

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PRODUÇÃO DO BIOAROMA ACETOÍNA A PARTIR DE HIDROLISADO DE
MELAÇO POR BACTÉRIAS DO GÊNERO *BACILLUS* ISOLADOS DO
SEDIMENTO DE MANGUE

Jackelline Larissa Albuquerque Correia

Recife
2015

JACKELLINE LARISSA ALBUQUERQUE CORREIA

**PRODUÇÃO DO BIOAROMA ACETOÍNA A PARTIR DE HIDROLISADO DE
MELAÇO POR BACTÉRIAS DO GÊNERO BACILLUS ISOLADOS DO
SEDIMENTO DE MANGUE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química da Universidade
Federal de Pernambuco, como requisito
parcial à obtenção do título de Mestre em
Engenharia Química.

Área de concentração: Engenharia de
Processos Químicos e Bioquímicos
Linha de Pesquisa: Processos Bioquímicos
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Glória Maria
Vinhas
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Olga Martins
Marques

Recife
2015

Catálogo na fonte
Bibliotecária Valdicéa Alves, CRB-4 / 1260

- C824p Correia, Jackelline Larissa Albuquerque.
 Produção do bioaroma acetoína a partir de hidrolisado de melaço
 por bactérias do gênero bacillus isolados do sedimento de mangue
 /Jackelline Larissa AlbuquerqueCorreia - Recife: O Autor, 2015.
 71folhas. Il.; Abr.; Sig.; Simb. e Tab.
- Orientadora: Prof^ª. Dr.^a Glória Maria Vinhas.
 Coorientadora: Prof^ª. Dr.^a Olga Martins Marques.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG.
 Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2015.
 Inclui Referências e Anexos.
1. Engenharia Química. 2. Bacillus. 3. Hidrolisado de melaço. 4. Acetoína.
 5. Aromas. I. Vinhas, Glória Maria. (Orientadora). II. Marques, Olga Martins.
 (Coorientador). III. Título.

UFPE

660.2CDD (22. ed.)

BCTG/2016 - 68

JACKELLINE LARISSA ALBUQUERQUE CORREIA

**PRODUÇÃO DO BIOAROMA ACETOÍNA A PARTIR DE HIDROLISADO DE
MELAÇO POR BACTÉRIAS DO GÊNERO BACILLUS ISOLADOS DO
SEDIMENTO DE MANGUE**

Área de concentração: Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco, defendida e aprovada em 9 de dezembro de 2015 pela banca examinadora constituída pelos seguintes membros:

Prof.^a Dr.^a Glória Maria Vinhas/DEQ-UFPE
(Orientadora)

Prof.^a Dr.^a Olga Martins Marques/DEQ-UFPE
(Co-orientadora)

Prof.^a Dr.^a Maria Alice Gomes de Andrade Lima/DEQ-UFPE
(Avaliadora Interna)

Prof.^a Dr.^a Samara Alvachian Cardoso Andrade/DEQ-UFPE
(Avaliadora Externa)

Prof.^a Dr.^a Sandra Maria Sarmento/DEQ-UFPE
(Avaliadora Interna)

Dedicatória

Aos meus pais, Marcus e Fátima por me
incentivar a realizar esse trabalho.

Ao meu marido Vinícius pelos seus, apoio,
carinho, compreensão e paciência.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre me guiando, e pela graça recebida de encerrar mais uma etapa na minha vida, renovando os meus caminhos para um novo amanhecer.

Aos meus pais Marcus e Fátima por todo o seu amor, pela compreensão nos momentos mais difíceis e no estímulo de lutar por meus ideais tão necessários para seguir adiante.

A minha irmã Michelline Lauanna por está sempre apoiando minhas decisões. Ao sobrinho Marcus Túllio por ser fonte de alegria em todos os momentos.

Ao meu marido Vinícius Fernando, por compreender as minhas ausências e por todo apoio que me deu neste tempo que estamos juntos.

Aos Tios queridos Rita, Elias e Nazaré pelo apoio e pela dedicação durante esta etapa.

Aos meus primos irmãos Lidiane e Rodrigo pelo carinho de sempre.

A Prof.^a Dr.^a Olga Martins Marques pelas orientações e dedicação nesse trabalho.

A Prof.^a Dr.^a Glória Maria Vinhas pelas orientações e sugestões.

Ao Prof. Dr. Schuler e Valmir por disponibilizar equipamentos necessários às análises e também pela atenção e ajuda na utilização dos mesmos.

A Prof.^a Dr.^a Samara Alvachiane Prof.^a Dr.^a Sandra Maria Sarmento, pela atenção prestada e pelas correções sugeridas.

Aos Amigos, Marcélio Alves, Monyk Melo e Rafaela Amaral pelos incentivos e ajuda durante toda essa jornada.

Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia, Conceição, Gisele, Iago, Felipe, Dário e Rosyanepelo auxílio durante a fase experimental.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

E às dificuldades que surgiram, pois ao serem superadas, tornam essa conquista mais valiosa e gratificante.

“Que os vossos esforços desafiem as
impossibilidades, lembrai-vos de que as
grandes coisas do homem foram conquistadas
do que parecia impossível.”

(Charles Chaplin)

RESUMO

A aplicação de processos biotecnológicos para a produção de aromas alimentares tem apresentado um crescimento bastante significativo, já que esses aromas são classificados como aromas naturais. Acetoína (3-hidroxi 2-butanona ou metil carbinol acetil) é uma substância volátil bastante utilizada em produtos alimentícios, com a finalidade de intensificar o sabor e o aroma dos alimentos, deixando-os mais atrativos aos consumidores. Este trabalho tem como objetivo produzir o bioaroma acetoína por via bioquímica a partir de hidrolisado de melaço utilizando as bactérias do gênero *Bacillus* isoladas do sedimento de mangue da Lagoa do Araçá (Recife-PE). Foi possível identificar nove espécies desse gênero (*B. alvei*, *B. badius*, *B. circulans* "A", *B. circulans* "B", *B. coagulans*, *B. larvae*, *B. licheniformis*, *B. polymyxa*, *B. popilliae* e *B. subtilis*.) sendo cinco espécies (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. polymyxa*, *B. alvei* e *B. coagulans*) produtoras do bioaroma acetoína. Foi realizado um planejamento fatorial 2^3 com as variáveis independentes: agitação (0 rpm a 200 rpm), pH (6,5 a 8,5), concentração de melaço ($60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ a $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e como variáveis dependentes a conversão de substrato em produto por três bactérias (*Bacillus licheniformis*, *Bacillus alvei* e *Bacillus polymyxa*). Com esse estudo foi possível observar que a agitação foi a principal variável que afetou os três processos de conversão de substrato em acetoína e que a interação do pH com agitação mostrou-se bastante significativo favorecendo essa conversão com os três micro-organismos. Os *Bacillus licheniformis* foi a bactéria que apresentou maior percentual de $Y_{P/S}$ (52,88%) com pH 6,5, agitação de 200 rpm e concentração de melaço de $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. A partir deste resultado foi realizado um estudo cinético em reator batelada de 3L, do tipo tanque agitado, com sistema de aeração. O processo foi acompanhado por determinação de açúcares redutores totais (ART), biomassa (Peso seco), produto (Cromatografia Gasosa). A síntese bioquímica foi interrompida em 144 horas com consumo de 54% dos açúcares. No final do processo a concentração de açúcar residual estabilizou-se em $23,44 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e a produção máxima de acetoína foi de $16,11 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. A produtividade de acetoína foi $P_v = 0,11 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$. A velocidade específica máxima de crescimento do *B. licheniformis* foi $\mu_{\text{máx}} = 0,025 \text{ h}^{-1}$. Os coeficientes de conversão de substrato em células e substrato em produto foram respectivamente: $Y_{X/S} = 0,1 \text{ g/g}$ e $Y_{P/S} = 0,58 \text{ g/g}$. Com esse estudo pode-se concluir que a produção de bioaromas, utilizando hidrolisado de melaço por *Bacillus* pode ser uma alternativa de produção para gerar produtos com baixo custo e alto valor agregado.

