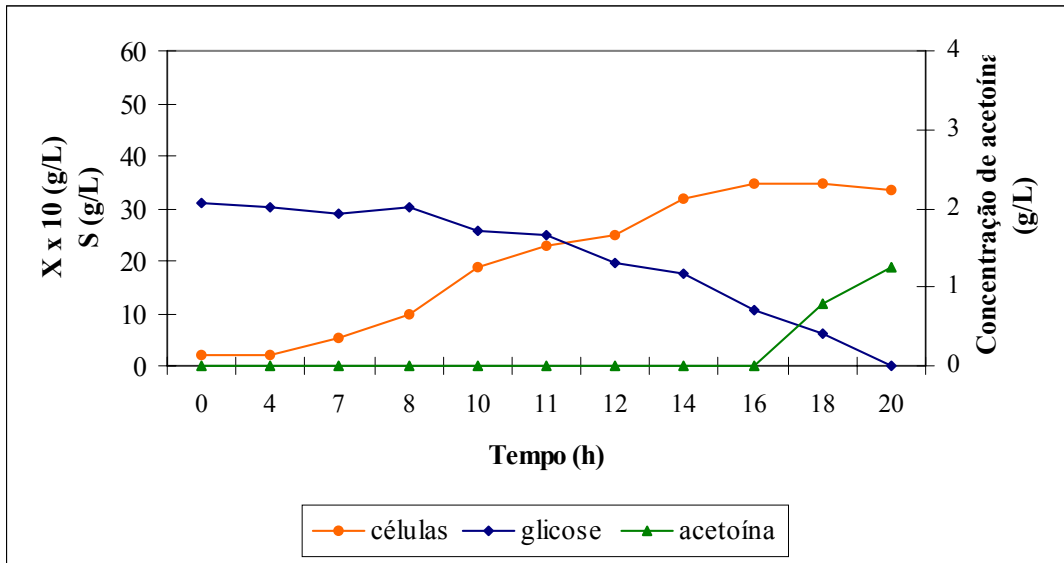


Figura 4.3 - Produção de acetoina e células e consumo de glicose para o ensaio C ([glicose]=30 g/L; pH=6,5)

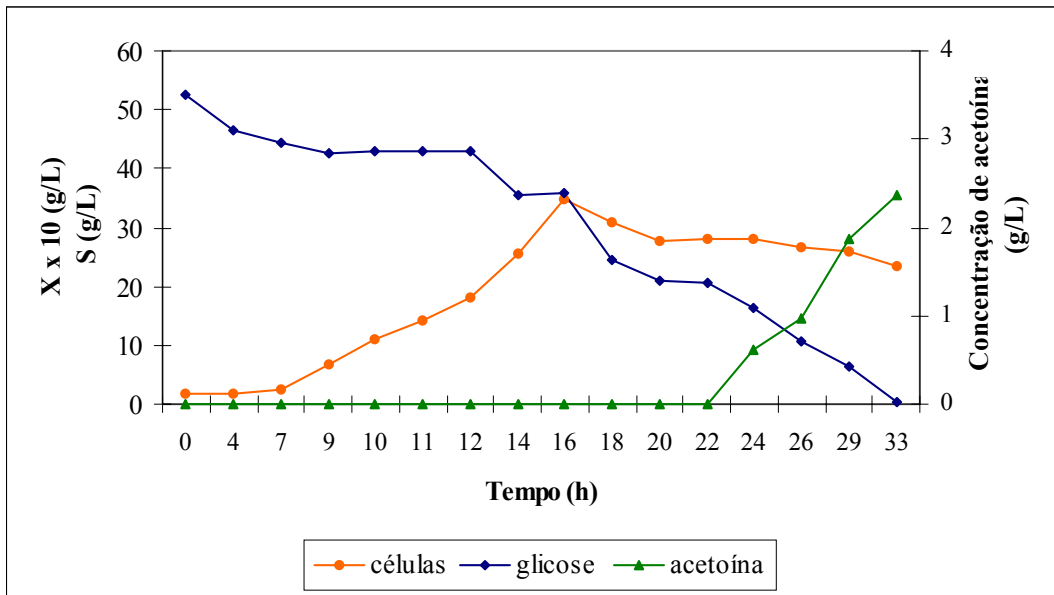


Figura 4.4 - Produção de acetoina e células e consumo de glicose para o ensaio D ([glicose]=50 g/L; pH=6,5)

Conforme mostrado nas Figuras 4.1 a 4.4, verifica-se que a produção de acetoina teve início durante a fase estacionária, exceto no ensaio B (Figura 4.2), onde teores do produto começaram a ser detectados ainda na fase exponencial de crescimento.

O crescimento celular foi lento nos ensaios em pH 5,5 (Figuras 4.1 e 4.2), confirmando que as bactérias crescem mais lentamente em pH baixo, de acordo com dados já relatados na literatura (Teixeira, 1999).

Nos ensaios em pH 6,5 (Figuras 4.3 e 4.4) houve consumo total de substrato, mas os ensaios em pH 5,5 (Figuras 4.1 e 4.2) foram finalizados após 43 horas sem que o substrato tenha sido totalmente consumido, porque a retirada de mais alíquotas do caldo fermentativo ultrapassaria os dez por cento do volume total, que corresponde à quota permitida. Acima deste valor a redução do volume do meio de cultivo passa a ser considerável.

Na Tabela 4.2 são mostrados o fator de conversão substrato em células ($Y_{X/S}$) e o fator de conversão substrato em produto ($Y_{P/S}$) para os ensaios preliminares. Em alguns experimentos não foi possível determiná-los porque houve grande dispersão dos pontos. (Os gráficos para determinação dos fatores de conversão estão no Apêndice V).

Tabela 4.2 – Fator de conversão substrato em células ($Y_{X/S}$), fator de conversão substrato em produto ($Y_{P/S}$) para os ensaios preliminares

Ensaio	Glicose (g/L)	pH inicial	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)
A	30	5,5	-	0,33
B	50	5,5	0,17	0,18
C	30	6,5	-	-
D	50	6,5	-	0,12

De acordo com a Tabela 4.2, no ensaio A (pH 5,5) o fator de conversão substrato em produto ($Y_{P/S}$) foi maior que o alcançado nos ensaios C e D (pH 6,5). Nos ensaios em biorreator, cujos resultados são apresentados a seguir (Tabela 4.7 - item 4.2.2), verificar-se-á que o parâmetro em questão ($Y_{P/S}$) também apresenta comportamento semelhante.

4.2 Ensaio em fermentador

Com base nos resultados obtidos nos ensaios preliminares em frascos agitados, realizou-se experimentos em fermentador com a finalidade de melhorar as condições de agitação e aeração, visando à obtenção de concentrações mais elevadas de acetoina.

4.2.1 Planejamento experimental

Elaborou-se um planejamento fatorial completo adicionado de ponto central para avaliar a influência da concentração inicial de substrato e pH do meio de cultivo sobre a produção de acetoina, conforme mencionado no item 3.7.

O planejamento fatorial completo adicionado de ponto central resultou num total de seis ensaios realizados em ordem aleatória e com duplicata no ponto central.

A produção de acetoina pela bactéria *Bacillus polymyxa*, nesta segunda etapa do trabalho, foi estudada a temperatura de 37°C, 700 rpm de agitação, 600 mL ar/min, com variação da concentração inicial de glicose (x_1) e pH do meio de cultura (x_2), que são as variáveis independentes; como resposta foi obtida a variável dependente: concentração máxima de acetoina (y_1).

Os resultados obtidos para avaliação dos efeitos das variáveis independentes sobre a variável dependente são apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Resultados do planejamento fatorial 2² adicionado de ponto central

Ensaio	Glicose (g/L)	pH	C _{acetoina} (g/L)
1	30	5,5	6,25
2	30	6,5	4,10
3	50	5,5	7,97
4	50	6,5	7,37
5	40	6,0	6,15
5 (réplica)	40	6,0	6,68

*ensaios realizados em ordem aleatória

Os dados do planejamento fatorial foram analisados através da Análise de Projeto Fatorial com fatores em dois níveis (Box *et al.*, 1978), utilizando-se o programa Statistica® (StatSoft™). Determinou-se o efeito dos fatores sobre as respostas e avaliou-se a sua significância estatística através do nível p.

As estimativas dos efeitos principais e de interação das variáveis independentes sobre a variável dependente são apresentados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4- Efeitos das variáveis independentes sobre a resposta em concentração máxima de acetoina (C_{acetoina})

Variáveis independentes	Efeito sobre a C_{acetoina}	Desvio padrão	p
[glicose] - x_1	2,4995*	0,2640	0,01098
pH - x_2	-1,3765*	0,2640	0,03493
[glicose] x pH - $x_1 * x_2$	0,7745	0,2640	0,09923

*efeitos significativos num intervalo de 95% de confiança

A Figura 4.5 apresenta a carta de Pareto para o modelo de concentração máxima em acetoina.

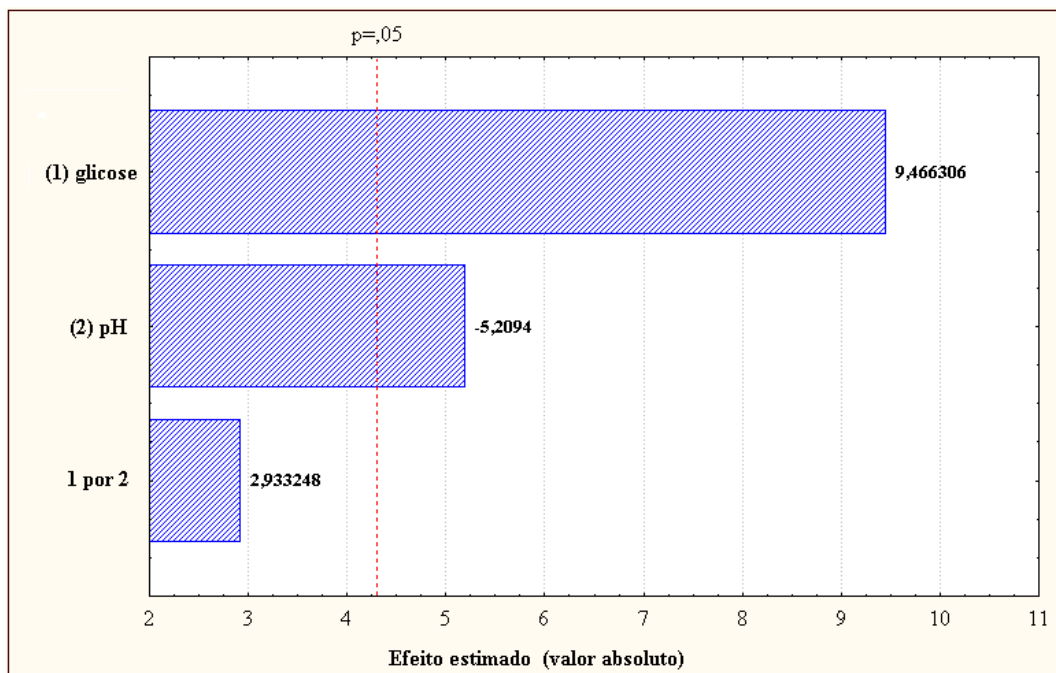


Figura 4.5 – Carta de Pareto para os efeitos das variáveis sobre a concentração máxima em acetoina

Conforme observa-se na Tabela 4.4 e Figura 4.5, os efeitos da concentração inicial de glicose e do pH mostraram-se significativos a um nível de 95% de confiança para a resposta em concentração máxima de acetoina. O efeito de interação entre as duas variáveis não foi significativo.

Os coeficientes de regressão estimados para o modelo proposto são apresentados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 - Coeficientes de regressão (codificados) para o modelo estimado para concentração máxima de acetoina

Parâmetro	Coeficientes de regressão	Desvio padrão
Média	6,4178*	0,1078
[glicose] – x_1	1,2498*	0,1320
pH - x_2	-0,6878*	0,1320
[glicose] x pH – x_1*x_2	0,3873	0,1320

*efeitos significativos num intervalo de 95% de confiança

Para verificar a significância estatística do modelo obtido, fez-se a análise de variância para ajuste dos parâmetros, a qual é apresentada na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 - Análise da variância para avaliação da significância estatística do modelo estimado para a concentração máxima em acetoina

Causa da variação	SQ	GL	MQ	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	8,7396	3	8,7396	125,35	19,16
Resíduos	0,1394	2	0,06972		
Total	8,8789	5			

* variação explicada: 98,43%

nível de significância: 95%

De acordo com Barros Netos *et al.* (1995), para que a regressão seja estatisticamente significativa o valor de F calculado deve ser maior que o valor de F tabelado. Para que o modelo seja também útil para fins preditivos, o valor de F calculado deve exceder em, no mínimo, quatro vezes o valor de F tabelado.

