

---

# **Produção do bioaroma acetoína por *Hanseniaspora guilliermondii* CCT3800 através de processo fermentativo**

Roseli Aparecida de Mello Bergamo (Mestre)

Curso de Bacharelado em Biotecnologia, Universidade Tuiuti do Paraná

Jorge Luiz Ninow (Doutor)

Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina

---

---

## Resumo

Os aromas estão entre os mais valiosos constituintes de alimentos, bebidas fármacos e cosméticos. As leveduras do vinho, em especial a levedura *Hanseniaspora guilliermondii*, têm-se mostrado boas produtoras de acetoína, um potencializador de aromas. Em face disso, o presente trabalho tem como objetivo o estudo da produção de acetoína por *Hanseniaspora guilliermondii* em processo fermentativo. No primeiro ensaio em frascos agitados, as concentrações de acetoína ficaram em torno de 330 mg.L<sup>-1</sup>. Os resultados obtidos neste trabalho são semelhantes aos encontrados na literatura.

**Palavras-chave:** Acetoina; Aromas; Leveduras; Fermentação.

## Abstract

Flavors are among the most important and valuable substances found on food, beverage, drugs and cosmetics. The yeasts found on wine, specially *Hanseniaspora guilliermondii* showed to be good producers of acetoin, a flavors enhancer. This work studies the production of acetoin by *Hanseniaspora guilliermondii* in fermentation. At the first experiment in agitation flasks the concentrations of acetoin obtained were about 330 mg.L<sup>-1</sup>, suchlike to results found on literature.

**Key words:** Acetoin, Flavours, Yeasts, Fermentation.

---

---

## Introdução

A ciência da microbiologia começou há algumas centenas de anos. Desde a antiguidade, o homem já fazia uso da preservação dos alimentos envolvendo inconscientemente, manipulações microbiológicas. A descoberta de que as leveduras possuem um papel fundamental na fermentação foi o primeiro elo entre a atividade dos micro-organismos e as modificações físicas e químicas nos materiais orgânicos. Foi o aprimoramento das técnicas tradicionais, aliado às técnicas de separação e purificação de compostos bioquímicos, que permitiu o surgimento dos primeiros empreendimentos de produção industrial de enzimas, ácidos orgânicos, antibióticos, vacinas, proteínas recombinantes e de agentes potencializadores de sabor, como o glutamato monossódico (Faith *et al.*, 1991).

Com o acentuado avanço do conhecimento científico na segunda metade do século XX, a microbiologia adentra em uma nova era, novas descobertas científicas no setor da engenharia e da bioquímica perfazem hoje um campo muito mais amplo, a biotecnologia.

A biotecnologia industrial é um conjunto de técnicas que permite gerar produtos de interesse econômico e/ou social, a partir de organismos vivos e/ou de seus componentes e metabólitos. Compreende um vasto conjunto de técnicas que usam seres vivos, ou parte

---

deles, para produzir ou modificar produtos, aumentar o crescimento de plantas e animais e ainda aprimorar e construir moléculas de interesse para uso comercial e medicinal. Entre estas moléculas, estão os aromas/flavours, sendo que estes estão entre os mais valiosos constituintes de alimentos. Muitas vezes, para reforçar ou melhorar o sabor de um alimento ou produto, faz-se necessário a adição de algum tipo de composto aromatizante, tornando o produto mais atrativo ao consumo humano. As características nutricionais dos alimentos, bem como a sua importância, são conhecidas por todos. No entanto, seu consumo ocorre principalmente devido ao cheiro e ao sabor, que tornam os alimentos atrativos aos consumidores (Mello, 2001; Mariotto, 2007).

É crescente a importância da biotecnologia na síntese de compostos aromatizantes. Os aromas sintéticos estão sendo substituídos gradativamente pelos de origem biotecnológica abrindo maiores oportunidades para que novas pesquisas sejam realizadas neste campo da ciência.

A produção de aromas através dos processos biotecnológicos é crescente e pode ser efetuada por duas vias: bioprodução e bioconversão. É crescente a importância da biotecnologia na síntese de compostos aromatizantes. Estima-se que mais de 10.000 compostos voláteis podem estar presentes nos alimentos, mais de

500 compostos voláteis foram relatados no café, vinho, cerveja, rum, chá preto e cacau (Berger, 1995). Já os aromas das bebidas alcoólicas são produzidos por um grande número de compostos, dentre eles, a acetoina, importante pelo seu desenvolvimento no buquê do vinho (Baumes *et al.*, 1986).