Palavras-chave: *Bacillus*, Hidrolisado de melaço, Acetoína, Aromas

ABSTRACT

The application of biotechnological processes for producing flavoring aromas has shown a significant growth, since these are classified as natural flavors. Acetoin (3-hidroxi 2-butanone or acetyl methyl carbinol) is a volatile substance widely used in food products, in order to intensify the taste and flavor of food, making it more attractive for consumers. This work aims to biochemically produce acetoin aroma from hydrolyzate of molasses, using the bacteria of bacillus genus isolated of the sediment mangrove of the Araçá lagoon (Recife-PE). It was possible to identify nine species of this genus (*B. alvei*, *B. badius*, *B. circulans* "A", *B. circulans* "B", *B. coagulans*, *B. larvae*, *B. licheniformis*, *B. polymyxa*, *B. popilliae* e *B. subtilis*.), but only five among these (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. polymyxa*, *B. alvei* e *B. coagulans*) are able to produce the acetoin bioaroma. It's made a factorial planning 2^3 with the independent variables: agitation (0 rpm to 200 rpm), pH (6.5 to 8.5), molasses concentration ($60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ a $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) and as independent variables the conversion of substrate in product for three bacteria (*Bacillus licheniformis*, *Bacillus alvei* e *Bacillus polymyxa*). With this study, it was possible to notice that the agitation was the main variable to affect the three processes of conversion of substrate into acetoin, and also that the pH interaction along with the agitation has been proven very significant, contributing to this conversion with the three microorganisms. *B. licheniformis* was the bacteria that showed the highest percentage of $Y_{P/S}$ (52.88%) with pH 6.5, agitation of 200 rpm and molasses concentration of $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Using these results, a kinetic study was performed in a batch reactor a three-liter, stirred type tank with aeration system. The process was accompanied by determination of total reducing sugars (ART), biomass (dry weight), product (gaseous chromatography). The biochemical synthesis was interrupted after 144 hours, with consumption of 54% of sugars. At the end of the process, the concentration of residual sugar stabilized in $23.44 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ and the maximum production of acetoin was $16.11 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. The productivity of acetoin was $P_v = 0.11 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$. The maximum specific speed of increase of *B. licheniformis* was $\mu_{\max} = 0.025 \text{ h}^{-1}$. The substrate conversion coefficients in cells and substrate in product respectively were: $Y_{X/S} = 0.1 \text{ g/g}$ and $Y_{P/S} = 0.58 \text{ g/g}$. With this study, it can be understood that the bio-aroma production using hydrolyzate of molasses by *Bacillus licheniformis* can be an alternative way to generate products with low cost and high aggregate value.

Keywords: *Bacillus*, Hydrolyzate of molasses, Acetoin, Aroma

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Melaço de cana-de-açúcar.....	24
Figura 2.2	Bactéria do gênero <i>Bacillus</i> visto ao microscópio ótico.....	25
Figura 2.3	Estrutura química da acetoína.....	26
Figura 2.4	Mecanismo de formação da acetoína e 2,3-butanodiol.....	28
Figura 2.5	Fluxograma exemplificando um planejamento experimental.....	29
Figura 2.6	Cubo demonstrando as combinações possíveis em um planejamento factorial.....	31
Figura 3.1	Pontos de coleta situados entorno da Lagoa do Araçá-PE.....	38
Figura 3.2	Chave de caracterização para bactérias do gênero <i>Bacillus</i>	40
Figura 3.3	Processo de produção de acetoína em biorreator.....	45
Figura 4.1	Percentual microbiológico de <i>Bacillus</i> na Lagoa do Araçá.....	50
Figura 4.2	Efeitos principais e de interação na conversão de substrato em acetoína, nos ensaios realizados com <i>Bacillus licheniformis</i> (a), <i>Bacillus alvei</i> (b) e <i>Bacillus polymyxa</i> (c).....	55
Figura 4.3	Superfície de resposta da conversão em acetoína realizados com <i>Bacillus licheniformis</i> (a), <i>Bacillus alvei</i> (b) e <i>Bacillus polymyxa</i> (c), em função do pH e agitação.....	56
Figura 4.4	Superfície de resposta da conversão em acetoína realizados com <i>Bacillus licheniformis</i> (a), <i>Bacillus alvei</i> (b) e <i>Bacillus polymyxa</i> (c), em função da agitação e concentração de melaço.....	58
Figura 4.5	Evoluções da concentração de substrato, biomassa e acetoína no tempo	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Aplicações da Acetoína.....	26
Tabela 2.2	Matriz típica de um planejamento fatorial 2^3	33
Tabela 3.1	Composição do meio PAY (<i>Phosphate Ammonium Yeast</i>).....	42
Tabela 3.2	Níveis codificados das variáveis para os ensaios.....	44
Tabela 4.1	Composição físico-química do melaço de cana-de-açúcar.....	52
Tabela 4.2	Resultados da determinação de açúcares totais em meio de melaço hidrolisado.....	52
Tabela 4.3	Resultado obtido do planejamento fatorial 2^3	53
Tabela 4.4	Tabela de análise de variância para a conversão de substrato em produto obtida nos ensaios realizados com <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus alvei</i> e <i>Bacillus polymyxa</i>	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
ARS	Açúcares Redutores Simples
ART	Açúcares Redutores Totais
ATP	Trifosfato de adenosina
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DNS	3,5 Dinitrosalicílico
FEMA	<i>The Flavor and Extract Manufactures Association of the United States</i>
GL	Graus de liberdade
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
JECFA	<i>Joint Expert Committee on Food Additives</i>
MQ	Média Quadrática
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida e adenina (oxidado)
NAD ⁺ H ⁺	Dinucleótido de nicotinamida e adenina (reduzido)
PAY	<i>Phosphate Ammonium Yeast</i>
PB	Paraíba
SQ	Soma Quadrática
TPP	Tiamina pirofosfato
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

LISTA DE SIMBOLOS

CO ₂	Dióxido de carbono	
C ₄ H ₈ O ₂	Acetoína	
Ca	Cálcio	
HCl	Ácido Clorídrico	
K	Potássio	
K ₂ HPO ₄	Fosfato monoácido de Potássio	
KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de Potássio	
lnx	Logaritmo da concentração de biomassa	
MB	Peso da membrana com biomassa	
MV	Peso da membrana vazia	
Mg	Magnésio	
mm	milímetros	
N	Nitrogênio	
NaOH	Hidróxido de sódio	
(NH ₄) ₂ HPO ₄	Fosfato de amônio dibásico	
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de amônio	
nm	Nanômetro	
°C	Graus Celsius	
p	Nível de significância	
ppb	Partes por bilhão	
p/v	% peso por volume	
P	Fósforo	
PSX	Peso seco de biomassa	g.L ⁻¹
P _v	Produtividade	g.L ⁻¹ .h ⁻¹
P _f	Concentração de produto final	g.L ⁻¹
P ₀	Concentração de produto inicial	g.L ⁻¹
rpm	Rotação por minuto	
S _f	Concentração final de açúcares	g.L ⁻¹
S ₀	Concentração inicial de açúcares	g.L ⁻¹
t	Tempo	h

VF	Volume utilizado	mL
v/v	Percentual volume por volume	cm ³ /cm ³
x _f	Concentração de biomassa final	g.L ⁻¹
X _f	Concentração de biomassa no tempo considerado	g.L ⁻¹
x ₀	Concentração inicial do inóculo	g.L ⁻¹
x ₁ , x ₂ ,... x _p	Fatores de entrada controláveis	
z ₁ , z ₂ ,... z _q	Fatores de entrada não-controláveis	
Y _{X/S}	Conversão de substrato em células	g.g ⁻¹
Y _{P/S}	Conversão de substrato em produto	g.g ⁻¹
μ _{máx}	Velocidade específica máxima de crescimento	h ⁻¹
μL	Microlitro	
ΔX/Δt	Velocidade média de formação de biomassa	g.L ⁻¹ .h ⁻¹
ΔS/Δt	Velocidade média de consumo de açúcares	g.L ⁻¹ .h ⁻¹

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1 CLASSIFICAÇÃO DOS AROMAS	18
2.2 BIOAROMAS	19
2.3 A BIOTECNOLOGIA DO AROMA NATURAL	20
2.4 PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE BIOAROMAS UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS	21
2.5 MELAÇO	23
2.6 BACTÉRIAS DO GÊNERO <i>BACILLUS</i>	24
2.7 ACETOÍNA	25
2.7.1 Biossíntese da Acetoína	27
2.8 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	29
2.8.1 Planejamento Fatorial 2 ³	30
2.8.2 Estudos utilizando planejamento fatorial 2 ³	33
2.9 PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM NA PRODUÇÃO DE ACETOÍNA	34
2.9.1 Suprimento de oxigênio	35
2.9.2 Concentração do substrato	35
2.9.3 Inóculo	36
2.9.4 Potencial hidrogeniônico (pH)	36
2.9.5 Temperatura	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 MICRO-ORGANISMOS - LINHAGENS DE <i>BACILLUS</i>	38
3.1.1 Isolamento e Caracterização	38
3.1.2 Avaliação do Potencial para Produção do Bioaroma de Acetoína	39
3.2 MEIOS DE CULTURA	41
3.2.1 Isolamento	41
3.2.2 Manutenção	41
3.2.3 Meio para Produção do Bioaroma	41
3.3 PREPARO DO INÓCULO	43
3.4 SUBSTRATO E CARACTERIZAÇÃO	43
3.5 PRODUÇÃO DE ACETOÍNA	43
3.5.1 Delineamento Fatorial	44
3.5.2 Estudo Cinético	45
3.5.3 Parâmetros Cinéticos	46
3.5.3.1 Velocidades Médias e Específica	46
3.5.3.2 Fatores de conversão de substrato em biomassa e em produtos	46

3.5.3.3 <i>Produtividade</i>	47
3.6 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS	47
3.6.1 Determinação dos Açúcares	47
3.6.1.1 <i>Açúcares Redutores Totais (ART)</i>	47
3.6.1.2 <i>Açúcares Redutores Simples (ARS)</i>	48
3.6.2 Concentração de Produto (Acetoína)	48
3.6.3 Concentração da Biomassa	48
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO <i>BACILLUS</i> DE SEDIMENTO DE MANGUE	50
4.2 CARACTERIZAÇÃO DO MELAÇO	51
4.3 PLANEJAMENTO FATORIAL	52
4.4 CINÉTICA DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ACETOÍNA	59
5 CONCLUSÃO	61
6 SUGESTÕES	62
REFERÊNCIAS	63
ANEXOS	69

1 INTRODUÇÃO

As características nutricionais dos alimentos, bem como a sua importância, são conhecidas por todos. No entanto, seu consumo ocorre principalmente devido ao odor e ao sabor, que tornam os alimentos atrativos aos consumidores. Por isso, as indústrias acrescentam aos alimentos aditivos, que são usados para intensificar ou padronizar os sabores e os odores dos produtos alimentícios, de forma a intensificar o aroma e aumentar o interesse dos consumidores (MARIOTTO, 2007).