Em face ao exposto, constata-se pela Tabela 4.6 que modelo estimado para a concentração máxima em acetoina, além de possuir significância estatística, também aplica-se a fins preditivos.

Na Figura 4.6 mostra-se o gráfico dos valores de concentração de acetoina observados em função dos valores de concentração de acetoina preditos pelo modelo.

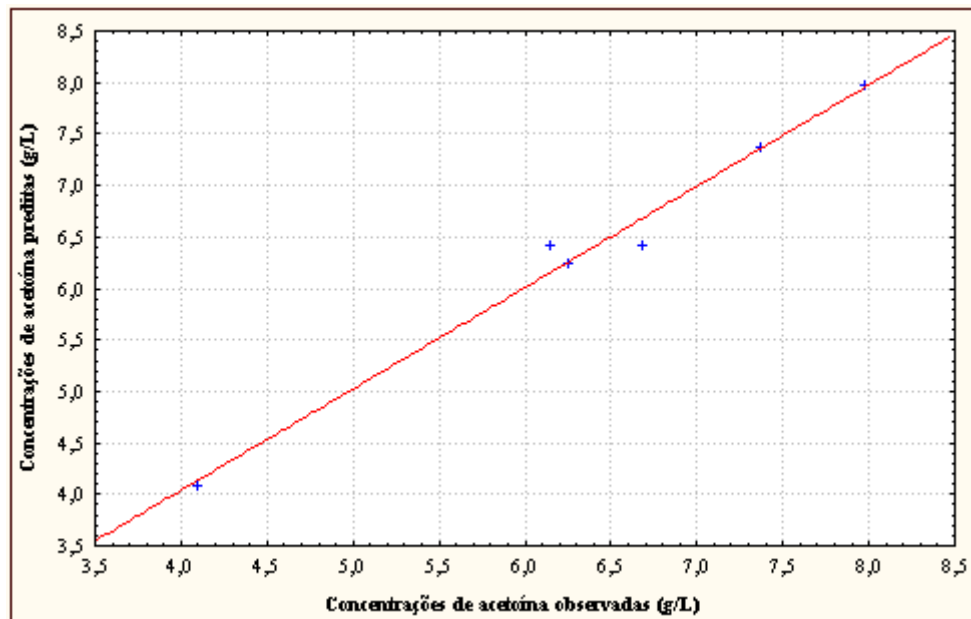


Figura 4.6 – Concentrações de acetoina observadas em função das concentrações de acetoina previstas pelo modelo experimental

Substituindo-se na Equação 3.2, mostrada no item 3.7, os coeficientes de regressão estimados, apresentados na Tabela 4.5, e considerando-se unicamente os efeitos significativos estatisticamente, obtém-se a Equação 4.1, representativa do modelo.

$$C_{\text{acetoina}} = 6,4178 + 1,2498x_1 - 0,6878x_2 \quad (4.1)$$

A resposta em concentração máxima em acetoina é um parâmetro muito importante, porque nos processos biotecnológicos a etapa de separação é a que envolve maiores custos e, quanto maior a concentração de produto extraído do meio fermentativo, tanto maior é o rendimento do processo.

A Figura 4.7 mostra a superfície de resposta gerada pelo modelo de concentração máxima em acetoina.

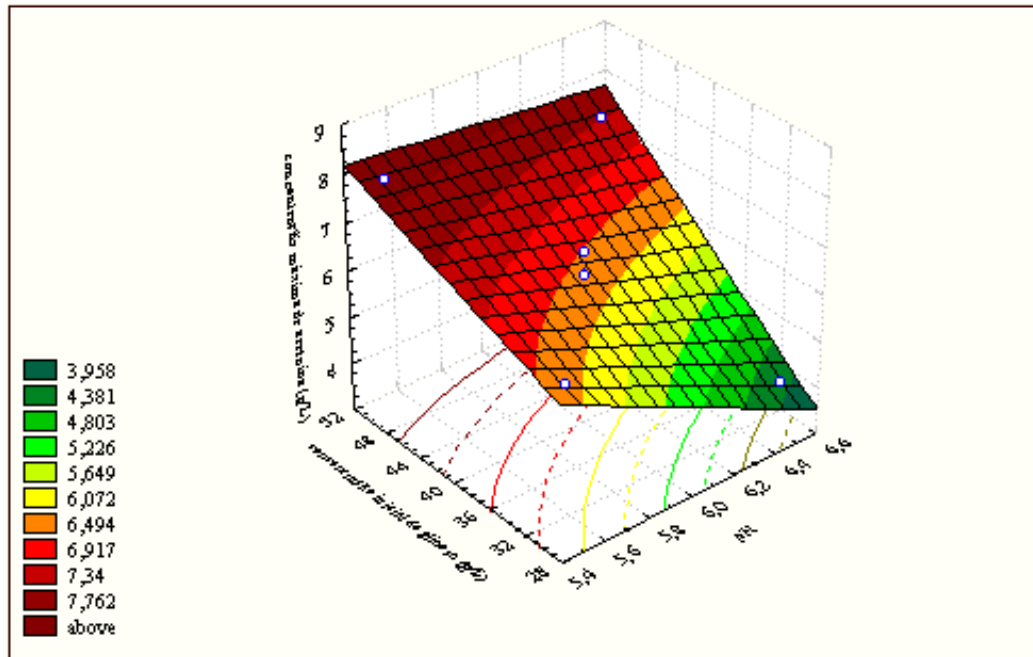


Figura 4.7 – Superfície de resposta obtida para o modelo estimado para a concentração máxima em acetóina

Analisando-se a superfície de resposta mostrada na Figura 4.7 verifica-se que a obtenção de maiores teores de acetóina é favorecida pelo aumento da concentração inicial de substrato (glicose) e decréscimo do pH do meio de cultivo, dentro da faixa dos valores estudados.

Na Figura 4.8 apresenta-se o gráfico das curvas de nível, correspondente à projeção da superfície de resposta no plano bidimensional. As linhas coloridas mostradas no gráfico indicam determinados valores de concentração de acetóina. O ponto correspondente à máxima concentração em produto obtida (concentração inicial de glicose em 50 g/L e pH 5,5) está situado logo acima da linha referente ao valor mais alto de concentração de acetóina (7,762 g/L).

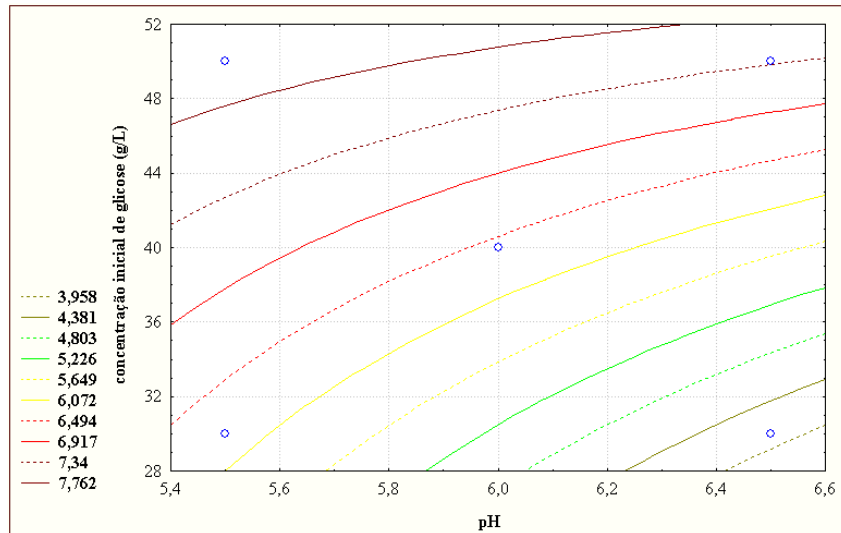


Figura 4.8 – Curvas de nível do modelo obtido para a concentração máxima em acetoina

4.2.2 Cinética de crescimento celular e produção de acetoina

Nas Figuras 4.9 a 4.14 são mostrados os gráficos com as curvas de crescimento, produção de acetoina e consumo de glicose obtidas para os experimentos realizados. (As tabelas contendo os dados utilizados para plotar os gráficos encontram-se no Apêndice VI).

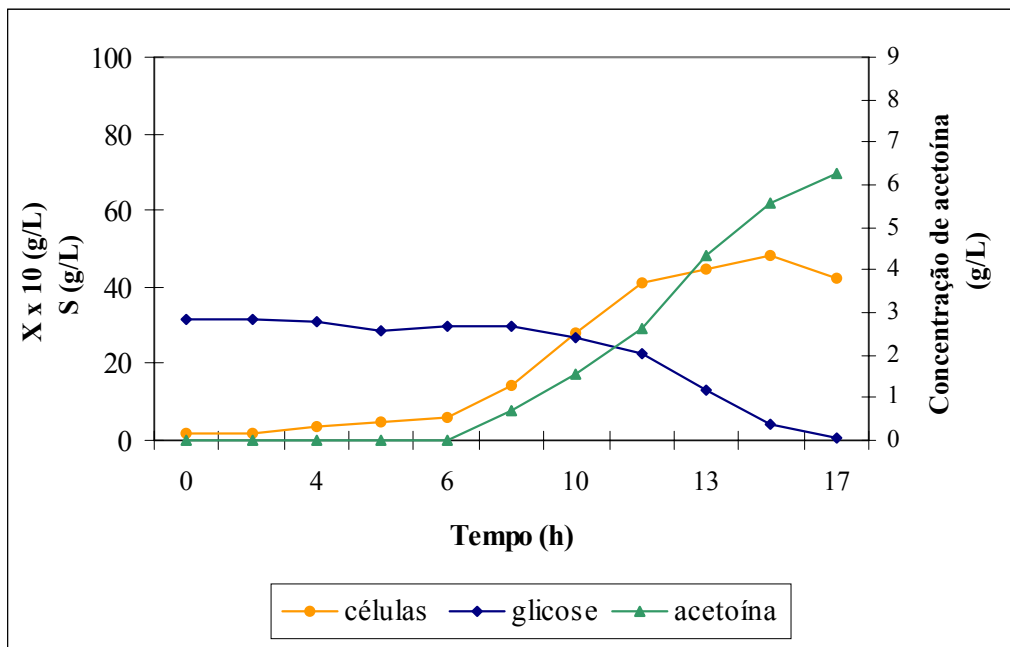


Figura 4.9 – Produção de acetoina e células e consumo de glicose para o ensaio 1 ([glicose]=30 g/L; pH=5,5)

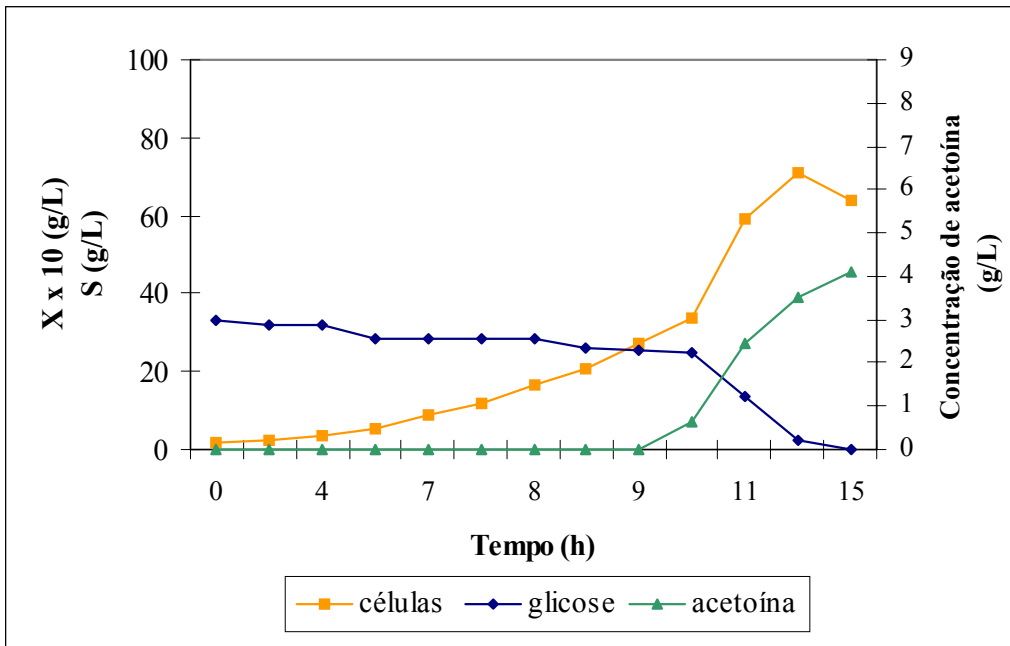


Figura 4.10 – Produção de acetoína e células e consumo de glicose para o ensaio 2 ([glicose]=30 g/L; pH=6,5)