Estudos bibliográficos citam que várias leveduras produzem uma infinidade de aromas, dentre eles a acetoina. A acetoina, objeto deste estudo, é sintetizada quimicamente ou por ação microbiana a partir de uma fonte de açúcar. A acetoina é um composto potencializador de aromas também conhecido como 3-hidroxi-2-butanona, 2,3 butanona, acetil metil carbinol, dimetilcetol e  $\gamma$ -hidroxi- $\beta$ -oxobutano (C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>). Este aroma, é um líquido de odor agradável; Massa Molar 88,10 g. mol<sup>-1</sup> e ponto de ebulição a 148°C prescrita no MERCK INDEX (1990). Este é um produto normal da fermentação alcoólica do vinho e seu conteúdo pode variar dependendo do tipo de vinho produzido (Guymon e Crowell, 1961; Crowell e Guymon, 1995; Romano *et al.*, 1996; Romano *et al.*, 2000; Bars e Yvon, 2008).

Além do vinho, a acetoina é encontrada no mel, cacau, manteiga, café, morango, entre outros frutos (Xiao *et al.*, 2007; Bars e Yvon, 2008). Embora haja muitos métodos para a síntese química da acetoina, uma série de esforços tem sido realizada para desenvolver

a produção natural dos aromas, utilizando diversas vias biotecnológicas, dentre elas, a via fermentativa e a via enzimática, métodos que são ecologicamente corretos e menos poluentes, atendendo a exigência de uma gama de consumidores que preferem produtos naturais, em vez de seus correspondentes químicos (Xiao et al, 2007).

Vários micro-organismos produzem a acetoína, dentre estes, estão as leveduras apiculadas do gênero *Kloeckera* e *Hanseniaspora*. Estas têm sido objeto de numerosos estudos quanto à sua importância no processo de vinificação e produção de aromas (Romano et al.,1992, 1993, 1996, 2003; Ciani e Picciotti,1995; Silva,1996; Teixeira, 2002, Xiao et al., 2007; Zhao et al.,2009). Em relação a esta molécula, as leveduras apiculadas do vinho, especialmente a *Hanseniaspora guilliermondii*, têm se mostrado boas produtoras deste aroma (Romano et al., 1996; Moritz, 1998; Teixeira, 2002; Mariotto, 2007).

Diante do exposto, este trabalho tem como objetivo principal o estudo da produção de acetoína por *Hanseniaspora guilliermondii* por via fermentativa, usando glicose com fonte de carbono.

## Material e métodos

### Micro-organismos

O micro-organismo escolhido para a realização dos ensaios fermentativos foi uma levedura apiculada *Hanseniaspora guilliermondii* CCT 3800, obtida da Fundação Tropical de pesquisas e Tecnologia “André Toselo”.

### Meio de cultura

O meio utilizado foi o meio YM (Yeast Malt Extract) composto por extrato de levedura (3,0 g.L<sup>-1</sup>); extrato de malte (3,0 g.L<sup>-1</sup>); bactopectona (5,0 g.L<sup>-1</sup>) e glicose (64,0 g.L<sup>-1</sup>), pH 5,5 corrigido com ácido cítrico 0,5% e esterilizado por 15 minutos a 121°C.

### Determinação da concentração celular

A concentração celular obtida nos ensaios fermentativos foi determinada por dois métodos: indiretamente por turbidimetria e diretamente por gravimetria.

As medidas de absorvância foram realizadas a um comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 550 nm em espectrofotômetro modelo E 225-D marca CELM em cubetas de vidro de 1cm de diâmetro. Os valores obtidos foram convertidos em concentração celular, (massa de matéria seca por unidade de volume), utilizando-se uma curva de calibração determinada para cada ensaio.

### Determinação da concentração de glicose

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

### Determinação da concentração de acetóina

As amostras foram obtidas através de filtração a vácuo em filtro milipore com membrana de acetato de celulose (0,8  $\mu\text{m}$ ) previamente seca e pesada. A concentração de acetóina foi determinada por cromatografia em fase gasosa, utilizando-se cromatógrafo CG- 90- DIC equipado com detector de ionização de chama (DIC ar-hidrogênio e coluna de sílica fundida ( $\varnothing$  0,53 mm x 30 m) modelo Supercowax 10. Os parâmetros utilizados no desenvolvimento da análise (vazão do gás de arraste e temperatura da coluna) foram avaliados a fim de obter uma melhor separação dos componentes. O gás de arraste foi o nitrogênio com fluxo de 10 mL.min<sup>-1</sup>; os gases de chama foram o hidrogênio e ar com vazão de 90 mL.min<sup>-1</sup> e 320 mL.min<sup>-1</sup> respectivamente. As temperaturas utilizadas foram: temperatura da coluna de 85°C; temperatura do detector de 230°C e temperatura do injetor de 185°C. O volume da amostra foi de 1  $\mu\text{l}$ . Uma curva de calibração foi preparada a cada série de testes, com concentração de acetóina de

0,01 a 1,0 g.L<sup>-1</sup>. o tempo de análise foi de 6 min. As amostras e os padrões foram diluídos de forma que a concentração se encontre na faixa de linearidade da curva de calibração. A integração e os cromatogramas foram obtidos através de uma placa interface AD/DA (MICROQUÍMICA, Indústria e Comércio Ltda).