Um aditivo bastante utilizado para melhorar o aroma e o sabor em produtos alimentícios é a acetoína. Conhecida como 3-hidroxi-2-butanona ou metil carbinol acetil, é um líquido amarelado com odor agradável, utilizado principalmente em produtos de panificação, doces, manteiga, laticínios, bebidas e dentre outros. Também pode ser utilizada em produtos cosméticos, detergentes, sabões, loções e assim por diante, para formar um perfil de aroma desejável com outras composições aromatizantes (XIAO & LU, 2014).

Há vários métodos de síntese química para a preparação de acetoína (TODA, *et al.*, 1989; BLOM, 1945), mas muitos trabalhos recentes têm sido para o desenvolvimento da produção de acetoína natural, utilizando vias biotecnológicas (COSTELLI, 2005; LIU, *et al.*, 2011; BARROS, 2011; XIAO & LU, 2014). Aromas produzidos por vias biotecnológicas (enzimática ou fermentativa) são considerados mais saudáveis pelos consumidores do que aqueles produzidos por vias sintéticas utilizando derivados da petroquímica (MARIOTTO, 2007).

O uso de resíduos agroindustriais utilizados como substratos vem despertando grande interesse nos pesquisadores a fim de buscar soluções para a redução de custos dos processos biotecnológicos como também minimizar os problemas decorrentes do acúmulo desses na natureza. A produção de compostos de aroma utilizando bactérias do gênero *Bacillus* em resíduos agroindustriais é relativamente restrita na literatura. (ALEXANDRINO *et al.*, 2007; BARROS, 2011).

Diversos autores (COSTELLI, 2005; MARIOTTO, 2007; SUN, *et al.*, 2012) relataram a produção de acetoína em meio de glicose com pH ácido, mas não há citações na literatura sobre a produção de acetoína em meio com pH básico.

O grupo do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco desenvolve trabalhos associados à caracterização da microbiota de diferentes ambientes ecológicos, com a finalidade de

identificar a biodiversidade local e a partir daí, determinar as habilidades e os potenciais bioquímicos, fisiológicos e estruturais desse grupo de organismos. Atualmente realizou-se estudos para identificar bactérias autóctones de sedimento de mangue da Lagoa do Araçá-PE, e neste trabalho ficou demonstrado que havia uma predominância significativa de bactérias do gênero *Bacillus*, chegando a 96,5% do total dos isolados (CORREIA, *et al.*, 2014), uma excelente fonte de bactérias produtoras de acetoína. Devido ao grande percentual de micro-organismos desse gênero e levando em consideração que existem poucos estudos relacionados à produção de acetoína a partir de resíduos agroindustriais, o presente estudo teve como objetivo geral produzir o bioaroma acetoína por via bioquímica a partir de hidrolisado de melaço como fonte de carbono, utilizando micro-organismos isolados de sedimento de mangue da Lagoa do Araçá-PE.

Sendo os objetivos específicos:

- Isolar e identificar linhagens de bactérias do gênero *Bacillus* de sedimento de mangue com potencial para produção de acetoína;
- Produzir acetoína em hidrolisado de melaço (pH básico);
- Estudar a cinética da produção de acetoína em hidrolisado de melaço

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CLASSIFICAÇÃO DOS AROMAS

Os aromas são aditivos indispensáveis nas indústrias de alimentos, bebidas e cosméticos. Sua percepção leva o consumidor à aceitação ou à rejeição de um produto. No caso dos alimentos, apesar das ótimas características nutricionais, eles são consumidos devido às características organolépticas como aroma, sabor e textura (COSTELLI, 2005).

Os aromatizantes são geralmente utilizados na indústria com a função de impedir alterações, caracterizar, melhorar, padronizar e/ou reconstituir o aroma/sabor dos produtos, além de serem também utilizados para mascarar os aromas e sabores indesejáveis que possam ocorrer durante o processamento de alimentos (FANI, 2011).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Resolução nº 2, de 15 de janeiro de 2007), os aditivos aromatizantes e aromas são substâncias ou misturas de substâncias com propriedades odoríferas e/ou sápidas, capazes de conferir ou intensificar o aroma e/ou sabor dos alimentos.

Segundo ANVISA (2007), os aromas podem ser classificados com base na sua origem cujas definições encontram-se abaixo.

✓ Aromatizantes/ Aromas naturais

São obtidos exclusivamente mediante métodos físicos, microbiológicos ou enzimáticos, a partir de matérias-primas naturais. Estas são produtos de origem animal ou vegetal, aceitáveis para consumo humano, que contenham substâncias odoríferas e/ou sápidas, seja em seu estado natural ou após um tratamento adequado, como torrefação, enriquecimento, enzimático, fermentação, entre outros. Os aromas naturais são subdivididos em óleos essenciais, extratos, bálsamos, oleoresinas e aromas isolados.

✓ Aromatizantes/Aromas sintéticos

São compostos quimicamente definidos, obtidos por processos químicos. Estes são subdivididos em aromas idênticos aos naturais e aromas artificiais. Os aromas idênticos aos naturais são obtidos por síntese e aqueles isolados por processos químicos a partir de matérias primas de origem animal, vegetal ou microbiana que apresentam uma estrutura química idêntica à referida como naturais. Os aromas

artificiais são obtidos por síntese, que ainda não tenham sido identificados em produtos de origem animal, vegetal ou microbiana, utilizados por suas propriedades aromáticas, em seu estado primário ou preparados para o consumo humano.

✓ Misturas de aromatizantes/Aromas

Os aromatizantes/aromas podem apresentar-se misturados entre si, seja qual for o número de componentes e tipo de aromatizantes/aromas. O aromatizante/aroma resultante será considerado natural (derivados de misturas de aromas naturais), idêntico ao natural (derivado de mistura de aromas idênticos aos naturais com ou sem adição de aromas naturais) e artificial (derivado de mistura com aroma artificial, com ou sem a participação de aromatizantes naturais ou idênticos aos naturais).

✓ Aromatizantes/ Aromas de reação ou de transformação

São produtos obtidos segundo as boas práticas de fabricação, por aquecimento em temperatura não superior a 180°C, durante um período não superior a quinze minutos (podendo transcorrer períodos mais longos à temperaturas proporcionalmente inferiores). O pH não poderá ser superior a 8. Podem ser classificados como naturais ou sintéticos, dependendo do tipo de matéria-prima e seu processo de elaboração. Normalmente, são obtidos a partir de fontes de carboidratos (cereais, vegetais, açúcares, amidas), fontes de nitrogênio protéico (carnes, ovos, frutas, lácteos), fontes de lipídeos ou ácidos graxos (gordura, óleos) entre outros.

✓ Aromatizantes/ Aromas de fumaça

Preparações concentradas utilizadas para conferir aroma/sabor de defumado aos alimentos. São obtidas a partir do tratamento de madeiras com um dos seguintes procedimentos: Combustão controlada, destilação seca e arraste com vapor. Após isso, suas frações são separadas e os componentes aromáticos isolados.

2.2 BIOAROMAS

O termo bioaroma é utilizado para designar aromas de origem enzimática ou produzidos via fermentativa. Além de serem menos agressivos ao meio ambiente, os processos biotecnológicos produzem aromas considerados naturais. O interesse dos pesquisadores atualmente é determinar a contribuição de cada componente no aroma global de um produto ou matriz alimentícia (CAMPOS, 2009). A importância sensorial

de cada componente, expressa como unidade de odor ou valor do aroma, geralmente depende de sua concentração ativa e do “limiar” do composto, determinado experimental e preferencialmente na própria matriz alimentícia.

Os bioaromas são comparados às substâncias químicas de aromas gerados biologicamente, derivados de fermentação microbiana, pela ação endógena ou processamento de enzimas, e através do metabolismo de plantas.