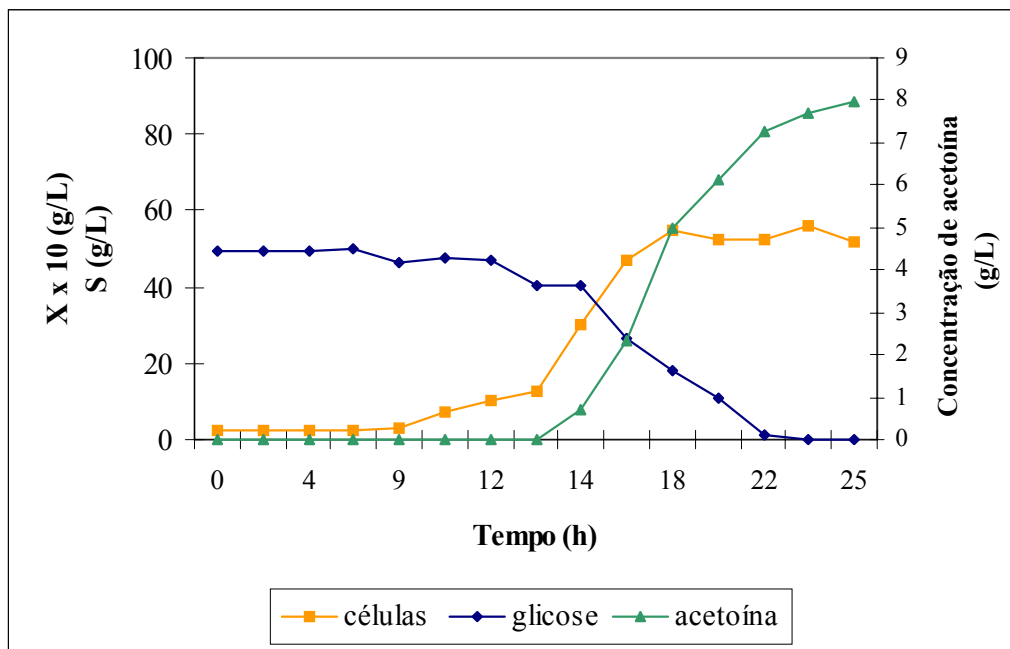


Figura 4.11 – Produção de acetoína e células e consumo de glicose para o ensaio 3 ([glicose]=50 g/L; pH=5,5)

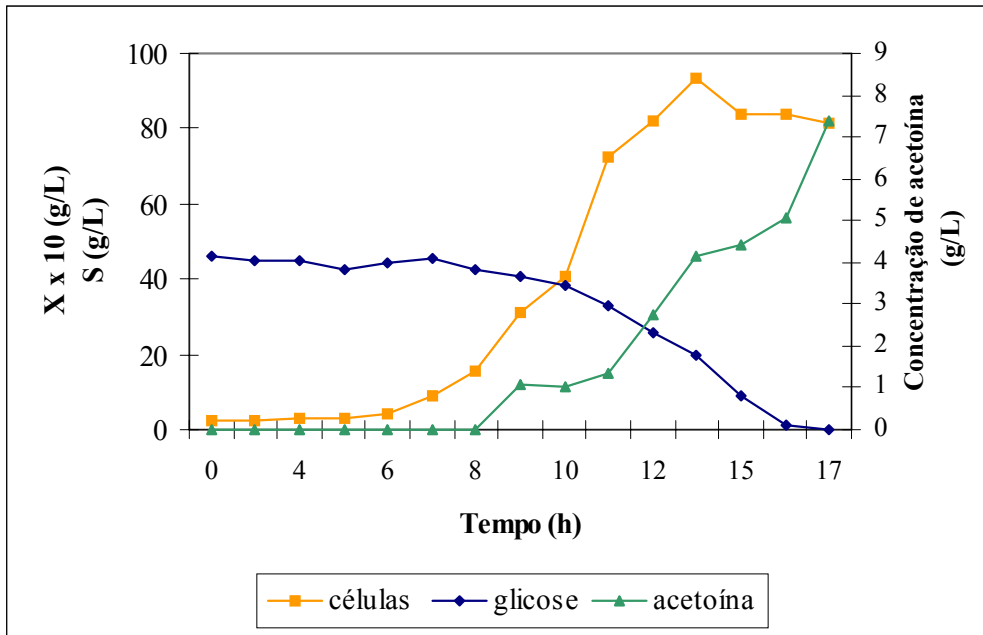


Figura 4.12 – Produção de acetoina e células e consumo de glicose para o ensaio 4 ([glicose]=50 g/L; pH=6,5)

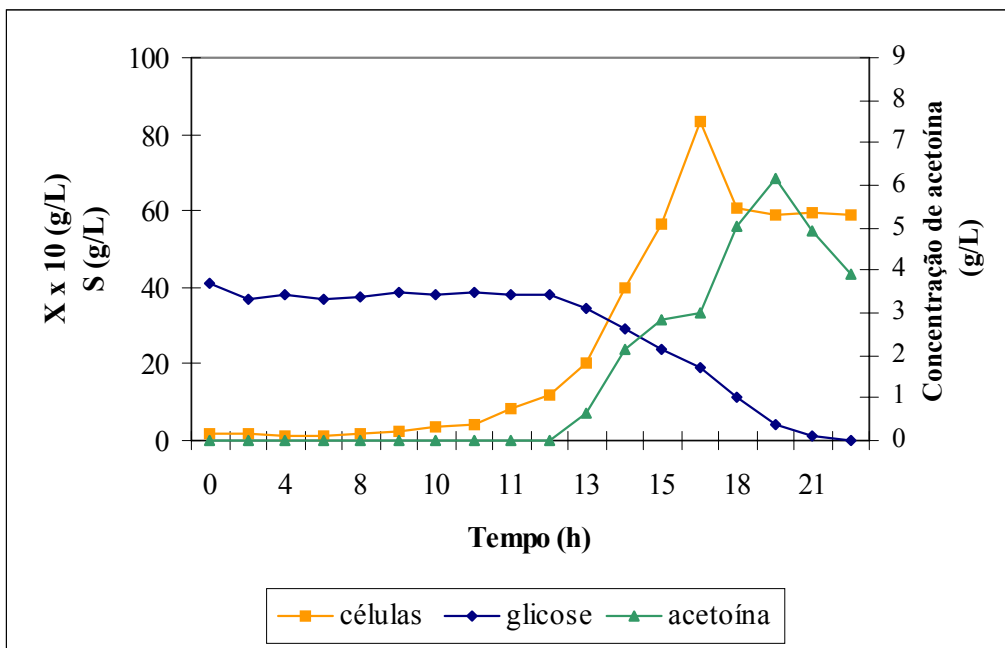


Figura 4.13 – Produção de acetoina e células e consumo de glicose para o ensaio 5 ([glicose]=40 g/L; pH=6,0)

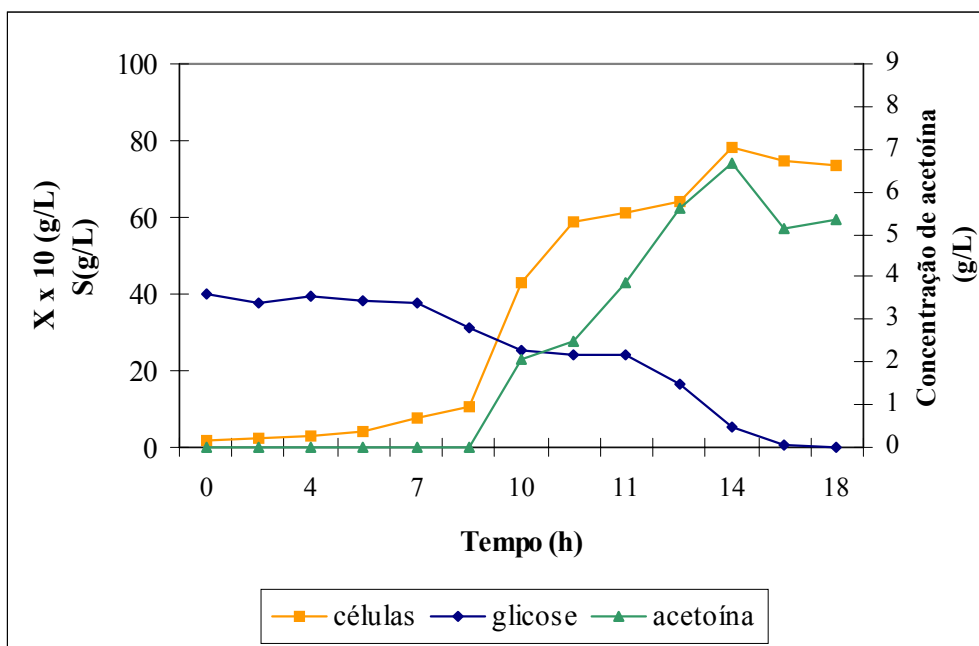


Figura 4.14 – Produção de acetoina e células e consumo de glicose para o ensaio 5 réplica - ([glicose]=40 g/L; pH=6,0)

Analisando-se as Figuras 4.9 a 4.14 observa-se que a produção de acetoina esteve associada ao crescimento celular.

No ensaio 5 e sua respectiva réplica, a produção de acetoina decaiu após ter atingido um valor máximo. Não se sabe ao certo a causa deste decréscimo. Descarta-se a possibilidade de ter havido perdas por volatilização, pois o ponto de ebulição da acetoina é 148°C e os ensaios foram conduzidos a 37°C. Como o crescimento celular já estava em fase estacionária não é provável que o referido composto tenha sido utilizado como fonte de carbono pelas células. Uma possível explicação é que a acetoina tenha sido reduzida a 2,3-butanodiol, que é o produto imediatamente posterior na rota metabólica.

Na Tabela 4.7 são mostrados a concentração máxima de acetoina produzida em cada ensaio, a concentração celular máxima, o fator de conversão substrato em células ($Y_{X/S}$), calculado durante a fase de crescimento exponencial, o fator de conversão substrato em produto ($Y_{P/S}$), e a velocidade específica de crescimento (μ) da fase exponencial. (Os gráficos plotados para determinação do fator de conversão substrato em células encontram-se no Apêndice VII e os gráficos para determinação do fator de conversão substrato em produto estão no Apêndice VIII. A velocidade

específica de crescimento foi calculada a partir dos gráficos apresentados no Apêndice IX).

Tabela 4.7 – Fator de conversão substrato em células ($Y_{X/S}$), fator de conversão substrato em produto ($Y_{P/S}$) e velocidade específica de crescimento (μ) da fase exponencial

Ensaio	Glicose (g/L)	pH	$Y_{P/S}$ (g/g)	$C_{\text{acetoína}}$ (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$X_{\text{máx}}$ (g/L)	μ (h⁻¹)
1	30	5,5	0,18	6,25	0,46	4,83	0,36
2	30	6,5	0,13	4,10	0,52	7,12	0,55
3	50	5,5	0,18	7,97	0,20	5,61	0,46
4	50	6,5	0,13	7,37	0,57	9,35	0,60
5	40	6,0	0,17	6,15	0,37	8,31	0,59
5 (réplica)	40	6,0	0,21	6,68	0,36	7,85	0,57

Conforme apresentado nas Figuras 4.11 e 4.12 e Tabela 4.7, nota-se que os maiores teores de acetoína foram alcançados nos ensaios cuja concentração inicial de glicose foi de 50 g/L, sendo que a produção máxima do produto ocorreu no experimento com pH 5,5. Verifica-se que as mais elevadas concentrações de células foram também encontradas nos experimentos com concentração inicial de glicose de 50 g/L, sendo que a concentração máxima foi alcançada no ensaio com pH 6,5, assim como ocorreu nos experimentos em frascos agitados (Tabela 4.1).

Nos ensaios em pH 5,5 houve maior conversão de substrato em produto do que nos ensaios em pH 6,5, semelhantemente ao que já havia sido observado nos ensaios em frascos agitados, conforme apresentou-se na Tabela 4.2.

Houve maior conversão de substrato em células nos experimentos com pH 6,5, conforme mostrado na Tabela 4.7.

Semelhantemente aos ensaios em frascos agitados (Tabela 4.1), as velocidades específicas de crescimento foram maiores nos experimentos em pH 6,5, conforme observa-se na Tabela 4.7.