### Ensaio em frascos agitados "shakers"

O objetivo deste trabalho foi testar diferentes concentrações iniciais de glicose como fonte de carbono para produção de acetóina. Foram realizadas fermentações com a levedura *Hanseniaspora Guilhermondii* CCT 3800 em frascos agitados (triplicatas) de 1000 mL, cada frasco contendo 350 mL do meio YM.

Foram testadas diversas concentrações de glicose conforme estudos anteriores realizado por Teixeira (1999), para determinar a melhor concentração de glicose para a produção de acetóina.

A pré-cultura foi preparada com a mesma composição do meio de fermentação e inoculada com duas alçadas da cultura estoque, mantida sob agitação por 17 horas. Os frascos de fermentação foram inoculados com 10% da pré-cultura, depois de esterilizados, após ter seu pH ajustado com solução de ácido cítrico 0,5%. Os frascos agitados foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 min. As condições de cultura utilizadas

foram baseadas nas descritas por Moritz (1998). Os processos foram acompanhados durante 24 horas, sendo avaliadas: concentração celular, concentração de glicose e acetoína.

### Metodologia para cálculo da fermentação em frascos agitados

A partir dos perfis de crescimento celular de produção de acetoína e consumo de glicose com o tempo, foi possível determinar, a formação de produto e consumo de substrato.

#### Velocidade específica de crescimento.

A determinação da velocidade instantânea crescimento celular de acordo Scriban (1985), pode ser obtida através da *constante de velocidade de crescimento*. Este parâmetro é largamente empregado. A determinação da velocidade específica na fase exponencial de crescimento ( $\mu$ ), é determinada pela velocidade com que a população cresce em cada instante, ou seja, a velocidade instantânea de crescimento ( $dX/dt$ ), é igual ao número de células neste tempo ( $X$ ), integrando a equação tem-se:

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$$

A Velocidade específica máxima de crescimento foi determinada através do coeficiente angular da reta obtida, relacionando-se o logaritmo neperiano da concentração celular com o tempo na fase exponencial de crescimento, de acordo com a equação. Distribuindo os dados da fase exponencial em coordenadas semi-logarítmicas (Urgel, 2001; Scriban, 1985).

$$\frac{d \ln(X)}{dt} = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \mu$$

Como essa fase tem a distribuição de uma reta a velocidade específica de crescimento.

$X_{0i}$  = Concentração celular no instante de início da fase exponencial

$$\log X - \log X_{0i} = \mu_m (t - t_i)$$

O fator de conversão de substrato (Glicose) em células é expresso pela equação.

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S}$$

onde:

$Y_{x/s}$  = fator de conversão de substrato em biomassa (células), expresso em g de matéria seca x g de substrato consumido.

$X_0$  = Concentração inicial celular ( $\text{g.L}^{-1}$ );

$X$  = Concentração máxima celular ( $\text{g.L}^{-1}$ );

$S_0$  = Concentração de glicose ( $\text{g.L}^{-1}$ ).

$S$  = Concentração final de glicose ( $\text{g.L}^{-1}$ );

Para calcular a produtividade, temos o fator de conversão de substrato (glicose) em produto é descrito pela equação abaixo (Urgel, 2001; Scriban, 1985).

$$P = \frac{S_F - S_0}{T_F}$$

Onde;

$S_0$  = Substrato inicial;

$S_F$  = Substrato final;

$T_F$  = Tempo total de fermentação (h), quando a concentração celular é máxima

$P$  = valor de produto formado (acetóina);

$\mu(\text{h}^{-1})$  = velocidade específica do crescimento celular.

## Resultados e discussão

Foram realizados cultivos em frascos agitados para verificar as características do crescimento da levedura

e também para avaliar a influência da concentração inicial de substrato (glicose) e do tempo sobre a produção de acetóina. Estes experimentos foram realizados mantendo-se constantes a temperatura em  $30^\circ\text{C}$ ; o pH inicial 5,5 e a velocidade de agitação em 150 rpm, variando a concentração inicial de glicose no meio, objetivando verificar a influência desta última sobre os parâmetros cinéticos.

Os resultados são apresentados a seguir na tabela 1. É possível observar que na concentração inicial de glicose de  $40 \text{ g.L}^{-1}$  o tempo gasto para o consumo total de glicose foi de 13 horas e na concentração inicial de glicose de  $70 \text{ g.L}^{-1}$  o consumo total foi de 24 horas, demonstrando que o consumo de glicose é diretamente proporcional ao tempo e a concentração inicial de substrato.

Para a conversão de substrato em acetóina, não foi observada esta relação, pois, não houve variação significativa de acetóina nas diversas concentrações de substrato utilizado.

Tabela 1. Parâmetros cinéticos para a produção de acetóina em diversas concentrações de glicose.

Concentração inicial de glicose ( $\text{g.L}^{-1}$ )	Produção de acetóina ( $\text{P/mg.L}^{-1}$ )	Tempo final (h) para o Consumo de glicose
40	312,00	13h
50	336,36	16h
60	340,60	21h
70	328,65	24h

A conversão de substrato em células e a velocidade específica de crescimento da levedura são descritos na tabela 2.