O uso de micro-organismos para produção de aromas em alimentos existe há muitos anos. Inicialmente, o processo fermentativo tinha como principal finalidade o aumento da vida de prateleira, pela liberação de ácidos e outros compostos, que garantiam uma maior conservação do produto. Porém, em alimentos e bebidas fermentadas, a ação dos micro-organismos não somente aumentava a vida de prateleira, como também tinha um papel fundamental na produção de aromas característicos, que fazem o produto ser mais saboroso e aceitável aos consumidores (GATFIELD, 1995; COSTA, 2013).

2.3 A BIOTECNOLOGIA DO AROMA NATURAL

O primeiro relato publicado sobre a capacidade de bactérias e fungos selecionados produzirem fragrância foi realizado por Omelianski, em 1923. Em seu trabalho, o autor destacou as leveduras como um dos grupos mais importantes de micro-organismos que produzem, em cultura, um forte aroma etéreo, de variada intensidade, que lembra o odor de frutas como morango, abacaxi, maçã, pêra e melão. Os gêneros *Mycoderma*, *Pichia*, *Willia* e *Torula* e outros isolados de uva, de grãos úmidos de cevada, de suco de abacaxi, de folhas de ruibarbo, e de queijo foram citados pelo autor como produtores de um agradável e complexo aroma de frutas. Omelianski realizou uma série de experimentos com micro-organismos isolados do leite, do pão e frutas, onde se variou a composição do meio de cultura e obtendo, em diferentes substratos, o que chamou de aroma de morango, aroma de fruta impuro e aroma de queijo (CHIAPPINI, 2008).

A relação entre a fisiologia microbiana e a produção de metabólitos com odor, só veio a ser identificada em estudos realizados nos anos 50. A partir daí, um número significativo de trabalhos sobre compostos aromatizantes produzidos por bactérias, fungos filamentosos e leveduras começou a ser publicado. As pesquisas foram inicialmente direcionadas à otimização da biossíntese e à identificação de compostos de

aromas específicos. Uma primeira lista de compostos voláteis em alimentos compreendia umas poucas centenas de constituintes. Com o advento de instrumentos de análise modernos, particularmente a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, o número de compostos identificados aumentou significativamente e uma compilação recente apontou a existência de mais de 10.000 compostos (CHIAPPINI, 2008).

2.4 PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE BIOAROMAS UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

O uso de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos tem sido a oportunidade oferecida por uma economia sustentável baseada em recursos renováveis. Nesse contexto, investimentos públicos e privados têm financiado atividades de pesquisa e desenvolvimento nessa área. É cada vez mais aceito globalmente que biomassas de origem vegetal, tenham potencial para substituir uma grande fração dos recursos fósseis como matérias-primas industriais, abordando tanto no setor energético (biocombustíveis) como não energético (produtos químicos e materiais) (COMISSÃO EUROPEIA, 2004).

Este potencial reside no fato de que a biomassa é geralmente composta por resíduos de colheitas ou subprodutos de sua industrialização que são subaproveitados, além de estarem disponíveis para utilização. Esses materiais renováveis são fornecidos por quatro diferentes setores: agricultura (produtos e resíduos agropecuários); silvicultura (produtos e resíduos florestais); indústria (resíduos e sobras de processos) e aquicultura (algas e microalgas) (BARROS, 2011).

Resíduos agroindustriais usados em bioprocessos vem cada vez mais ganhando espaço na biotecnologia, principalmente na produção de aromas.

Silva *et al.* (2014) realizaram um estudo da produção do bioaroma acetoina pelas bactérias *B. licheniformis*, *B. alvei* e *B. polymyxa* em sistema de batelada, variando as condições operacionais: concentração de macaxeira, agitação e pH. A maior formação de acetoina foi obtida pelo *Bacillus alvei* com concentração de macaxeira de 160 g/L, agitação 200 rpm e pH 7.

Calasans (2012) produziu e quantificou a lactona 6-pentil- α -pirona, responsável pelo aroma característico de coco, utilizando resíduo agroindustrial como suporte e fungo filamentosos *Trichoderma harzianum*. A técnica de cromatografia gasosa acoplada à extração em *headspace* permitiu as análises qualitativas e quantitativas da lactona. A maior produção do composto de aroma resultou em 3,78 mg/g MS no 7º dia de cultivo.

Barros (2011) realizou um estudo com a manipueira para produzir diacetil e acetoína por *Bacillus subtilis*. As fermentações foram realizadas em fermentador de bancada e as condições de operação foram: temperatura, agitação e aeração mantidas em 30°C, 100 rpm e 1 vvm, respectivamente. A acetoína apresentou valores de concentração máxima de 1,1g/L. A produção de ambos os compostos foi mais intensa entre 12 e 18 horas de fermentação.

Luz (2010) estudou a produção de bioaromas pela fermentação de permeado de soro de queijo por *Propionibacterium freudenreichii* PS-1. Neste trabalho, o bioaroma de queijo, contendo ácidos orgânicos de cadeia curta, principalmente, ácido acético e propiônico, foi produzido via processo fermentativo em batelada. Os efeitos do teor de sólidos solúveis (°Brix) e temperatura (°C) do meio foram avaliados com respeito a produção de bioaroma. As fermentações foram conduzidas em erlenmeyers, incubados em estufa com temperatura controlada por 144 horas. As melhores condições para formação de ácido propiônico e ácido acético foram com teor de sólidos solúveis de 10° Brix e temperatura entre 30 e 34°C.

Oliveira (2010) avaliou a produção biotecnológica de 2-feniletanol no cultivo de *Geotrichum fragrans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus* em resíduo líquido de fecularia, variando as concentrações da fonte de carbono e de fenilalanina no resíduo líquido de fecularia. Os três micro-organismos citados foram cultivados em 50 mL de resíduo líquido de fecularia, acrescidos de 50 g.L⁻¹ de glicose e 3 g.L⁻¹ de L-fenilalanina, em frascos Erlenmeyers estéreis, em agitador a 150 rpm, 24 °C por 120 h, para verificar o tempo de maior produção de 2-feniletanol e qual micro-organismo maior produtor. A levedura *S. cerevisiae* foi a melhor produtora de 2-feniletanol em água residual de fecularia de mandioca seguido pela levedura *K. marxianus* e *G. fragrans* respectivamente. A glicose foi a melhor fonte de carbono para obtenção do 2-feniletanol para *S. cerevisiae* e *K. marxianus*.

Rossi *et al.* (2009) realizaram um estudo para aumentar a produção de aroma frutado em polpa cítrica, um resíduo da indústria de produção de suco cítrico, usando espécies de *Ceratocystis frimbriata* em fermentação em estado sólido, testando outros resíduos como carbono (melaço de cana, melaço de soja) e fontes de nitrogênio (farelo de soja ou uréia). Os estudos foram conduzidos em frascos Erlenmeyers de 250 mL, pH 6,0, 75% umidade, 30°C e 1 x 10⁷ esporos/g de polpa cítrica durante 120 h. Compostos voláteis foram quantificados por cromatografia gasosa. A melhor produção de compostos voláteis foi detectada quando a polpa cítrica foi suplementada com 50% de farelo de soja,

25% de melaço de cana e solução salina mineral para a produção dos voláteis como acetato de etila e acetato de isoamila.

Pereira (2007) mostrou a viabilidade do melaço de soja para a produção de compostos voláteis por *Kluyveromyces marxianus*, especialmente acetato de isoamila. A produção de voláteis aumentou 81% comparada aos experimentos iniciais. As condições otimizadas foram o uso de álcool isoamílico como precursor, pH 6, 0,0042 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 1 mL de solução de nutrientes e 120 rpm de agitação. A recuperação foi realizada em evaporador rotativo com uma eficiência de 66%.

Uenojo (2003) estudou a produção e caracterização de aromas de frutas por micro-organismos pectinolíticos, cultivados em meios contendo 10% (p/v) de resíduo agroindustrial – casca de café seco e 2% (p/v) de glicose. Os frascos contendo os meios mais as linhagens selecionadas foram acondicionados em shaker rotatório a 25°C, 100 rpm por um período de até 120 horas. Os compostos formados durante o período de fermentação foram acetona, acetato de etila, etanol, álcool isobutílico, álcool isopentílico, acetoina, ácido acético, ácido isobutírico, ácido butírico, ácido 2-metil butanóico, álcool benzílico e 2-feniletanol, produzido em diferentes concentrações.

2.5 MELAÇO

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, seguido por Índia e Austrália. Em média, nas últimas cinco safras, 52% dessa produção destinaram-se às fábricas de etanol (anidro e hidratado) e 48% às de açúcar (refinado, cristal e demerara). Sua cultura espalha-se pelo Centro-Sul e pelo Norte-Nordeste do país em dois períodos de safra (maio-novembro e setembro-março, respectivamente), ocupando 2,4% da área agricultável do solo brasileiro, perto de 5,5 milhões de hectares (UNICA, 2004).