De Mas *et al.* (1988), em experimentos com *Bacillus polymyxa*, encontraram teores máximos de acetoína em torno de 9 g/L em 32 h de fermentação, em meio PAY com taxa de aeração de 3 L/min, a 30°C, 800 rpm de agitação, concentração inicial de glicose 100 g/L e pH 6,0. Nos ensaios sob mesmas condições, porém a 500 rpm,

alcançou-se o máximo de 1 g/L do produto em 42 h. No presente estudo, a concentração máxima do aroma obtida foi 7,97 g/L em 25,25 h de fermentação, utilizando-se o mesmo meio de cultivo, ar a 600 mL/min, 37°C, 700 rpm, 50 g/L de glicose e pH 5,5.

No caso do trabalho realizado por De Mas *et al.* (1988), embora a concentração inicial de glicose tenha sido o dobro da utilizada neste estudo, acredita-se que este não tenha sido o principal fator que tenha conduzido à produção de um teor de 11,4% mais alto que o aqui encontrado, uma vez que Serebrennikov (1995) verificou que concentrações mais altas de substrato favoreciam a formação de 2,3-butanodiol e não a de acetoína.

Estudos desenvolvidos por Cañas *et al.* (1999) com *Leuconostoc mesenteroides* demonstraram que a produção máxima de acetoína deu-se em pH 5,0, havendo diminuição dos teores do aroma em ensaios conduzidos a pH 6,0.

Acredita-se que nos experimentos realizados por De Mas *et al.* (1988) a concentração máxima de acetoína produzida tenha sido superior a encontrada neste trabalho devido, principalmente, às condições de aeração (taxa de alimentação de ar cinco vezes maior) e agitação, posto que vários estudos encontrados na literatura indicam que meios altamente aerados favorecem à produção de acetoína.

Os teores de acetoína obtidos neste estudo foram consideravelmente superiores aos encontrados por Moritz (1998), Teixeira (1999) e Mello (2000) em seus experimentos com a levedura *Hanseniaspora guilliermondii*, conforme apresentado na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 – Concentrações máximas de acetoína ($C_{\text{acetoína}}$) produzidas pela levedura *Hanseniaspora guilliermondii* comparadas com a produzida neste estudo pela bactéria *Bacillus polymyxa*.

Microrganismo	Tipo de cultivo	$C_{\text{acetoína}}$ (g/L)	Referência
<i>H. guilliermondii</i>	batelada (fermentador)	0,334	Moritz (1998)
<i>H. guilliermondii</i>	batelada (frascos agitados)	0,367	Teixeira (1999)
<i>H. guilliermondii</i>	batelada alimentada (fermentador)	0,900	Mello (2001)
<i>B. polymyxa</i>	batelada (frascos agitados)	3,07	Este trabalho
<i>B. polymyxa</i>	batelada (fermentador)	7,97	Este trabalho

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, conforme apresentado no Capítulo 4, chegou-se às seguintes conclusões:

- O modelo empírico elaborado para representar a concentração máxima em acetoína apresentou significância estatística, sendo também considerado preditivo.
- O efeito de interação entre as variáveis concentração inicial de glicose e pH não foram significativos.
- A concentração máxima predita pelo modelo proposto foi 7,97 g/L, idêntica à obtida experimentalmente.
- As concentrações máximas em acetoína foram produzidas nos ensaios conduzidos em pH 5,5 e concentração inicial de glicose igual a 50 g/L.
- A produção de acetoína esteve relacionada ao crescimento celular nos ensaios em biorreator.
- A bactéria *Bacillus polymyxa* produziu concentrações de acetoína consideravelmente superiores àquelas produzidas pela levedura *Hanseniaspora guilliermondii* nos estudos desenvolvidos por Moritz (1998), Teixeira (1999) e Mello (2001).

6. SUGESTÕES

Em função dos resultados obtidos neste trabalho, são apresentadas as seguintes sugestões para trabalhos futuros:

- Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($K_{L,a}$), visto ser a aeração um parâmetro de grande importância na produção de acetoína.
- Realização de ensaios em níveis de pH inferiores aos estudados, já que os maiores teores de acetoína, neste trabalho, foram encontrados nos ensaios em $\text{pH} = 5,5$.
- Dosagem de outros compostos formados durante a fermentação, a fim de verificar se a sua produção pode inibir a formação de acetoína.
- Realização de ensaios em regime de batelada alimentada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BADINO JR., A. C., (2000). Tipos de Fermentação. **Apostila Curso *Fermentation Technology* - Módulo II (Fermentação por Fungos Filamentosos)**. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC
2. BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S. e BRUNS, R. E. (1995). **Planejamento e Otimização de Experimentos**. Editora da UNICAMP, Campinas, SP. 299p.
3. BIO LAND – Características del NUTRI-COMPOST™. Disponível em: <<http://www.red6.org/~bioland/nutricompoust-mo.htm>>. Acesso em: 08 abril 2001.
4. BERGER, R. G. (1995). **Aroma Biotechnology**. Ed. Springer - Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 24Op. Em: TEIXEIRA, R. M. (1999). Otimização das condições de cultura para produção de acetoína por *Hanseniaspora guilliermondii*. **Dissertação de Mestrado (Engenharia Química)**. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC.
5. BOX G. E. P.; HUNTER, W. G. and HUNTER, J. S. (1978). **Statistics for Experimenters**. An introduction to design, data analysis and model building, N. Y., Wiley.
6. CAÑAS, A. and OWENS, J. D. (1999). Acetoin production in growing *Leuconostoc mesenteroides*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 15: 339-344.
7. CARVALHO, J. C. (1999). Produção de diacetil e acetoína: Desenvolvimento de um meio de cultivo e avaliação de fatores que alteram o crescimento de *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* biovar. *Diacetylactis*. **Dissertação de Mestrado (Engenharia Química)**. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC.
8. COLLINS, E. (1972). Biosynthesis of flavor compounds by microorganisms. **Journal of Dairy Science**, 55(7): 1022-1028. Em: TEIXEIRA, R. M. (1999). Otimização das condições de cultura para produção de acetoína por *Hanseniaspora*

- guilliermondii*. **Dissertação de Mestrado (Engenharia Química)**. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC.
9. DE MAS, C; JANSEN, N. B. and TSAO, G. T. (1988). Production of optically active 2,3-butanediol by *Bacillus polymyxa*. **Biotechnology and Bioengineering**, 31: 366-377.
 10. DETTWILLER, B.; DUNN, I. J.; HEINZLE, E. and PRENOSYL, J. E. (1993). A simulation model for the continuous production of acetoin and butanediol using *Bacillus subtilis* with integrated pervaporation separation. **Biotechnology and Bioengineering**, 41: 791-800. Em: MORITZ, D. (1998). Estudo do crescimento de três leveduras produtoras de aromas. **Dissertação de Mestrado (Biotecnologia)**, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC.
 11. FABRE, C. (1995). Nouveaux procedes de production d' arômes naturels par bioconversion. **These de Doctorat (Biologie et genetique moleculaires et cellulaires - Biotecnologie)**. L'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse. Toulouse, França.
 12. GRANATA, L. A. and MORR, C.V. (1996). Improved acid, flavor and volatile compound production in a high protein and fiber soymilk yogurt like product. **Journal of Food Science**, 61(2): 331-336. Em: MORITZ, D. (1998). Estudo do crescimento de três leveduras produtoras de aromas. **Dissertação de Mestrado (Biotecnologia)**, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC.
 13. HAUKELI, A. D. and LIE, S. (1972). Production of diacetyl, 2-acetolactate and acetoin by yeasts during fermentation. **Journal of the Institute of Brewing**, 78: 229-232. Em: MORITZ, D. (1998). Estudo do crescimento de três leveduras produtoras de aromas. **Dissertação de Mestrado (Biotecnologia)**, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC.

14. JANSEN, N. B; FLICKINGER, M. C and TSAO, G. T. (1983). Production of 2,3-butanediol from D-xilose by *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724. **Biotechnology and Bioengineering**, 26: 362-369.
15. JANSEN, N. B and TSAO, G. T. (1983). Bioconversion of pentoses to 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. **Ad. Biochem. Eng. Biotechnology Bioeng.**, 27: 85-99.
16. KANEKO, T.; WATANABE, Y. and SUZUKI, H. (1991). Differences between *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 2206 Nd citrate-positive *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 3022 in the characteristics of diacetyl production. **Applied and Environmental Microbiology**, 57(10): 3040-3042. Em: MORITZ, D. (1998). Estudo do crescimento de três leveduras produtoras de aromas. **Dissertação de Mestrado (Biotecnologia)**, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC.
17. LEVEAU, J. Y. and BOUIX, M. (1984) III. Cinéticas Microbianas. De: SCRIBAN, R. **Biotecnologia**, Editora Manole Ltda., São Paulo, SP, 49Op. Em: TEIXEIRA, R. M. (1999). Otimização das condições de cultura para produção de acetoina por *Hanseniaspora guilliermondii*. **Dissertação de Mestrado (Engenharia Química)**. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC.
18. MELLO, R. (2001). Produção do bioaroma acetoina por *Hanseniaspora guilliermondii* CCT 3800 através do processo fermentativo em batelada alimentada. **Dissertação de Mestrado (Biotecnologia)**. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC.
19. MOLL, N. and MOLL, M. (1990). Additifs alimentaires et auxiliaires technologiques. Ed. Masson, Paris, 83-84. De: FABRE, C. (1995). Nouveaux procedes de production d' arômes naturels par bioconversion. **These de Doctorat (Biologie et genetique moleculaires et cellulaires - Biotechnologie)**. L'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse. Toulouse, França.

20. MORITZ, D. (1998). Estudo do crescimento de três leveduras produtoras de aromas. **Dissertação de Mestrado (Biotecnologia)**, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC.
21. NAKASHIMADA, Y.; KANAI, K. and NISHIO, N. (1998). Optimization of dilution rate, pH and oxygen supply on optical purity of 2,3-butanediol produced by *Paenibacillus polymyxa* in chemostat culture. **Biotechnology Letters**, 20(12): 1133-1138.
22. NUNES, E. O. (2001). Influência do pH e concentração inicial de glicose na produção de biomassa do fungo *Ganoderma australe* (Fr.) Pat. **Dissertação de Mestrado (Engenharia Química)**. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC.
23. PASTORE, G.; SATO, H.; YANG, T.; PARK, Y. and MIN, D. (1994). Production of fruity aroma by newly isolated yeast. **Biotechnology Letters**, 16(4); 389-392. Em: TEIXEIRA, R. M. (1999). Otimização das condições de cultura para produção de acetoína por *Hanseniaspora guilliermondii*. **Dissertação de Mestrado (Engenharia Química)**. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC.
24. PASTORE, G. (2000). Produção Biotecnológica de Aromas e Oligossacarídeos. **Apostila Curso Fermentation Technology – Módulo II (Fermentação por Fungos Filamentosos)**. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC
25. RENNA, M. C.; NAJIMUNDIN, N.; WINIK, L. R. and AHELER, S. A. (1993). Regulation of the *Bacillus subtilis alsS*, *alsD* and *alsR* genes involved in post-exponential phase production of acetoin. **Journal of Bacteriology**, 175(12): 3863-3875.
26. ROMANO, P. and SUZZI, G. (1996). Origin and production of acetoin during wine yeast fermentation - a Review. **Applied and Environmental Microbiology**, 62(2): 309-315. Em: TEIXEIRA, R. M. (1999). Otimização das condições de cultura para

- produção de acetoína por *Hanseniaspora guilliermondii*. **Dissertação de Mestrado (Engenharia Química)**. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC.
27. ROMANO, P.; SUZZI, G.; ZIRONI, R. and COMI, G. (1993). Biometric study of acetoin production in *Hanseniaspora guilliermondii* and *Kloeckera apiculata*. **Applied and Environmental Microbiology**, 59(6): 1838-1841. Em: TEIXEIRA, R. M. (1999). Otimização das condições de cultura para produção de acetoína por *Hanseniaspora guilliermondii*. **Dissertação de Mestrado (Engenharia Química)**. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC.
28. ROMICK, T. L. and FLEMING, H. P. (1998). Acetoin production as an indicator of growth and metabolic inhibition of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, 84: 18-24. Em: MORITZ, D. (1998). Estudo do crescimento de três leveduras produtoras de aromas. **Dissertação de Mestrado (Biotecnologia)**, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC.
29. SABLAROYLLES, J. M. and GOMA, G. (1984). Butanediol production by *Aerobacter aerogenes* NRRL B199: Effects of initial substrate concentration and aeration agitation. **Biotechnology and Bioengineering**, 26: 148-155.
30. SCRIBAN, R. (1985). **Biotecnologia**. Editora Manole, São Paulo, SP. 490p.
31. SEREBRENNIKOV, V. M. (1995). 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.
32. SIMÃO, A. M. (1986). **Aditivos para Alimentos sob o Aspecto Toxicológico**, Livraria Nobel S.A., 274p. Em: MELLO, R. (2001) 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.