Os valores alcançados neste experimento em concentrações iniciais de glicose de 40 g.L<sup>-1</sup> encontrou-se os valores de 0,29 g.g<sup>-1</sup> para conversão de substrato em células e 0,59 h<sup>-1</sup> para a velocidade específica máxima de crescimento, e para as concentrações iniciais de glicose de 50 g.L<sup>-1</sup>, 60 g.L<sup>-1</sup> e 70 g.L<sup>-1</sup> respectivamente foram encontrados os valores de: 0,32 g.g<sup>-1</sup>; 0,25 g.g<sup>-1</sup> e

Tabela 2. Parâmetros cinéticos do crescimento celular.

Concentração inicial de glicose (g.L <sup>-1</sup> )	Y <sub>x/s</sub> (g/g)	μ(h <sup>-1</sup> ).
40	0,29	0,59
50	0,32	0,46
60	0,25	0,42
70	0,27	0,44

0,27 g.g<sup>-1</sup> para a conversão de substrato em células e para a velocidade específica máxima de crescimento foram de 0,46 h<sup>-1</sup>; 0,42 h<sup>-1</sup> e 0,44 h<sup>-1</sup> respectivamente para as demais concentrações.

Os valores de 0,29 g.g<sup>-1</sup> e 0,32 g.g<sup>-1</sup> são superiores ao resultado descrito por Teixeira (2002) que, estudando várias concentrações de glicose encontrou 0,27 g.g<sup>-1</sup> e 0,52 h<sup>-1</sup> para conversão de substrato em células e velocidade específica máxima de crescimento, respectivamente nas mesmas condições.

As variações das concentrações de biomassa, glicose e acetoína para estas fermentações também são representadas nos gráficos 1;2;3 e 4.

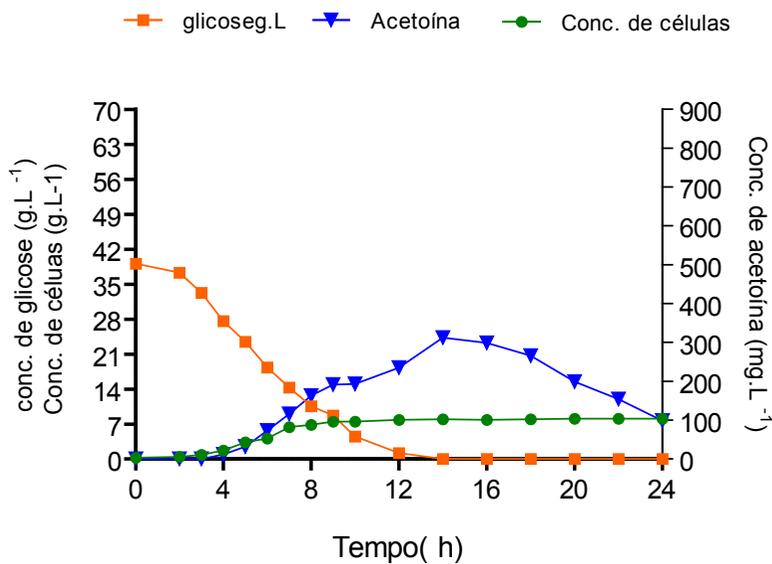
A análise das curvas de crescimento representadas nos gráficos 1;2;3 e 4 permitem verificar que a fase de adaptação (fase lag) foi pequena para todos os ensaios fermentativos. O início do crescimento microbiano deu-se após 4 horas de fermentação para todas as culturas, deste trabalho, demonstrando que as diferenças nas concentrações iniciais de glicose não

influenciam na produção de biomassa inicial.

O gráfico 1 demonstra que o consumo de glicose e a conversão de biomassa na concentração inicial de glicose de 40 g.L<sup>-1</sup> foi de 8,0 g.L<sup>-1</sup> de células. Pode-se notar que durante a fase *lag* de crescimento celular, além de não haver geração de células, não ocorre também produção de acetoína, apesar de haver um grande consumo de substrato. Observa-se que a produção de acetoína inicia-se durante a fase exponencial do crescimento celular. O crescimento microbiano

pode ser considerado como um conjunto de reações bioquímicas, que levam à síntese dos constituintes da biomassa microbiana e metabólitos de interesse obtidos no final da operação. Os microrganismos são capazes de efetuar uma grande diversidade de reações bioquímicas, que se manifestam, quer pela produção de biomassa, quer pela produção e/ou transformação de substâncias orgânicas.

Gráfico 1 - Cinética do crescimento de *Hanseniaspora guilliermondii* em frascos agitados, evolução da concentração celular, glicose e acetóina à concentração inicial de glicose de 40 g.L<sup>-1</sup>.