Durante o processo de fabricação de açúcar, são gerados subprodutos e resíduos da produção, sendo que praticamente todos estes podem ser aproveitados de maneira a aumentar os lucros da própria indústria e diminuir os custos de produção e impactos ambientais (MEZAROBÁ *et al.*, 2010).

O melaço ou mel final (Figura 2.1) se constitui no principal subproduto da indústria do açúcar, sendo produzido na proporção de 40 a 60 quilos por tonelada de cana processada. No Brasil, devido ao elevado teor de açúcares totais e demais componentes, o melaço é utilizado, principalmente, na fabricação de álcool etílico, sendo aproveitado,

também, em outros processos biotecnológicos como matéria-prima para a produção de proteína, rações, levedura prensada para panificação, antibióticos, entre outros (ALCARDE, 2007).

Figura 2.1. Melaço de cana-de-açúcar.



Fonte: <http://www.usinamendonca.com.br/produto.php>

Esse líquido viscoso rico em sacarose além de possuir vitaminas e minerais, tais como, nitrogênio, fosfatos, cálcio, magnésio, zinco, manganês, carbono, cobre e ferro essenciais para a fermentação, é considerado um substrato de baixo custo comercial e fácil obtenção (TOKASHIKI *et al.*, 2011, MANTOVAN, *et al.*, 2013).

2.6 BACTÉRIAS DO GÊNERO *BACILLUS*

As bactérias do gênero *Bacillus* são Gram-positivas, aeróbias ou anaeróbias facultativas, esporuladas em forma de bastão, amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas no solo, na água e até na poeira do ar. Possuem uma gama de habilidades fisiológicas que permitem o crescimento do micro-organismo nos diversos ambientes, competindo favoravelmente com outras bactérias, devido à sua capacidade de formar esporos que produzem metabólitos estáveis ao calor, e à radiação (PAZ, 2005; KUTA, NIMZING, ORKA'A, 2009).

As bactérias do gênero *Bacillus*, crescem favoravelmente em meios sintéticos que contêm açúcares, ácidos orgânicos, álcoois, como únicas fontes de carbono e amônio como única fonte de nitrogênio. O limite inferior de pH tolerado por esses micro-

organismos está entre 2 e 3 (COSTELLI, 2005). A morfologia de bactéria do gênero *Bacillus* está apresentada na Figura 2.2.

Figura 2.2. Bactéria do gênero *Bacillus* visto ao microscópio ótico.

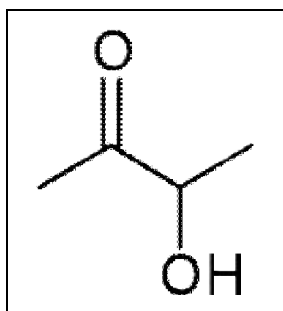


Fonte: <http://biologia.laguia2000.com/microbiologia/el-genero-bacillus>

Na literatura a identificação dessa classe de bactérias utiliza-se o Bergey's Manual of Bacteriology (2005), esse por sua vez, possui uma chave de identificação de *Bacillus* onde testes de amilase, teste de Voges Proskauer (para os redutores de butanodiol), teste em citrato, teste do crescimento dessas bactérias em 6,5% de NaCl, teste de catalase e redução de nitrato levam a identificação dessas espécies. As espécies produtoras do bioaroma acetoína são positivas em teste de amilase e de Voges Proskauer (JAMES *et al.*, 2005, CORREIA *et al.*, 2014, OLIVEIRA *et al.*, 2014).

2.7 ACETOÍNA

A acetoína, também conhecida como 3-hidroxi-2-butanona, acetil metil carbinol, dimetilcetol ou γ -hidroxi- β -oxobutano (Figura 2.3), é uma cetona de odor agradável, cuja massa molecular é $88,10 \text{ g.mol}^{-1}$, fórmula química $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$, ponto de ebulição 148°C e ponto de fusão de 15°C . Além de ser produzida por processos biotecnológicos, pode ser obtida por via sintética a partir do diacetil por redução parcial (MERCK, 1990; COSTELLI, 2005; MARIOTTO, 2007).

Figura 2.3. Estrutura química da acetoína

Fonte: <https://es.wikipedia.org/wiki/Aceto%C3%ADna#/media/File:3Hydroxybutanone.svg>

Categorizada como agentes de aromas e fragrâncias, a acetoína é uma substância geralmente reconhecida como segura (GRAS) pelo JECFA (1998) e FEMA (2008). A acetoína é usada em alimentos como um aditivo comum. Podendo ser utilizada como um ingrediente de aroma em formulações de morango, framboesa, baunilha, noz, rum, manteiga, caramelo, coco, café e sabores de outras frutas. Geralmente a acetoína é adicionada aos produtos de panificação, doces, gorduras, óleos, pudins, laticínios, molho doce, bebidas, entre outros. Como um composto neutro e não-iônico, acetoína também tem boa solubilidade em água e ácido orgânicos e biocompatibilidade, que se expande em uso de produtos cosméticos, sabões, detergentes, loções (XIAO & LU, 2014). São apresentados na Tabela 2.1, algumas aplicações da acetoína encontrada na literatura.

Tabela 2.1. Aplicações da acetoína

Aplicações	Funções	Referências
Armadilha para atrair insetos	Atrativo de insetos	Negishi <i>et al.</i> (2001)
Alimentos, produtos cosméticos, sabões, detergentes.	Intensificador de sabor	Morris (2002)
Útil nos detergentes, amaciantes e tratamento têxtil	Intensificador de aromatizantes	Gonzalez <i>et al.</i> (2008)
Alimentos	Intensificador de sabor	Burdock (2004)

Cigarros	Intensificador de sabor	Carmines (2002) e Coggins <i>et al.</i> (2011)
Composição de tratamento de cabelo	Tingimento Fibras queratínicas	Thiesen <i>et al.</i> (2012)

Fonte: autor

Atualmente, a oferta comercial de acetoína em grande parte é dada a partir de métodos químicos sintéticos usando matérias-primas fósseis. No entanto, o principal mercado de acetoína é na indústria de alimentos. O uso de processos de produção biotecnológica de acetoína natural a partir de biomassa renovável continua a ser de grande interesse, especialmente em fase de escassez de fontes de combustíveis fósseis (XIAO & LU, 2014).

2.7.1 Biossíntese da Acetoína

As bactérias do gênero *Bacillus* por serem micro-organismos anaeróbios facultativo, apresentam duas grandes vias. Em aerobiose, a glicose é oxidada a piruvato, que é transformado em acetil-CoA, que entra no ciclo do ácido cítrico com a ocorrência de fosforilação oxidativa para a geração de ATP e produção de biomassa. Estas vias são altamente energéticas e ativadas quando há presença de oxigênio no meio, proporcionando intenso crescimento celular. Para a formação de ATP, o acetil-CoA também pode ser convertido em acetato (ZHANG *et al.*, 2009).

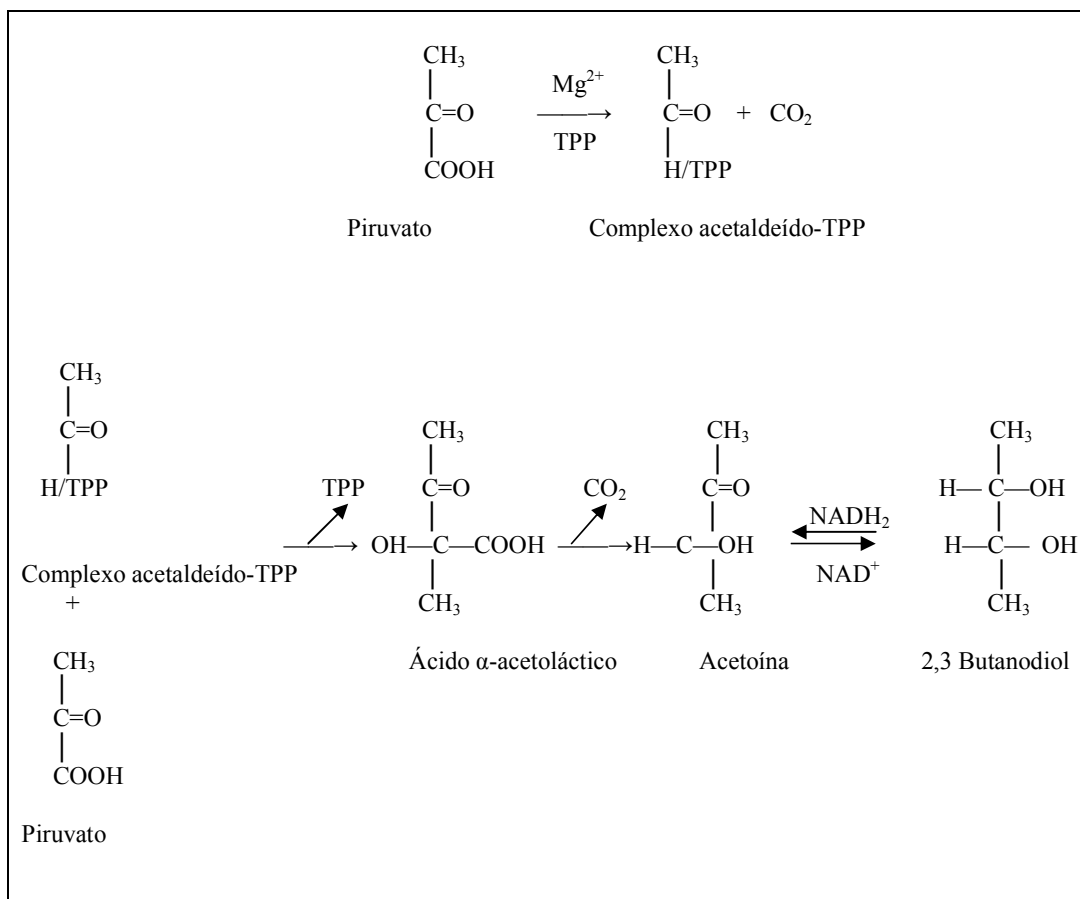
Quando ocorre a limitação de oxigênio, outras vias são ativadas para a geração de energia e manutenção celular, a partir de NADH+H⁺ e NAD⁺. Estes são importantes reguladores de processos enzimáticos a partir de reações de oxirredução, alterando a formação dos produtos. Durante o crescimento celular, a concentração de NADH+H⁺ aumenta, devido às vias de obtenção de ATP. Na fase de manutenção, os compostos que foram reduzidos são oxidados, gerando produtos a fim de obter energia (ZHANG *et al.*, 2009).