33. SHIMAZU, Y.; UEHARA, M. and WATANABE, M. (1985). Transformation of citric acid to acetic acid, acetoin and diacetyl by wine making lactic acid bacteria. **Agric. Biol. Chem.**, 46(7):2147-2157.
34. SOMOGYI, L.; KISHI, A. (2001) Aroma chemicals and the flavor and fragrance industry. Chemical Economics Handbook Report. Disponível em: <<http://ceh.sric.sri.com/Public/Reports/503.5000/>> Acesso em: 02 setembro 2001.
35. STANBURY, P. F.; WHITAKER, A. and HALL, S. J. (1994). **Principles of Fermentation Technology**, Ed. Pergamon, N.Y., 29p.
36. TAKEMOTO, S. Y. (2000). Avaliação do teor de acetoina em vinagres como forma de verificação de sua genuidade. **Dissertação de Mestrado (Engenharia Química)**. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC.
37. TEIXEIRA, R. M. (1999). Otimização das condições de cultura para produção de acetoina por *Hanseniaspora guilliermondii*. **Dissertação de Mestrado (Engenharia Química)**. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC.
38. WERKEMA, M. C. C. e AGUIAR, S. (1996). **Otimização Estatística de Processos: Como Determinar a Condição de Operação de um Processo que Leva ao Alcance de uma Meta de Melhoria**. Volume 6 da Série Ferramentas de Qualidade. Fundação Christiano Ottoni, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG. 331p.

APÊNDICE I

I. Curva de crescimento celular do pré inóculo

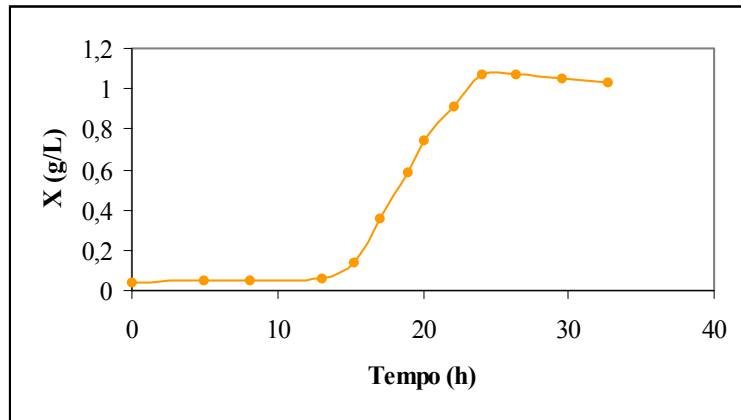


Figura 1 - Curva de crescimento celular do pré inóculo

II. Determinação da velocidade específica de crescimento da fase exponencial para o pré inóculo

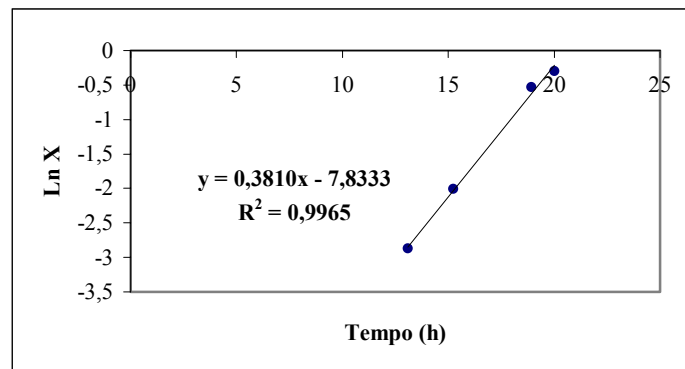


Figura 2 - Velocidade específica de crescimento do pré inóculo

III. Curva de calibração para determinação da concentração celular do pré inóculo

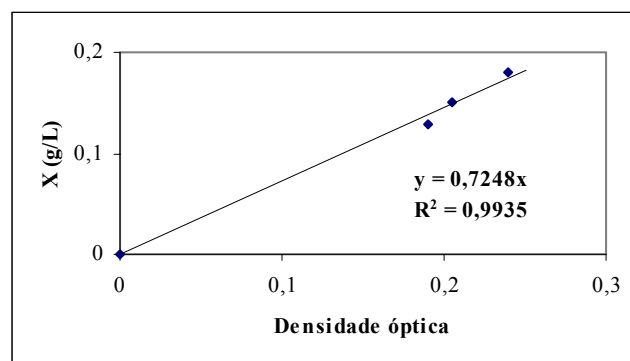


Figura 3 - Curva de calibração de concentração celular do pré inóculo

APÊNDICE II

I. Cromatogramas

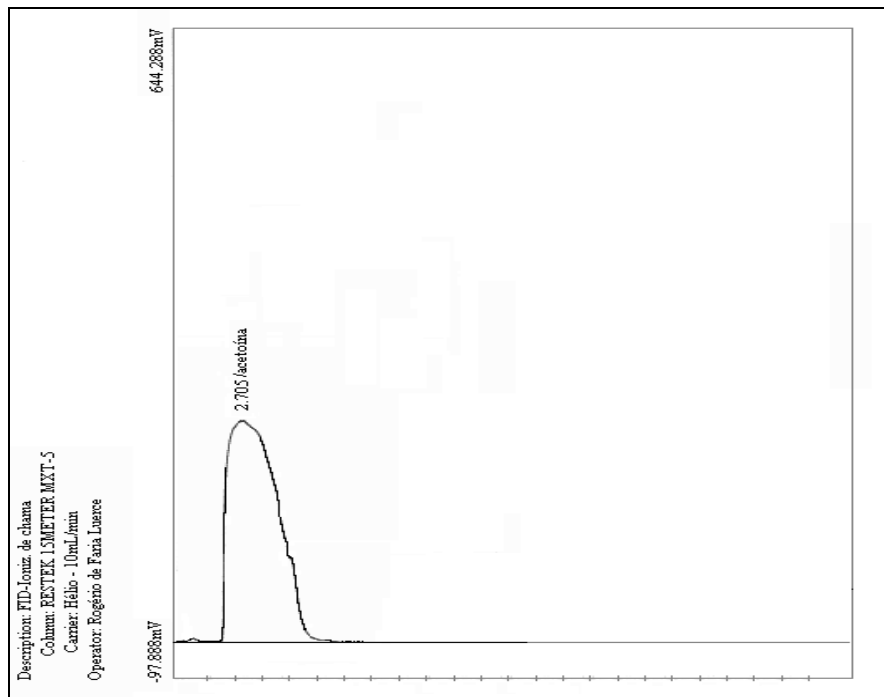


Figura 4 - Cromatograma de uma solução padrão de acetoina (10 g/L)

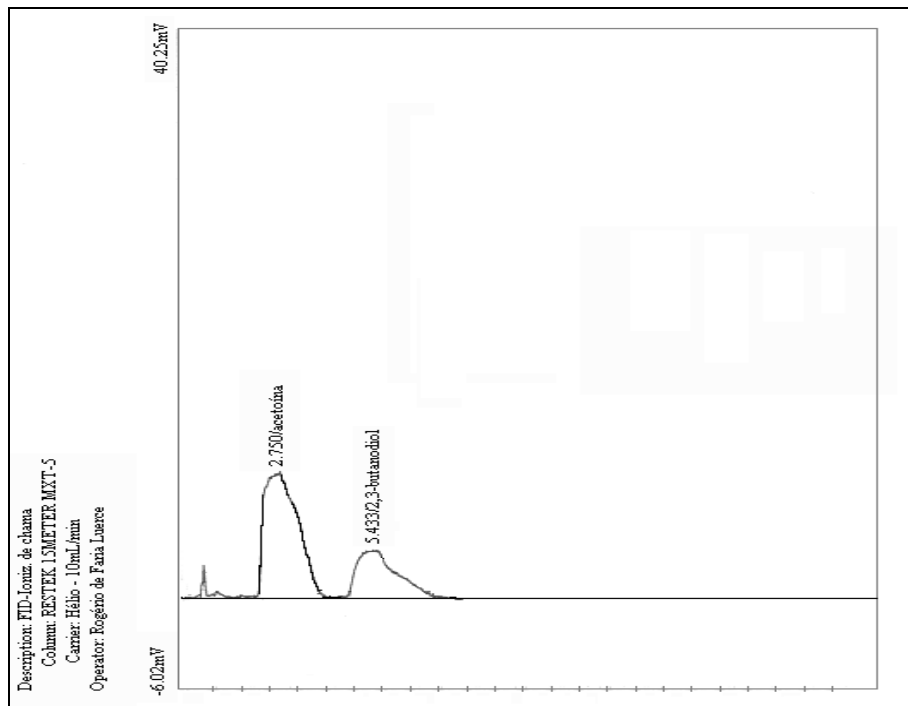


Figura 5 - Cromatogramas de acetoina e 2,3-butanodiol obtidos de uma amostra de um ensaio fermentativo

II. Curva de calibração para dosagem de acetoína

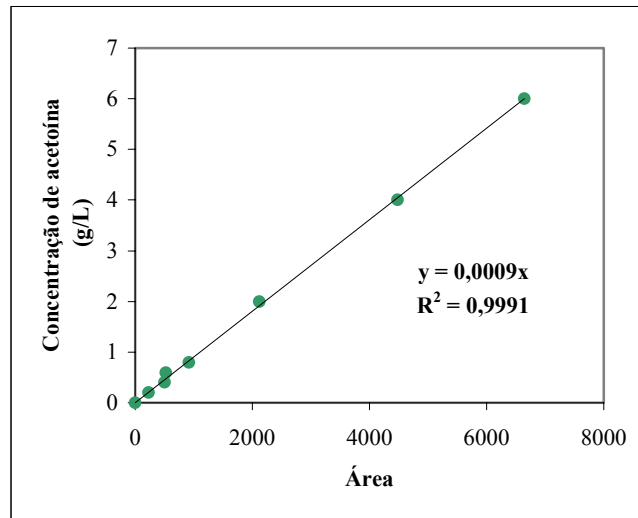


Figura 6 - Curva de calibração para dosagem de acetoína

APÊNDICE III

I. Determinação da velocidade específica de crescimento da fase exponencial para os ensaios preliminares em frascos agitados

Os gráficos das Figuras 7 a 10 foram construídos a partir das Tabelas 1 a 4.

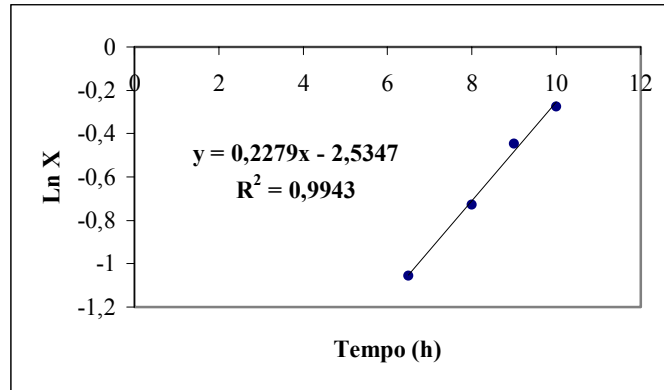


Figura 7 - Velocidade específica de crescimento da bactéria no ensaio A ([glicose] = 30 g/L; pH = 5,5)

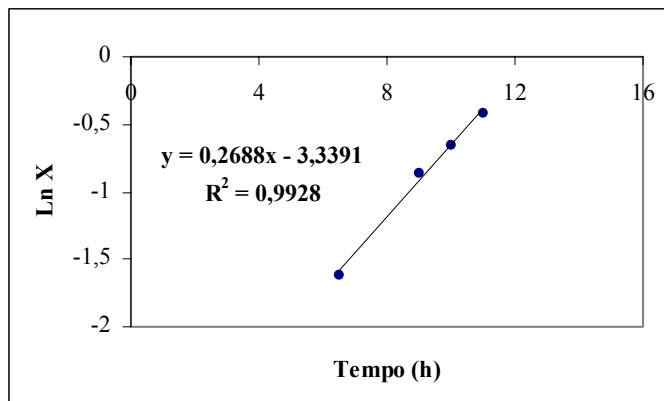


Figura 8 - Velocidade específica de crescimento da bactéria no ensaio B ([glicose] = 50 g/L; pH = 5,5)