Em processos fermentativos, o substrato principal é uma fonte de carbono, geralmente glicose ocorrendo a oxidação desta, onde, para cada mol de glicose oxidada dois moles de piruvato são formados e dois moles de NAD (nicotinamida adenosina dinucleotídeo) são reduzidos. O suprimento de NAD é limitado e o NAD reduzido tem que ser reoxidado, desde que a oxidação da glicose possa ser finalizada (Collins, 1972).

O piruvato é usado pelos micro-organismos para formar o ácido láctico, assim, a formação do ácido láctico é requerida para o balanço da glicólise. O citrato é uma outra fonte de carbono que quando presente no meio é utilizado para a obtenção do piruvato.

Este piruvato disponível não será necessariamente convertido a ácido láctico, ficando disponível para ser usado na síntese de outros metabólitos como o diacetil, acetóina e 2,3 butanodiol (Collins, 1972).

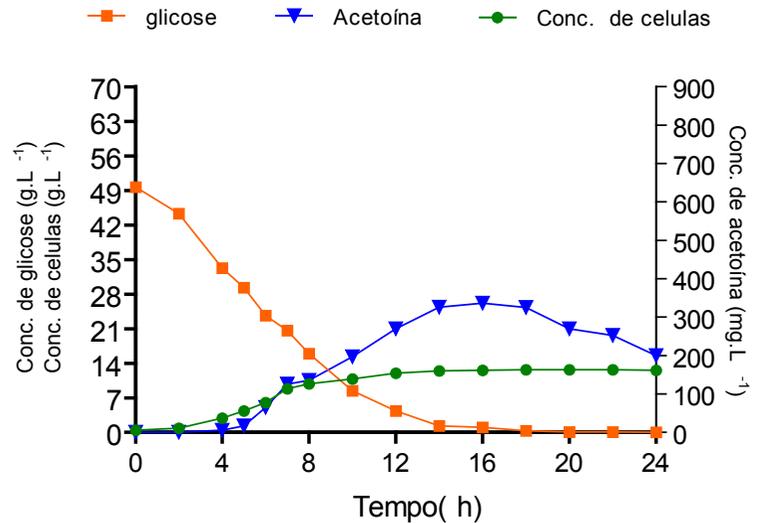
O gráfico 1 mostra que concentração máxima de acetóina (340,60 mg.L<sup>-1</sup>), neste trabalho, foi semelhante a encontrada por Teixeira (1999, 2002) em frascos agitados e bem superior às encontradas por Romano *et al* (1993), que citam terem usado 48 cepas de *H. guilliermondii*, onde produziram cerca de 200 mg.L<sup>-1</sup> de acetóina em mosto de uva. A diferença alcançada pode ser explicada pela falta de aeração do meio de cultura, já que para estes últimos o processo foi realizado sem agitação por 20 dias.

O gráfico 2 demonstra que a conversão de substrato em biomassa na concentração inicial de glicose de  $50 \text{ g.L}^{-1}$  foi de  $12,69 \text{ g.L}^{-1}$ ; é possível verificar também que o fator de conversão de substrato no produto acetoina foi de  $336,00 \text{ mg.L}^{-1}$ , valor semelhante ao alcançado por Teixeira (1999) e aos dos experimentos realizados neste trabalho conforme demonstra o gráfico 1.

De acordo com Romano & Suzzi (1996), nas leveduras do vinho, a acetoina é um metabólito secundário importante do metabolismo de carboidratos, que ocorre somente na presença de carboidratos fermentáveis ou de ácido pirúvico, necessário ao metabolismo destes microrganismos, principalmente para a síntese de material celular. Leveduras formam piruvato a partir da via glicolítica, o qual é descarboxilado à hidroxietilamina pirofosfato, chamado de Complexo Acetaldeído.

A Descarboxilação do piruvato requer tiamina pirofosfato e um metal bivalente ( $\text{Mg}^{++}$ ), a síntese ocorre através do piruvato, que é derivado da degradação de carboidratos. O acetaldeído ativo e o piruvato são transformados em  $\alpha$ - acetolactato pela ação enzimática de ácido acetohidroxi sintetase. Leveduras do gênero *Saccharomyces* produzem  $\alpha$ - acetolactato em concentrações consideráveis durante a fermentação e este composto pode ser facilmente convertido em acetoina e diacetil, particularmente, na presença de  $\text{O}_2$  (Romano,1996).

Gráfico 2- Cinética do crescimento de *Hanseniaspora guilliermondii* em frascos agitados, evolução da concentração celular, glicose e acetoina à concentração inicial de glicose de  $50 \text{ g.L}^{-1}$ .