Durante a anaerobiose ou sob limitação de oxigênio, as vias de produção de 1,3-propanodiol, lactato, hidrogênio, etanol e 2,3-butanodiol são ativadas, podendo ser

ativadas ou inativadas conforme a necessidade de regeneração de $\text{NADH}+\text{H}^+$, dependentes, ainda, do pH do meio (ROMIO, 2014).

A via mais comum de produção de acetoína é a bioquímica a partir de duas moléculas de piruvato, sendo este a chave mais importante para esta via. A reação é espontânea e converte as moléculas de piruvato em α -acetolactato, em reação de descarboxilação, seguida da formação de diacetil ou de acetoína com eliminação de mais uma molécula de CO_2 . O diacetil pode ser convertido em acetoína pela ação da diacetil redutase. A partir de acetoína, 2,3-butanodiol é formado pela oxidação de $\text{NADH}+\text{H}^+$ pela enzima acetoína redutase (PARK *et al.*, 2013). O mecanismo de produção da acetoína é mostrado na Figura 2.4.

Figura 2.4. Mecanismo de formação da acetoína e 2,3- butanodiol



Fonte: MARIOTTO, (2007)

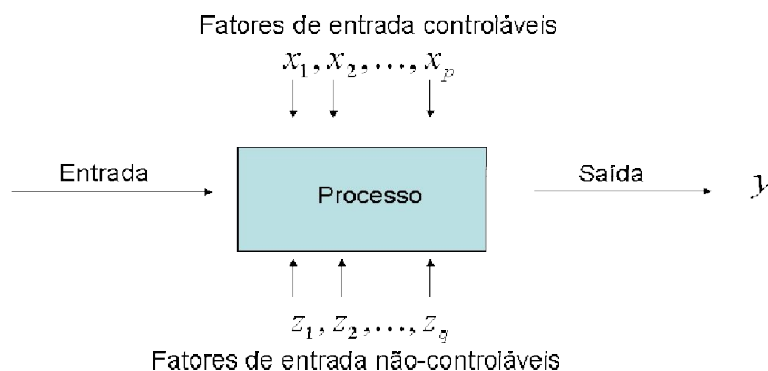
2.8 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

A necessidade crescente da otimização de produtos e processos, minimizando custos e tempos, maximizando rendimento, produtividade e qualidade de produtos, dentre outros objetivos, tem levado a profissionais de diferentes formações a buscarem técnicas sistemáticas de planejamento de experimentos (RODRIGUES E LEMMA, 2009).

O planejamento experimental, baseado nos fundamentos estatísticos, é sem dúvida alguma, uma ferramenta poderosa para se chegar às condições otimizadas de um processo, desenvolvimento da formulação de produtos dentro das especificações desejadas ou simplesmente para avaliar os efeitos ou impactos que os fatores têm nas respostas (RODRIGUES E LEMMA, 2009).

Os processos possuem variáveis controláveis, enquanto que outras são incontroláveis, geralmente consideradas como ruídos. Tendo como exemplo a Figura 2.5, os planejamentos experimentais visam definir quais fatores controláveis são mais influentes no processo, ou seja, quais desses fatores mais influenciam na resposta “y” (MONTGOMERY, 2004).

Figura 2.5 - Fluxograma exemplificando um planejamento experimental.



Fonte: MONTGOMERY, (2004).

Segundo Montgomery (2004), existem basicamente sete etapas para se realizar um procedimento de planejamento de experimentos:

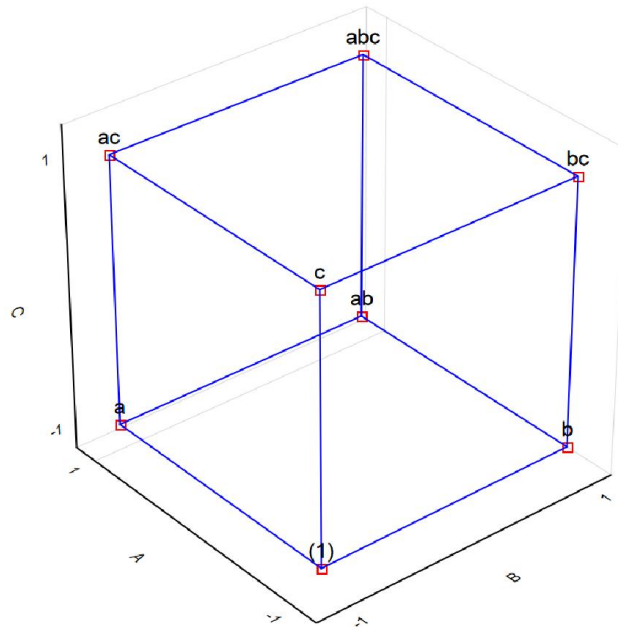
1. Reconhecimento e relato do problema: desenvolver idéias relacionadas ao experimento a fim de detectar o que se quer melhorar e quais são os fatores que podem afetar o processo.

2. Escolha dos fatores e dos níveis: escolha dos fatores que irão variar, os intervalos sobre os quais os fatores variarão e os níveis de cada fator. Esses dados geralmente são obtidos de acordo com a experiência do planejador baseados em conhecimentos teóricos que o mesmo possui.
3. Seleção da variável-resposta: escolher uma variável de resposta tal qual se tenha certeza que a mesma irá fornecer informação útil sobre o processo em estudo.
4. Escolha do planejamento experimental: escolha do tipo de planejamento experimental a ser realizado.
5. Realização do experimento: realizar tudo de acordo com o experimento proposto.
6. Análise dos dados: empregar ferramentas estatísticas corretas para interpretar os dados de forma eficaz.
7. Conclusões e recomendações: obter conclusões práticas quanto ao experimento realizado.

2.8.1 Planejamento Fatorial 2^3

Esse tipo de planejamento fatorial possui oito combinações fator-nível e geometricamente é expresso por um cubo (Figura 2.6) com as oito combinações expressando os vértices do cubo. Nesse tipo de planejamento são analisados três efeitos principais (A, B e C), juntamente com três efeitos de interação de dois fatores (AB, AC e BC) e uma interação entre os três fatores (ABC). As letras minúsculas e o número “1” no cubo são todas as n replicações em cada uma das oito combinações do planejamento (MONTGOMERY, 2004).

Figura 2.6 - Cubo demonstrando as combinações possíveis em um planejamento fatorial 2^3 .



Fonte: MONTGOMERY, (2004).