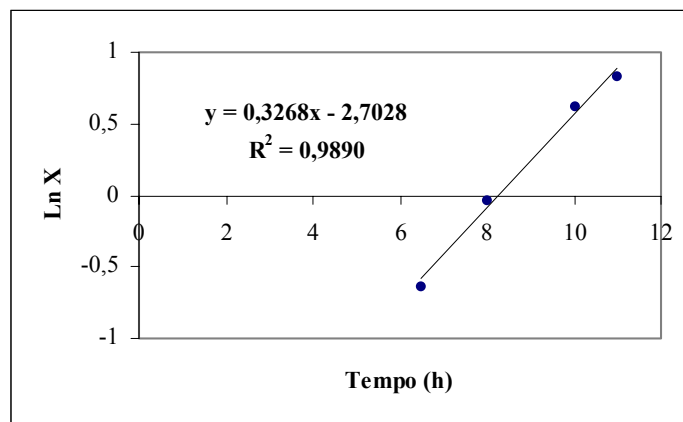


Figura 9 - Velocidade específica de crescimento da bactéria no ensaio C ([glicose] = 30 g/L; pH = 6,5)

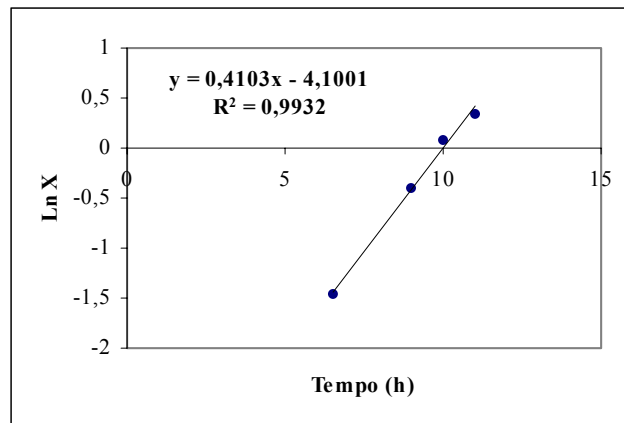


Figura 10 - Velocidade específica de crescimento da bactéria no ensaio D ([glicose] = 50 g/L; pH = 6,5)

APÊNDICE IV

I. Tabelas geradoras das Figuras 4.1 a 4.4 (ensaios preliminares em frascos agitados)

Tabela 1 - Produção de acetoína e células e consumo de glicose no ensaio A

Tempo (h)	X x 10 (g/L)	S (g/L)	Concentração de acetoína (g/L)
0	1,560	32	0
4	1,710	30	0
6,5	3,480	30	0
8	4,840	29	0
9	6,400	31	0
10	7,590	30	0
11	8,415	28	0
13,5	10,24	29	0
15,5	9,600	25	0
17,67	9,840	24	0,548
19,67	9,120	24	0,893
21,67	9,680	25	1,07
23,67	8,720	21	1,86
26	10,01	21	2,09
29	10,45	21	2,05
32,33	9,790	21	2,21
37,67	11,66	21	2,33

*[glicose] = 30 g/L; pH=5,5

Tabela 2 - Produção de acetoína e células e consumo de glicose no ensaio B

Tempo (h)	X x 10 (g/L)	S (g/L)	Concentração de acetoína (g/L)
0	1,560	49	0
4	1,515	49	0
6,5	1,980	49	0
9	4,245	48	0
10	5,200	48	0
11	6,600	47	0
12	6,990	46	0
15,5	8,340	46	0
17,67	10,20	42	0,639
19,67	10,59	38	0,968
21,67	11,72	38	1,56
23,67	10,56	35	1,57
26	11,28	35	2,02
29	11,99	33	2,54
37,67	12,93	32	3,06
43,42	13,37	30	3,07

*[glicose] = 50 g/L; pH=5,5

Tabela 3 - Produção de acetoina e células e consumo de glicose no ensaio C

Tempo (h)	X x 10 (g/L)	S (g/L)	Concentração de acetoina (g/L)
0	1,943	31	0
4	2,174	30	0
6,5	5,314	29	0
8	9,723	30	0
10	18,68	26	0
11	22,83	25	0
12	24,79	20	0
13,5	31,99	17	0
15,5	34,89	11	0
17,67	34,89	6	0,781
19,67	33,53	0	1,25

*[glicose] = 30 g/L; pH=6,5

Tabela 4 - Produção de acetoina e células e consumo de glicose no ensaio D

Tempo (h)	X x 10 (g/L)	S (g/L)	Concentração de acetoina (g/L)
0	1,674	53	0
4	1,817	47	0
6,5	2,333	45	0
9	6,697	43	0
10	10,93	43	0
11	14,08	43	0
12	18,14	43	0
13,5	25,65	36	0
15,5	34,91	36	0
17,67	30,74	24	0
19,67	27,61	21	0
21,67	27,98	21	0
23,67	27,98	16	0,617
26	26,50	11	0,968
29	25,77	7	1,86
32,67	23,37	0	2,37

*[glicose] = 50 g/L; pH=6,5

APÊNDICE V

I. Fator de conversão substrato em células e fator de conversão substrato em produto na fase exponencial de crescimento (ensaios preliminares)

Os gráficos das Figuras 11 a 14 foram construídos a partir das Tabelas 1 a 4.

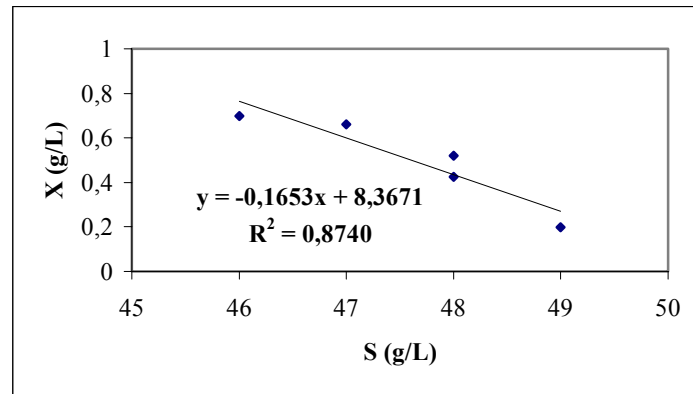


Figura 11 - Fator de conversão substrato em células para o ensaio B ([glicose] = 50 g/L; pH 5,5)

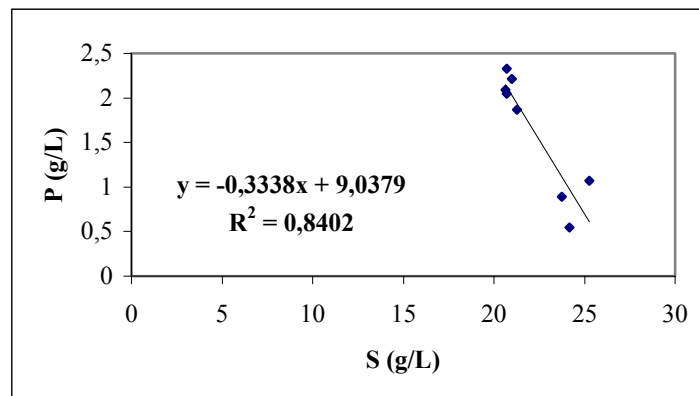


Figura 12 - Fator de conversão substrato em produto para o ensaio A ([glicose] = 30 g/L; pH 5,5)

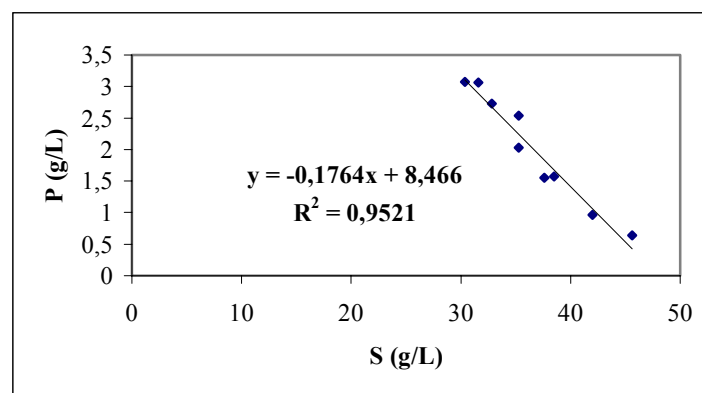
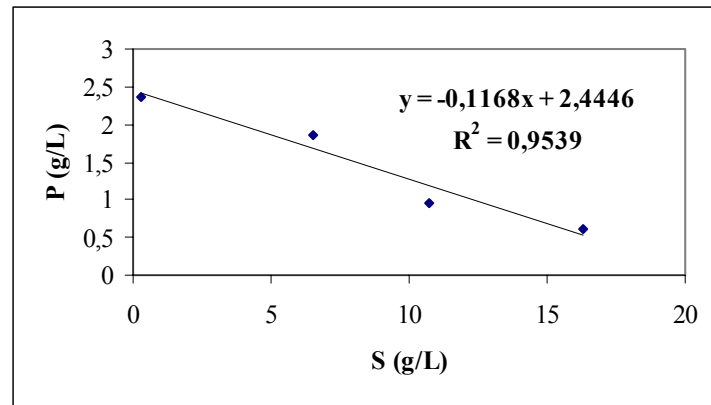


Figura 13 - Fator de conversão substrato em produto para o ensaio B ([glicose] = 50 g/L; pH 5,5)



**Figura 14 - Fator de conversão substrato em produto para o ensaio D
([glicose] = 50 g/L; pH 6,5)**

APÊNDICE VI

I. Tabelas utilizadas na construção das Figuras 4.9 a 4.14 (ensaios em fermentador)

Tabela 5 - Produção de acetoína e células e consumo de glicose no ensaio 1

Tempo (h)	X x 10 (g/L)	S (g/L)	Concentração de acetoína (g/L)
0	1,725	31	0
2	1,959	31	0
4	3,476	31	0
5	4,961	29	0
8	14,22	30	0,681
10	28,22	27	1,553
10,75	41,21	23	2,650
12,75	44,83	13	4,326
14,75	48,25	4	5,578
16,75	42,02	0	6,245

*[glicose] = 30 g/L; pH=5,5

Tabela 6 - Produção de acetoína e células e consumo de glicose no ensaio 2

Tempo (h)	X x 10 (g/L)	S (g/L)	Concentração de acetoína (g/L)
0	1,992	33	0
2	2,554	32	0
4	3,744	32	0
5,5	5,380	28	0
6,5	8,669	27	0
7	11,78	29	0
7,5	16,52	28	0
8	20,46	26	0
8,5	27,13	25	0
9	33,76	25	0,620
11	58,93	14	2,470
13,17	71,22	2	3,497
15	64,05	0	4,095

*[glicose] = 30 g/L; pH=6,5

Tabela 7 - Produção de acetoína e células e consumo de glicose no ensaio 3

Tempo (h)	X x10 (g/L)	S (g/L)	Concentração de acetoína (g/L)
0	2,312	49	0
2	2,211	49	0
4	2,111	49	0
6,75	2,171	50	0
8,75	2,935	46	0
10,75	7,236	47	0
11,5	10,08	47	0
12	12,80	40	0
13,75	30,12	40	0,698
16	46,73	27	2,353
18	54,63	18	4,962
20	52,13	11	6,152
21,83	52,13	1	7,253
23,83	56,08	0	7,726
25,25	51,72	0	7,970

*[glicose] = 50 g/L; pH = 5,5

Tabela 8 - Produção de acetoína e células e consumo de glicose no ensaio 4

Tempo (h)	X x 10 (g/L)	S (g/L)	Concentração de acetoína (g/L)
0	2,189	46	0
2	2,658	45	0
4	2,711	45	0
5	3,190	43	0
6	4,253	45	0
7,5	9,214	45	0
8	15,38	42	0
9,25	31,04	41	1,081
9,75	40,68	38	1,021
10,58	72,23	33	1,323
11,58	82,14	26	2,734
13	93,49	20	4,166
15	83,76	9	4,426
16	83,76	1	5,039
17	81,60	0	7,369

*[glicose] = 50 g/L; pH = 6,5

Tabela 9 - Produção de acetoina e células e consumo de glicose no ensaio 5

Tempo (h)	X x 10 (g/L)	S (g/L)	Concentração de acetoina (g/L)
0	1,746	41	0
2	1,635	37	0
4	1,411	38	0
6	1,411	37	0
8	1,983	38	0
8,92	2,472	39	0
9,92	3,363	38	0
10,42	4,314	39	0
11,42	8,532	38	0
12	11,99	38	0
13	20,44	35	0,662
14,17	40,12	29	2,141
15	56,43	24	2,818
16	83,15	19	2,998
18	60,68	11	5,010
20	58,93	4	6,150
21	59,81	1	4,945
21,83	58,64	0	3,910

*[glicose] = 40 g/L; pH = 6,0

Tabela 10 - Produção de acetoina e células e consumo de glicose no ensaio 5 (réplica)

Tempo (h)	X x 10 (g/L)	S (g/L)	Concentração de acetoina (g/L)
0	2,021	40	0
2	2,319	38	0
4	3,094	39	0
6	4,360	38	0
7	7,936	38	0
7,5	10,78	35	0
10	42,71	25	2,074
10,5	58,87	24	2,471
11	61,18	24	3,860
12	63,95	16	5,610
14	78,45	5	6,678
15,92	74,81	0	5,152
17,67	73,59	0	5,359

*[glicose] = 40 g/L; pH = 6,0

APÊNDICE VII

I. Determinação do fator de conversão substrato em células na fase exponencial de crescimento (ensaios em fermentador)

Os gráficos para determinação do fator de conversão substrato em células (Figuras 15 a 20) foram plotados a partir dos dados apresentados nas Tabelas 5 a 10.