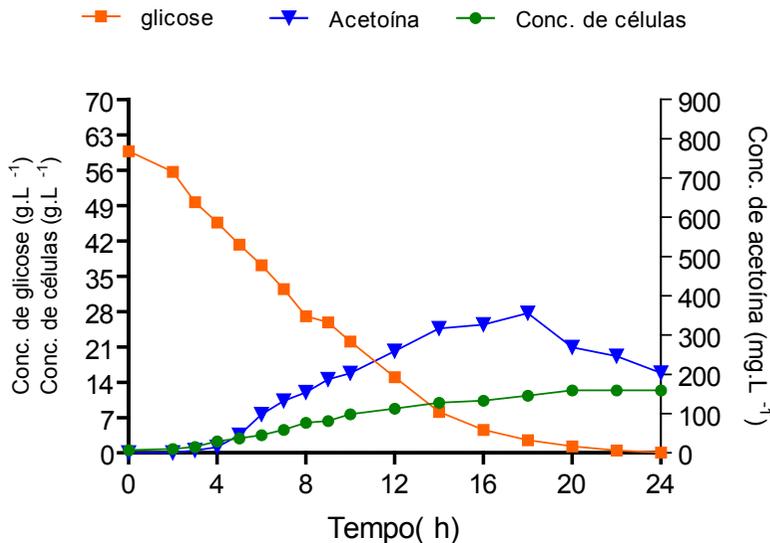


Os gráficos 3 e 4 demonstram que a conversão de substrato em biomassa nas concentrações iniciais de glicose de  $60 \text{ g.L}^{-1}$  e  $70 \text{ g.L}^{-1}$  foram de  $12,40 \text{ g.L}^{-1}$  e  $12,75 \text{ g.L}^{-1}$  respectivamente, analisando estes resultados é possível supor que não há diferenças significativas na conversão de substrato em biomassa em altas concentrações de glicose, estes resultados são semelhantes ao resultado do gráfico 2.

Em fermentações realizadas em biorreator, utilizando meio YM com  $40 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose inicial

e temperatura de 30°C, Moritz (1998) obteve uma concentração máxima em acetoina de 334 mg.L<sup>-1</sup>, valor semelhante ao alcançado por Teixeira (1999) e aos destes experimentos, onde se obteve a concentração máxima de acetoina de 340,60 mg.L<sup>-1</sup> conforme demonstrado no gráfico 3. Já o gráfico 4 demonstra que a concentração de máxima de acetoina obtida foi de 328,65 mg.L<sup>-1</sup>. Valor inferior ao encontrado na concentração inicial de glicose de 60 g.L<sup>-1</sup> demonstrado na tabela 1.

Figura 3 - Cinética do crescimento de *Hanseniaspora guilliermondii* em frascos agitados, evolução da concentração celular, glicose e acetoina à concentração inicial de glicose de 60 g.L<sup>-1</sup>.



Vários estudos têm revelado que a produção de compostos voláteis pelos micro-organismos é dependente da composição do meio e das condições da cultura.

Portanto, é possível supor que os metabólitos secundários produzidos no fermentado esteja interferindo na produção e conversão de acetoina em outros metabólitos com diacetil ou 2,3 butanodiol (Romano, 1997; Teixeira, 2002).

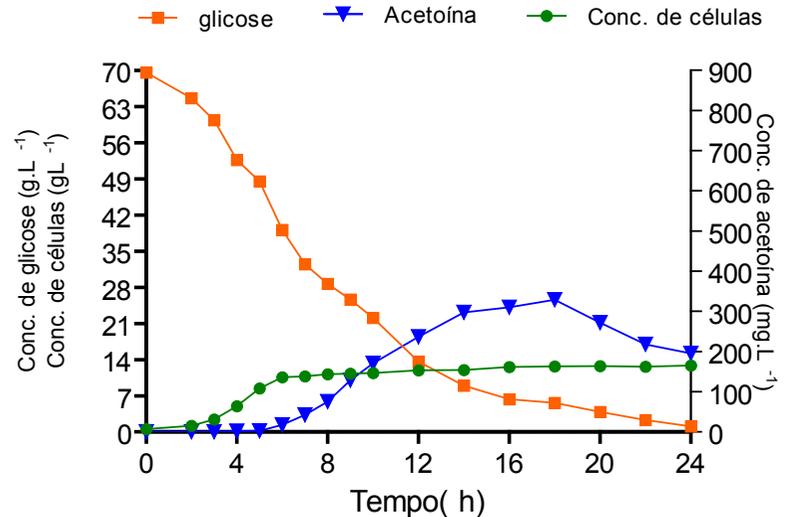
Com base nos resultados dos Gráficos (1;2;3 e 4), verifica-se que ocorre uma queda acentuada na produção de acetoina quando o substrato foi quase totalmente consumido. Provavelmente, a acetoina está sendo reduzida a 2,3 butanodiol ou a outro metabólito com diacetil. Esta hipótese é reforçada pelo fato de que quando ocorre a queda de acetoina, tem-se certamente uma aeração deficiente, pois, as fermentações foram realizadas em frascos agitados, limitando a transferência de oxigênio para a cultura. Segundo dados obtidos por Serbrennikov (1995), em estudos com culturas de *Bacillus polymixa* a baixa aeração e pH ácidos, aumenta a produção de 2-3 butanodiol, e reduz sensivelmente a produção de seu precursor a acetoina.