De posse desses valores, é possível estimar facilmente todos os efeitos do planejamento através das equações a seguir, as quais se baseiam na geometria do cubo. Os efeitos principais são calculados através da média das quatro combinações onde o efeito está mais alto (+1), subtraídas pelas quatro combinações do lado do cubo onde ele tem valor mais baixo (-1). Isso resulta nas Equações 2.1, 2.2 e 2.3 (MONTGOMERY, 2004).

$$A = \overline{Y_{A+}} - \overline{Y_{A-}} = \frac{1}{4n} [a + ab + ac + abc - b - c - bc - (1)] \quad (2.1)$$

$$B = \overline{Y_{B+}} - \overline{Y_{B-}} = \frac{1}{4n} [b + ab + bc + abc - a - c - ac - (1)] \quad (2.2)$$

$$C = \overline{Y_{C+}} - \overline{Y_{C-}} = \frac{1}{4n} [c + ac + bc + abc - a - b - ab - (1)] \quad (2.3)$$

Os cálculos dos efeitos de interação entre dois fatores são feitos pela diferença das médias entre os dois planos diagonais no cubo.

$$AB = \frac{1}{4n} [ab + (1) + abc + c - b - a - bc - ac] \quad (2.4)$$

$$AC = \frac{1}{4n} [ac + (1) + abc + b - a - c - ab - bc] \quad (2.5)$$

$$BC = \frac{1}{4n} [bc + (1) + abc + a - b - c - ab - ac] \quad (2.6)$$

E por fim, o efeito de interação ABC é calculado pela diferença entre a média de AB nos dois níveis de C.

$$ABC = \frac{1}{4n} [abc - bc - ac + c - ab + b + a - (1)] \quad (2.7)$$

Para a construção da matriz de um planejamento fatorial 2^3 pode-se construir a Tabela 2.2 com as variáveis A, B e C. A notação utilizada para o maior nível foi (+) e para o menor nível (-) foi escolhida arbitrariamente. A forma padrão de escrever esta matriz é começar a partir da primeira coluna, com um sinal (-) e um sinal (+) alternados até completar o número de ensaios do fatorial, a segunda coluna deverá conter dois sinais (-) e dois sinais (+) alternados e assim por diante, até que complete o número de variáveis do planejamento. As colunas das interações entre as variáveis será o produto dos sinais das colunas correspondentes (MONTGOMERY, 2004).

Tabela 2.2 -Matriz típica de um planejamento fatorial 2³.

Ensaio	A	B	AB	C	AC	BC	ABC	Resposta
1	-	-	+	-	+	+	-	Y1
2	+	-	-	-	-	+	+	Y2
3	-	+	-	-	+	-	+	Y3
4	+	+	+	-	-	-	-	Y4
5	-	-	+	+	-	-	+	Y5
6	+	-	-	+	+	-	-	Y6
7	-	+	-	+	-	+	-	Y7
8	+	+	+	+	+	+	+	Y8

Fonte: MONTGOMERY, (2004).

2.8.2 Estudos utilizando planejamento fatorial 2³

Fleuri e Sato (2008) realizaram um estudo da influência de diferentes parâmetros como: pH, temperatura e agitação dos frascos na produção de β -1,3 glucanases, proteases e de quitinases pela linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191, em meios de cultivo A, B e C, respectivamente. No planejamento experimental para a produção de protease em meio de cultivo B foi verificada maior produção da enzima (4,25 U.mL⁻¹) com pH inicial de 6,5 após 30 horas de fermentação a 20 °C e 200 rpm. O pH foi o único parâmetro estatisticamente significativo nessa produção.

Lima *et al.* (2014) avaliaram a produção de proteases collagenolíticas por *Bacillus stearothermophilus*. Os tratamentos foram realizados por meio de um planejamento fatorial completo 2³, a fim de avaliar a significância dos efeitos e interações das variáveis - pH inicial, concentração de substrato e temperatura - sobre a produção de protease collagenolítica. O ponto central foi executado em quadruplicata para fornecer uma estimativa dos erros experimentais. A maior atividade enzimática collagenolítica foi 79,38 U mL⁻¹, correspondendo a atividade específica de 136,86 U mg⁻¹, em condições iniciais de fermentação, na concentração de substrato a 1% (p/v), pH 7,2 e 25 °C. A atividade proteolítica da enzima foi mais ativa em pH 9,0 e 50 °C e foi estável nas faixas de pH (6,0 - 9,0) e temperatura (45 °C – 50 °C).

Lisboa *et al.* (2012) estudaram a influência de parâmetros reacionais na obtenção via enzimática de galacto-oligossacarídeos (GOS), utilizando-se a enzima comercial β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*(Lactozym[®] 3000 L), tendo como substrato a

lactose. Foi realizado um planejamento experimental 2^3 , verificando a influência da temperatura (30 a 40 °C), da concentração de lactose (200 a 400 mg.mL⁻¹) e da concentração de enzima (5 a 10 U.mL⁻¹) no desempenho da reação enzimática. Os ensaios foram conduzidos a 180 rpm e pH 7,0 (tampão fosfato de sódio 0,1 M). A enzima Lactozym[®] 3000 L apresentou atividade de transgalactosilação, tendo sido atingido rendimento do processo igual a 41,9% e concentração de GOS de 167,5 mg.mL⁻¹ no sistema reacional composto por 400 mg.mL⁻¹ de lactose e 5 U.mL⁻¹ de enzima a 30 °C em 14 h de reação. Nessa condição, a conversão de lactose foi de 65,0%. Maior concentração de lactose foi favorável ao mecanismo de transgalactosilação, enquanto que, em menores concentrações, o mecanismo hidrolítico predominou.

Andrade *et al.* (2003) realizaram um estudo da desidratação osmótica aplicado ao Jenipapo (*Genipa americana* L.), para reduzir as perdas pós-colheitas, diversificar o seu aproveitamento industrial e obter um produto com boas características organolépticas e boa estabilidade microbiológica. Foi realizado um planejamento 2^3 de modo a determinar a influência das variáveis independentes: temperatura, tipo de açúcar e concentração do agente osmótico sobre a perda de umidade, ganho de açúcar e redução de peso. Os produtos obtidos apresentaram significativa incorporação de sólidos; nenhuma das respostas foi influenciada pelo tipo de açúcar empregado, diferentemente da concentração do agente osmótico que além de refletir sobre todas elas, interagiu com a temperatura influenciando sobre a perda de umidade.

É possível observar a importância do planejamento fatorial em diversas áreas, levando aos profissionais de diferentes formações a buscarem técnicas que melhorem a qualidade do produto, a sua produtividade, o seu rendimento e minimizem custos e tempo.

2.9 PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM NA PRODUÇÃO DE ACETOÍNA

O controle eficiente e bem-sucedido de um processo bioquímico depende do entendimento dos principais parâmetros biológicos e químicos. Assim como suprimento de oxigênio, concentração de substrato, inóculo, pH e temperatura são um dos parâmetros fundamentais de controle dos processos biotecnológicos (XIAO & LU, 2014). As condições de aeração, agitação e concentração de substrato interferem diretamente na transferência de oxigênio e, em se tratando de micro-organismos aeróbios ou anaeróbios facultativos, afeta conseqüentemente a produção (GIRARDI, 2014).

2.9.1 Suprimento de oxigênio

A disponibilidade de oxigênio dissolvido no meio é, naturalmente, uma variável importante na produção da acetoína, afetando o rendimento do produto, da produtividade, e subproduto. O aumento observado na produção de acetoína com o aumento da oferta de O_2 foi evidenciada pelo estudo de Moes *et al.* (1985). Eles descobriram que acetoina foi excretada quando a concentração de O_2 dissolvido alcançou valores acima de 100 ppb. Em contraste, a produção de 2,3-butanodiol prevaleceu quando O_2 dissolvido encontrava-se abaixo de 100 ppb.

Uma forma alternativa quanto ao suprimento de oxigênio foi proposto por Ji *et al.* (2009). Neste estudo, o micro-organismo utilizado foi *K. oxytoca*, em meio contendo glicose (200 g/L) como fonte de carbono. Os autores selecionaram a aeração de 1 vvm e as agitações de 300 rpm e 200 rpm, sendo empregadas em duas etapas. Primeiro foram utilizadas 300 rpm por um período de aproximadamente 15 horas e, posteriormente, a velocidade foi diminuída para 200 rpm, até o final do ensaio, em torno de 70 horas. Agitação superior na primeira etapa favoreceu a formação de biomassa e, posteriormente, com menor velocidade de dissolução de O_2 , a formação de 2,3-butanodiol foi priorizada. Nestas condições, os autores relatam a obtenção de 95,5 g/L de 2,3-butanodiol.

2.9.2 Concentração do substrato

Costelli (2005) realizou estudos visando a otimização da produção de acetoína, utilizando *Bacillus polymyxa*, partindo de 30 g.L⁻¹ e 50 g.L⁻¹ de glicose à temperatura de 37°C, pH 5,5 com agitação de 150rpm e concluiu que a melhor concentração foi de 50g/L do substrato.

Luerce (2002) avaliou a concentração inicial de glicose, 30g.L⁻¹ e 50 g.L⁻¹, para a produção de acetoína pelo micro-organismo *Bacillus polymyxa*, à uma temperatura de 37°C, 5,5 de pH, 700rpm e 600mL ar/min. Os resultados alcançados pelo autor indicam que elevadas quantidades do produto são obtidas ao se utilizar a maior concentração inicial de substrato num valor de, 50 g.L⁻¹.

2.9.3 Inóculo

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

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

Segundo Romano e Suzzi (1996), a formação de acetoína depende do tipo de cepas de micro-organismos utilizados na fermentação, embora a concentração de células viáveis presente no processo apresenta uma influência maior na formação do produto.