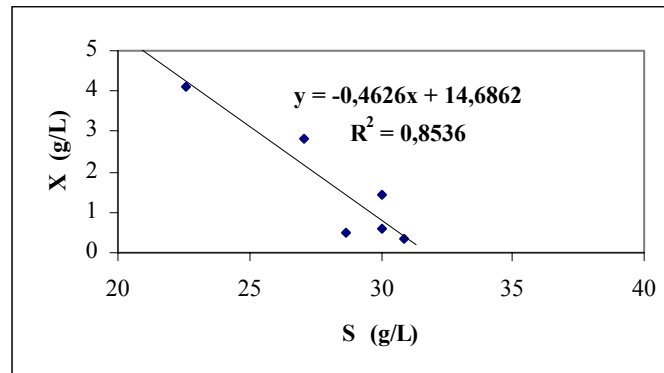


Figura 15 - Fator de conversão substrato em células no ensaio 1 ([glicose] = 30 g/L; pH = 5,5)

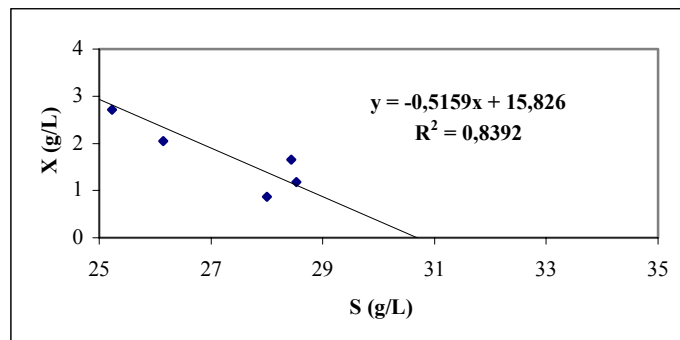


Figura 16 - Fator de conversão substrato em células no ensaio 2 ([glicose] = 30 g/L; pH = 6,5)

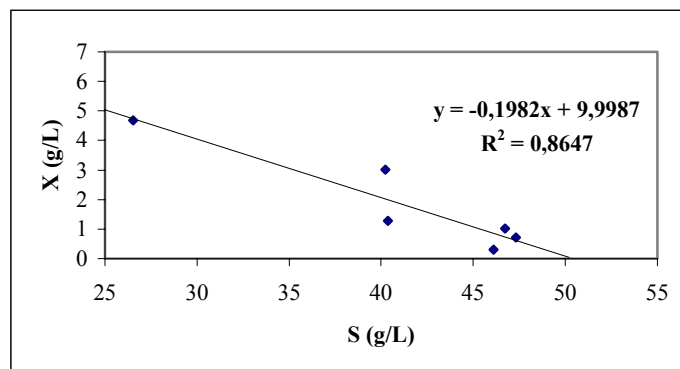


Figura 17 - Fator de conversão substrato em células no ensaio 3 ([glicose] = 50 g/L; pH = 5,5)

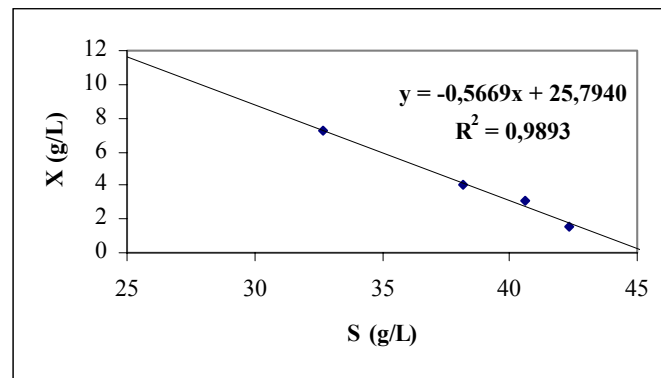


Figura 18 - Fator de conversão substrato em células no ensaio 4 ([glicose] = 50 g/L; pH = 6,5)

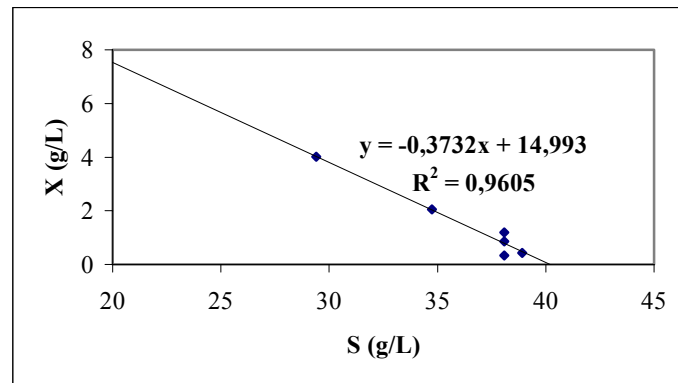


Figura 19 - Fator de conversão substrato em células no ensaio 5 ([glicose] = 40 g/L; pH = 6,0)

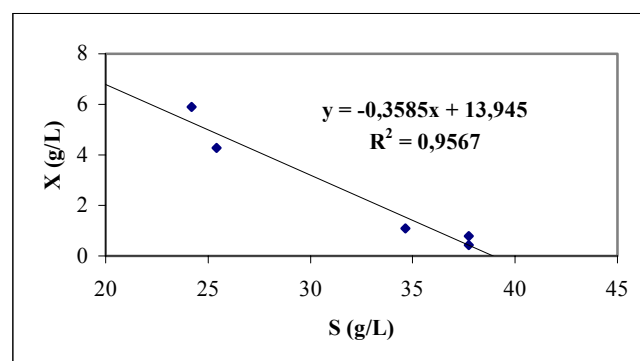


Figura 20 - Fator de conversão substrato em células no ensaio 5 (réplica) ([glicose] = 40 g/L; pH = 6,0)

APÊNDICE VIII

I. Determinação do fator de conversão substrato em produto na fase exponencial de crescimento (ensaios em fermentador)

Os gráficos para determinação do fator de conversão substrato em produto (Figuras 21 a 26) foram plotados a partir dos dados apresentados nas Tabelas 5 a 10.

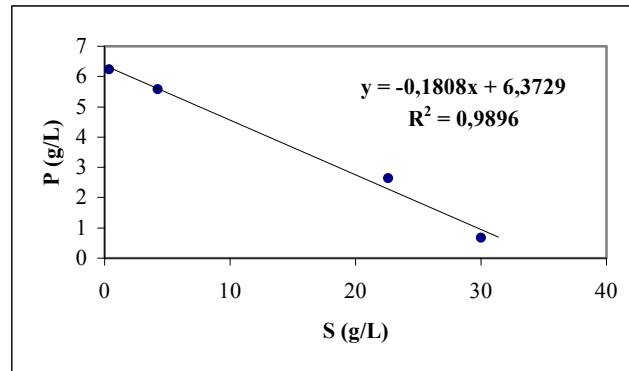


Figura 21 - Fator de conversão substrato em produto no ensaio 1 ([glicose] = 30 g/L; pH = 5,5)

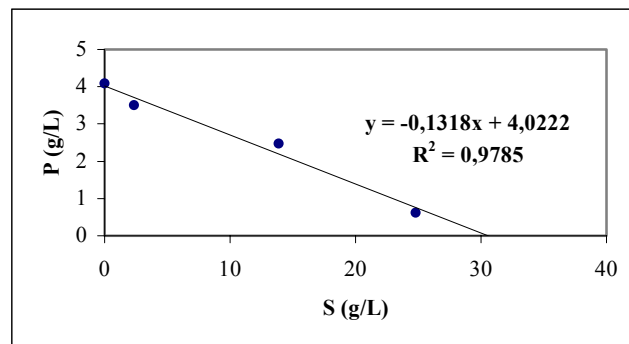


Figura 22 - Fator de conversão substrato em produto no ensaio 2 ([glicose] = 30 g/L; pH = 6,5)

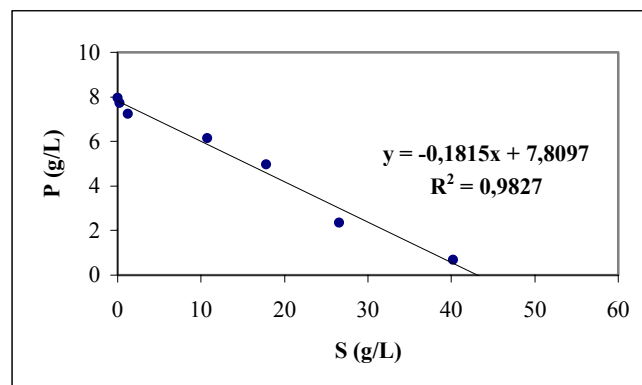


Figura 23 - Fator de conversão substrato em produto no ensaio 3 ([glicose] = 50 g/L; pH = 5,5)

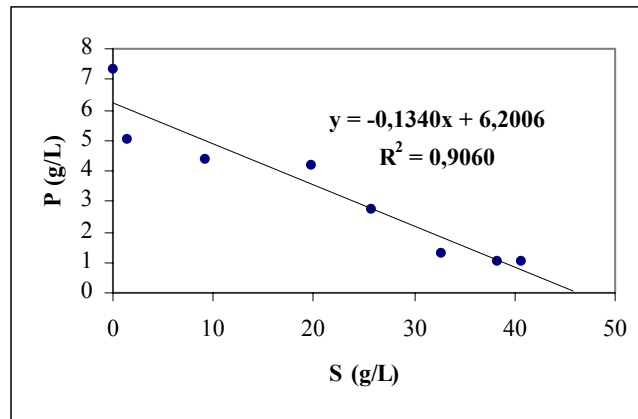


Figura 24 - Fator de conversão substrato em produto no ensaio 4 ([glicose] = 50 g/L; pH = 6,5)

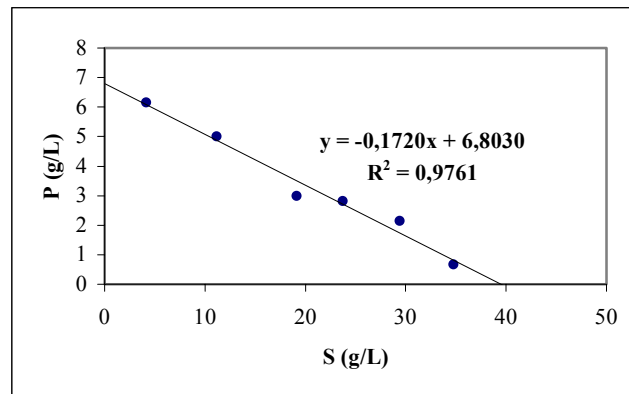


Figura 25 - Fator de conversão substrato em produto no ensaio 5 ([glicose] = 40 g/L; pH = 6,0)

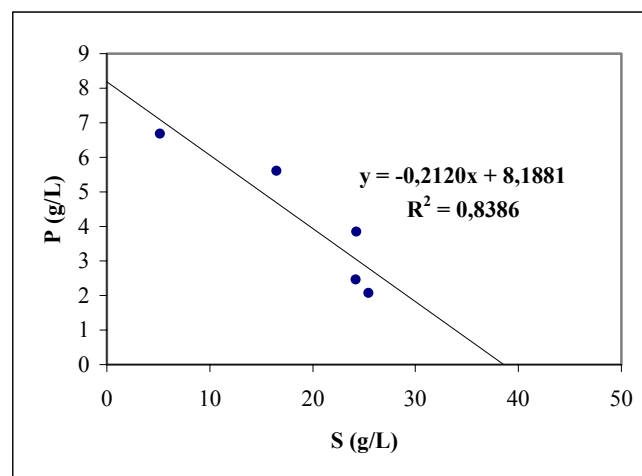


Figura 26 - Fator de conversão substrato em produto no ensaio 5 (réplica) ([glicose] = 40 g/L; pH = 6,0)