De acordo com diversos autores (Collins,1972; Amerine,1979; Romano *et al.*, 1997; 2003; Mariotto,2007), os micro-organismos e leveduras do vinho produzem vários metabólitos secundários de importância como o diacetil, acetoina, 2-3 butanodiol, ácido acético, acetaldeído,

etanol entre outros na presença de carboidratos fermentáveis ou de ácido pirúvico.

Desta forma, é provável que em elevadas concentrações de piruvato a levedura *H. guilliermondii* converta a acetoína em outros metabólitos, principalmente, diacetil e 2-3 butanodiol, já que estes fazem parte da via metabólica da acetoína em leveduras (Collins, 1972 e Romano *et. al.*, 1993). Este fato pode explicar a baixa concentração de acetoína encontrada neste experimento, utilizando alta concentração de glicose, além da glicose outros fatores como o pH e a aeração podem influenciar a produção destes metabólitos. Segundo Garg e Jain (1995), o pH é um parâmetro fundamental na regulação do metabolismo dos micro-organismos e esta influência é especialmente acentuada no processo envolvendo a formação de múltiplos subprodutos. O pH do meio fermentativo afeta a composição da biomassa e a natureza do metabolismo microbiano; como a maioria dos micro-organismos crescem mais lentamente em pH baixo, há uma maior disponibilidade de piruvato para ser utilizado na produção de acetoína, visto que, ao crescerem, as células requerem uma quantidade menor de piruvato para a síntese de material celular conforme descrito por Teixeira (1999). Já para Mariotto (2007), condições aeradas favorecem o desenvolvimento do microrganismo, alcançando maiores concentrações celulares. Desta maneira, o consumo da glicose presente no meio, e consequentemente a

Figura 4 - Cinética do crescimento de *Hanseniaspora guilliermondii* em frascos agitados, evolução da concentração celular, glicose e acetoína à concentração inicial de glicose de 70 g.L<sup>-1</sup>.



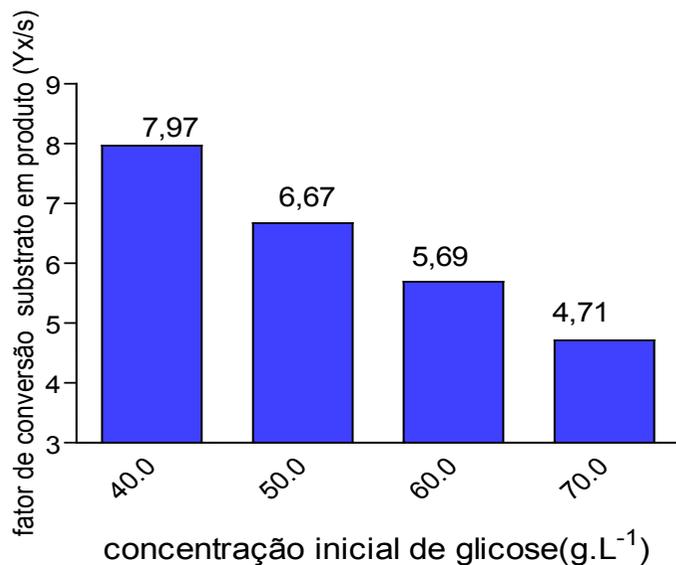
velocidade deste consumo, também devem ser maiores, a fim de suprir as necessidades celulares relacionadas a esta molécula.

Na Figura 5, estão representados os fatores de conversão de glicose em produto ( $P/mg.g^{-1}$ ) dos ensaios realizados em frascos agitados. Pode-se observar um maior rendimento de acetoína na cultura onde a concentração inicial de glicose foi de 40 g.L<sup>-1</sup>, apresentado um fator de conversão de substrato em produto de 8,0

mg.g<sup>-1</sup>. Observa-se ainda nesta figura, que o fator de conversão diminui com o aumento de concentração inicial de glicose.

Diante deste resultado, e considerando que a concentração máxima de acetoina obtida independente da concentração inicial de glicose conforme descrita na tabela 2, é possível supor que a glicose não é o fator principal para a conversão de substrato em produto, pois a quantidade de acetoina é praticamente constante

Figura 5 - Fator de conversão de glicose em produto (P) para diferentes concentrações iniciais de glicose.



nas diferentes concentrações iniciais de glicose utilizadas nestes experimentos.

Outros fatores como a disponibilidade de nitrogênio no meio, o pH e a aeração podem influenciar diretamente na produção do aroma acetoina.

## Conclusões

As fermentações em frascos agitados, fazendo variar as concentrações de glicose entre 40 e 70 g. L<sup>-1</sup> e mantendo constantes os demais parâmetros do processo apresentaram concentrações de acetoina semelhantes as da literatura em condições variadas.

A concentração inicial de glicose que apresentou o melhor fator de conversão de substrato, em produto (Y<sub>p</sub>/s, 97), foi a fermentação onde a concentração de glicose inicial foi de 40 g. L<sup>-1</sup>.

A utilização de outros meios de cultura poderá ser testada, talvez resíduos agro-industriais ricos em açúcares e nutrientes, objetivando a diminuição do custo de produção de acetoina e o aumento da mesma.

Outros parâmetros devem ser estudados para confirmar a hipótese de que é a aeração e a suplementação de nutrientes os fatores importantes para a conversão dos metabolitos de interesse.

A verificação da influência, da concentração de oxigênio dissolvido na produção de acetoina e 2,3 butanodiol, deve ser testada.

## Referências

- AMERINE, M.A.; KUNKEE, R.E. The Technology of Wine Making. 4<sup>th</sup> ed. *Avi Publishing Company, INC.* 161-239p, 1979.
- BARS, D.LE.; YVON, M. Formation of diacetyl and acetoin by *Lactococcus lactis* via aspartate catabolism. *Journal of Applied Microbiology* n.104, 2008, p. 171–177.
- BAUMES, R.; CORDONNER, R.; NITZ, S.; DRAWERT, F. Identification and Determination of Volatile Constituents in Wines from Different Vine Cultivars. *Journal Science Food Agriculture*. n.37, p 927-943. 1986.
- COLLINS, E. Biosynthesis of flavour compounds by microorganisms. *Journal of Dair Science*. v. 55, n. 7, 1972, p.1022-1028.
- CROWELL, E.A; GUYMON, J.F. Influence of aeration and Suspended Material on Higher Alcohols, Acetoin and Diacetyl during Fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* n.14, 1995, p. 214-222.
- FAITH, W.T.; NEUBERCK, C.E.; REESE, E. Production and Applications of enzymes. In *Advances in Biochemical Engineering*, n.1, 1991, p.77-111.
- GARG, S.K.; JAIN, A. Fermentative production of 2,3-butanediol: A review. *Bioresource Technology*, v. 51, 1995, p. 103-109.
- GUYMON, J.F.; CROWELL, E.A. The formation of Acetoin and Diacetyl during Fermentation and the Levels Found in Wines. *Am. Journal Enol. Vitic.* n.12, 1961, p.60 -66.
- MARIOTO, J.R. *Produção de Acetoína e 2-3 butanodiol por Bacillus polymyxa*, 2007, 75 p. Dissertação de Mestrado Departamento de Engenharia Química-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2007.
- MELLO, R. *Produção do Bioaroma acetoína por Hanseniaspora guilliermondii CCT 3800 através do processo fermentativo em batelada alimentada*. 2001. 79 p. Dissertação Mestrado em Biotecnologia Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.
- MORITZ, D.E. *Estudo do Crescimento de Três Leveduras Produtoras de Aromas*, 1998, 107p. Dissertação e Mestrado em Biotecnologia - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1998.
- ROMANO, P.; SUZZI, G. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* strains on the formation of acetaldehyde and acetoin during fermentation. Proceedings of Technical Meeting of the European Brewing Convention, Zoeterxolve, *The Netherlands*, 1992, p. 231-247.

\_\_\_\_\_. Biometric Study of Acetoin Production in *Hanseniaspora guilliermondii*, *Kloeckera apiculata*. *Applied and Environmental Microbiology*, June, 1993, p.1838-1841.

\_\_\_\_\_. Origin and production of acetoin during wine yeast fermentation– Minireview. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (2): 309-315, 1996.

\_\_\_\_\_. Glycerol and other fermentation products of apiculate wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*. n. 82, 1997, p. 615-618.

\_\_\_\_\_. Evaluation of stereoisomers of 2,3-butanediol and acetoin to differentiate *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* wine strains. *Biotechnology Letters*, n. 22: 2000, p.1947–1951.

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

SCRIBAN R. Biotecnologia. São Paulo: Manole,1985.

SEREBRENNIKOV, V.M. Effects of Temperature on the Biosynthesis of 2,3- butanediol and Acetoin under Varying Conditions of Batch Culturing of *Bacillus polymyxa* CCM 1465. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v.31, n.6, 1995, p. 537-542.

TEIXEIRA, R.M. *Otimização das condições de cultura para produção de acetóina por Hanseniaspora guilliermondii*, 1999, 111p. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, Universidade federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1999.

TEIXEIRA, R.M.; CAVALHEIRO D.; NINOW, J.L.; FURIGO, A.J.R. Optimization of Acetoin Production. By *Hanseniaspora Guilliermondii* Using Experimental Design. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. Vol. 19, No. 02, April - June 2002, p.181 – 186.

URGEL, A. L.; AQUARONE E.; BORZANI W.; SCHMIDELL W. Biotecnologia Industrial. São Paulo, vol. 3. Editora Edgard Bhucher, 2001.

XIAO, Z.; XU, P. Acetoin Metabolism in Bactéria. *Critical Reviews in Microbiology*, n.33, 2007, p.127–140.