APÊNDICE IX

I. Determinação da velocidade de crescimento específica da fase exponencial (ensaios em fermentador)

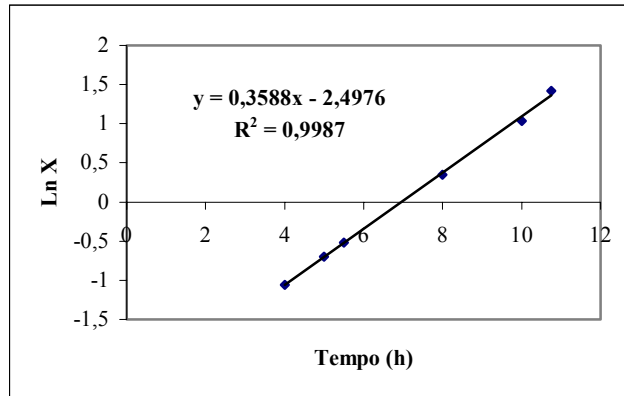


Figura 27 - Velocidade específica de crescimento da bactéria no ensaio 1 ([glicose] = 30 g/L; pH = 5,5)

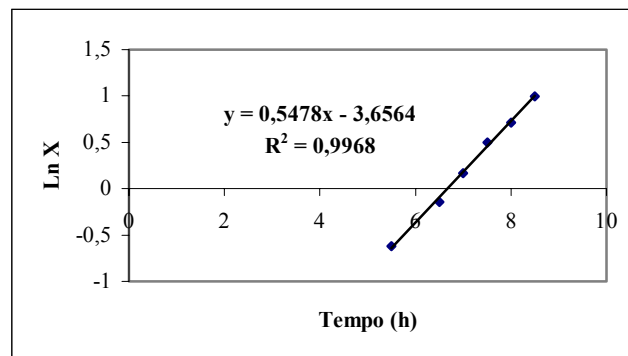


Figura 28 - Velocidade específica de crescimento da bactéria no ensaio 2 ([glicose] = 30 g/L; pH = 6,5)

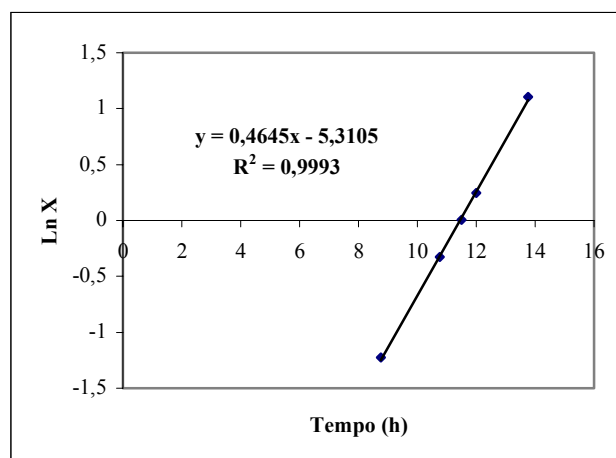


Figura 29 - Velocidade específica de crescimento da bactéria no ensaio 3 ([glicose] = 50 g/L; pH = 5,5)

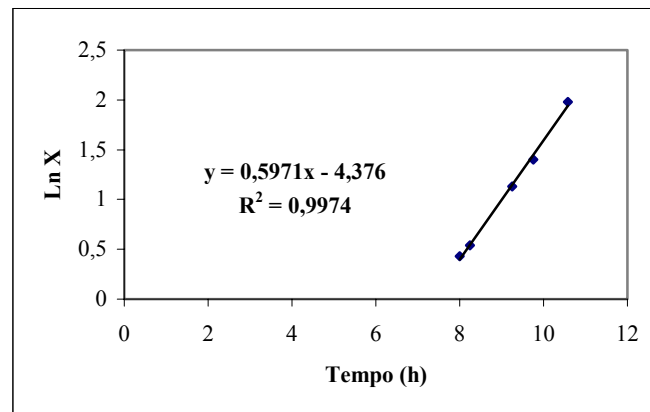


Figura 30 - Velocidade específica de crescimento da bactéria no ensaio 4 ([glicose] = 50 g/L; pH = 6,5)

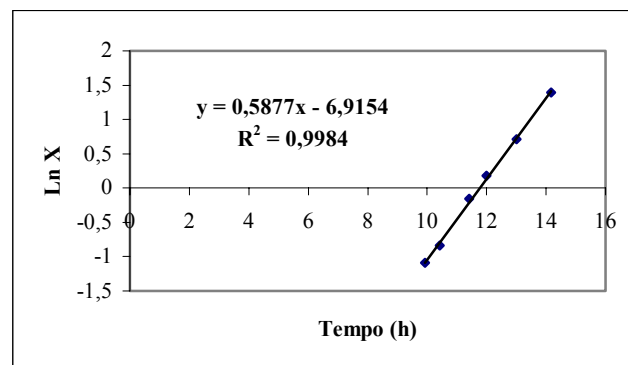


Figura 31 - Velocidade específica de crescimento da bactéria no ensaio 5 ([glicose] = 40 g/L; pH = 6,0)

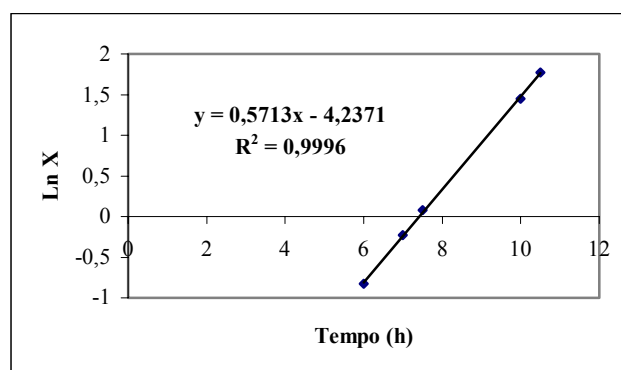


Figura 32 - Velocidade específica de crescimento da bactéria no ensaio 5 (réplica) ([glicose] = 40 g/L; pH = 6,0)

APÊNDICE X

I. Curvas de calibração para determinação da concentração celular (ensaios em fermentador)

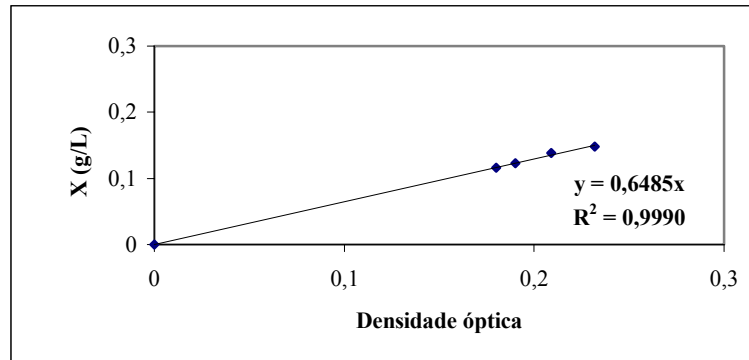


Figura 33 - Curva de calibração de concentração celular para o ensaio 1 ([glicose] = 30 g/L; pH = 5,5)

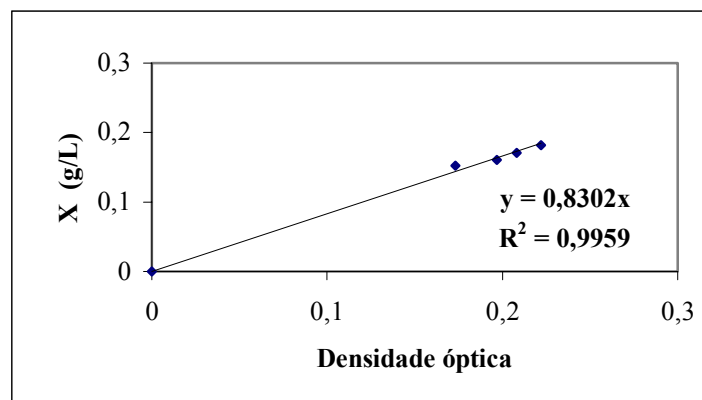


Figura 34 - Curva de calibração de concentração celular para o ensaio 2 ([glicose] = 30 g/L; pH = 6,5)

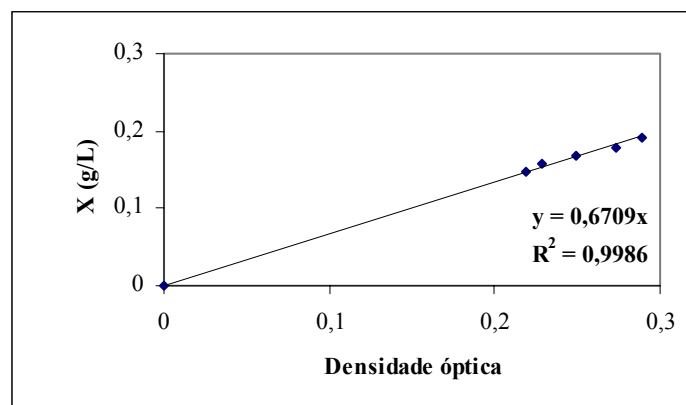


Figura 35 - Curva de calibração de concentração celular para o ensaio 3 ([glicose] = 50 g/L; pH = 5,5)

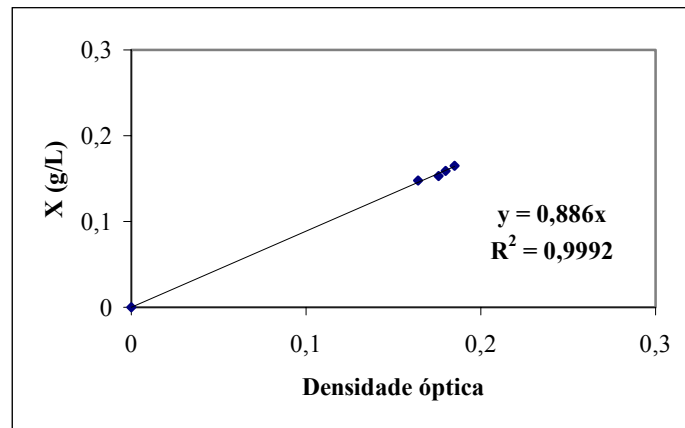


Figura 36 - Curva de calibração de concentração celular para o ensaio 4 ([glicose] = 50 g/L; pH = 6,5)

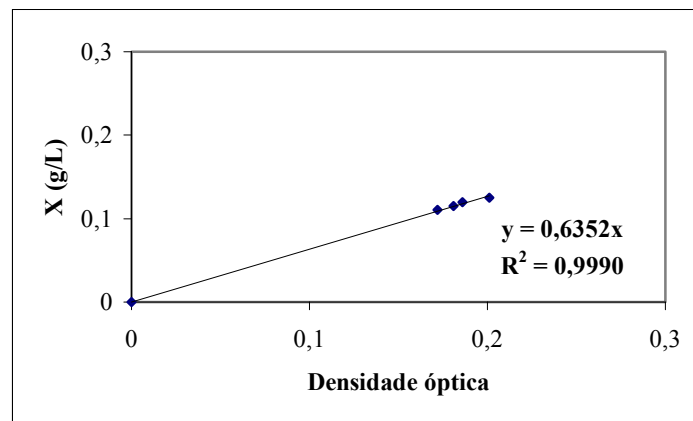


Figura 37 - Curva de calibração de concentração celular para o ensaio 5 ([glicose] = 40 g/L; pH = 6,0)

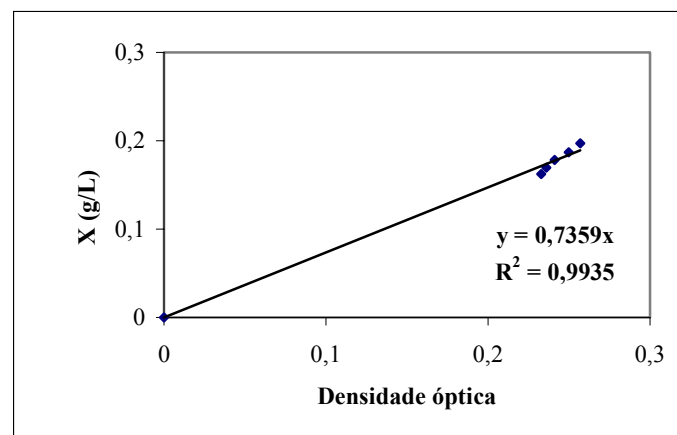


Figura 38 - Curva de calibração de concentração celular para o ensaio 5 (réplica) ([glicose] = 40 g/L; pH = 6,0)

APÊNDICE XI**I. Valores preditos e valores observados pelo modelo****Tabela 11 - Valores preditos e valores observados para o modelo de concentração máxima em acetoina (C_{acetoina})**

Ensaio	Valores observados	Valores preditos pelo modelo
1	6,245	6,2431
2	4,095	4,0931
3	7,970	7,9681
4	7,369	7,3671
5	6,150	6,4178
5 (réplica)	6,678	6,4178