2.9.4 Potencial hidrogeniônico (pH)

O pH é um parâmetro fundamental na regulação do metabolismo das bactérias e esta influência é especialmente acentuada no processo envolvendo a formação de múltiplos subprodutos. O pH do meio fermentativo afeta a formação da biomassa e a natureza do metabolismo bacteriano (GARG & JAIN, 1995).

Costelli (2005) estudou a influência do pH na produção de acetoína pelo micro-organismo *Bacillus polymyxa* usando como substrato a glicose, à uma temperatura de 37°C sob agitação de 150rpm. Os valores de pH avaliados foram 4,5, 5,0 e 5,5. Os resultados obtidos pelo autor mostraram que as maiores concentrações do produto foram alcançados nos ensaios com o maior pH, 5,5.

Mariotto (2007) avaliou a produção de acetoína e 2,3 butanodiol à uma temperatura de 37°C em meio de glicose com velocidade de agitação de 700rpm, 600mL ar/min, em diferentes valores de pH, 4,5; 5,5 e 6,5. O melhor pH foi de 6,5, para o crescimento do *Bacillus polymyxa*, formação de acetoína e consumo de substrato.

2.9.5 Temperatura

A temperatura é um parâmetro que influencia a eficiência de cultivo, uma vez que a atividade de enzimas e a manutenção celular são fatores dependentes deste parâmetro (GARG & JAIN, 1995; CELINSKA & GRAJEK, 2009).

O efeito da temperatura na produção de 2,3-butanodiol foi estudado por Perego *et al*, (2003), a velocidade de agitação usada foi de 150rpm com pH controlado em 6,0, utilizando uma cepa de *Bacillus licheniformis*. Os autores aumentaram progressivamente a temperatura de 34°C para 40°C, e verificaram que até 37°C ocorreu um aumento na concentração final do produto, bem como na produtividade volumétrica média e máxima (considerando acetoína + 2,3-butanodiol). Utilizando temperaturas maiores, observou-se a diminuição da concentração de 2,3-butanodiol e da produtividade, provavelmente devido à inativação térmica da biossíntese a temperaturas mais elevadas que a ótima, considerada neste caso 37°C. A concentração de acetoína não pareceu ser significativamente dependente da temperatura.

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

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MICRO-ORGANISMOS - LINHAGENS DE *BACILLUS*

3.1.1 Isolamento e Caracterização

Foram coletadas 500g de amostra do sedimento a 10 cm de profundidade, em quatro pontos, no entorno do mangue da Lagoa do Araçá (Recife, PE), posicionados, nas coordenadas geográficas: -8.092984, -34.913373; -8.093095, -34.916334; -8.093095, -34.916334; -8.093095, -34.916334 e nomeados pelas letras A, B, C e D. As amostras foram acondicionadas em sacos estéreis colocadas em isopor e levadas ao laboratório. A Figura 3.1 mostra os pontos onde foram feitas as coletas.

Figura 3.1. Pontos de coleta situados entorno da Lagoa do Araçá-PE



Fonte: http://www.educacional.com.br/reportagens/recife/fotos/lagoa_do_araca.asp

Para o isolamento das bactérias foi utilizado 25g das amostras de sedimento de mangue. As amostras foram transferidas assepticamente para frascos com 225 mL de água salina peptonada a 0,85%. As suspensões foram levadas ao aquecimento de 100°C e após o esfriamento, feitas as diluições 1/10, 1/10², 1/10³. A seguir, alíquotas de 1 mL das amostras foram colocadas em Placas de Petri estéreis, sem o meio de cultura (Agar Nutritivo acrescido de 2% de NaCl e 0,2% de amido), pois esse foi colocado

posteriormente na placa (técnica: *Pour Plate*) e incubadas por 48hs em estufa (Marconi-MA032/1) a 35°C. As colônias isoladas de cada ponto da coleta foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio Agar Nutritivo, sendo nomeadas com referências de onde foram retiradas (A, B, C, D) e numeradas (1 – 10). Todas as culturas isoladas em tubos de ensaio foram armazenadas em refrigerador a 5°C e ativada por repicagem em meio de manutenção, 48 horas antes de serem utilizadas nos ensaios.

Previamente, as bactérias foram analisadas pela coloração diferencial de Gram e os bacilos também foram diferenciados quanto à forma como bacilos longos, curtos, grossos, finos. Uma coloração de esporos foi realizada para identificação e caracterização dos esporos (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008; PELCZAR, *et al.*, 2008).

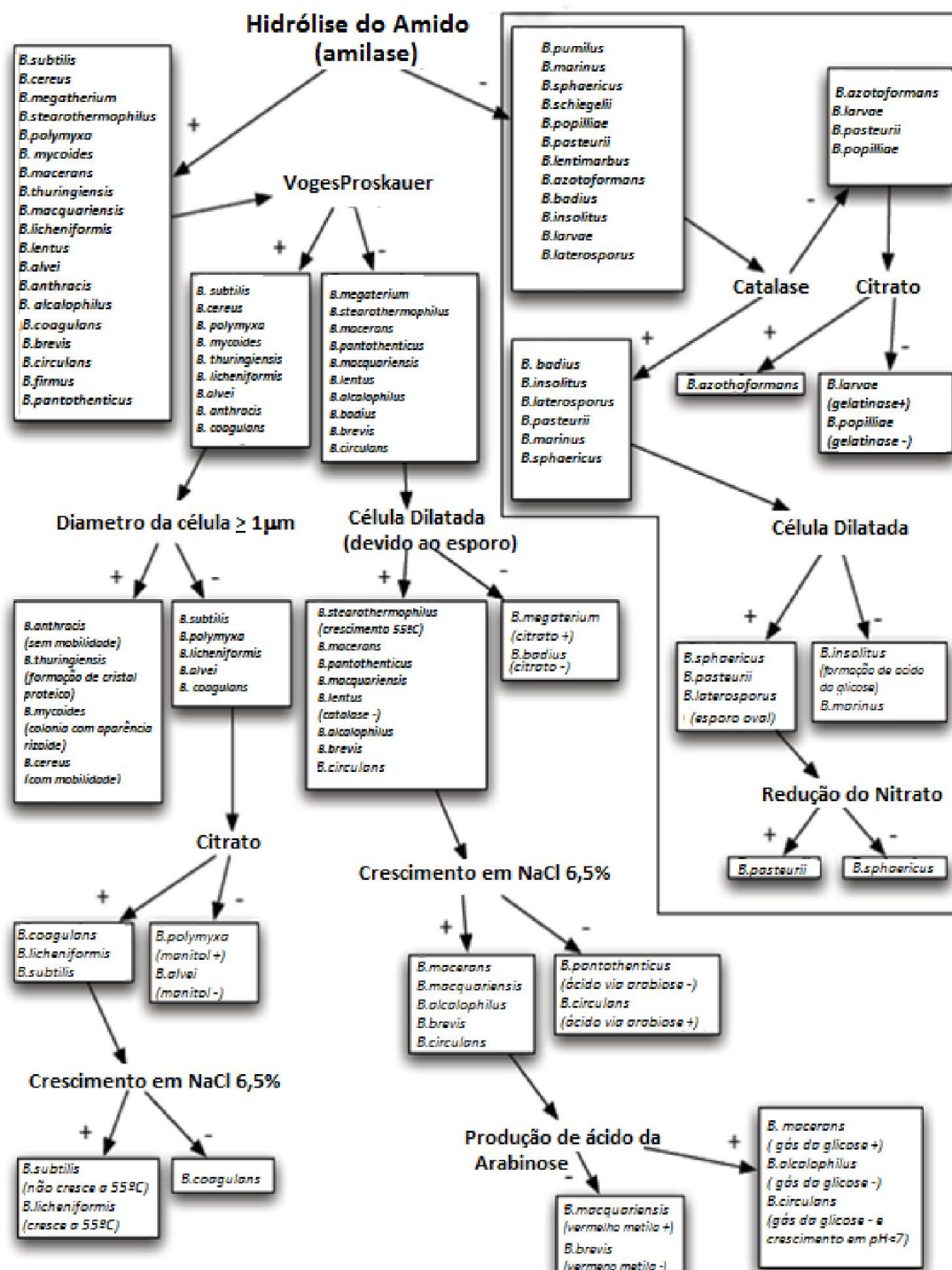
A identificação das linhagens baseou-se na chave de caracterização para bactérias do gênero *Bacillus* contida em *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2005) como mostra a Figura 3.3. A definição das espécies foi feita por testes bioquímicos variados como fermentação de açúcares, testes enzimáticos, teste do citrato, teste de tolerância ao NaCl 6,5% de acordo com a chave de caracterização.

3.1.2 Avaliação do Potencial para Produção do Bioaroma de Acetoína

Após a identificação dos micro-organismos quanto ao gênero e espécie avaliou-se a habilidade das bactérias em produzir acetoína através do teste de Vogues-Proskauer (VP). As bactérias foram inoculadas em caldo glicosado fosfatado e incubadas por 48hs em estufa (Marconi-MA032/1) a 35°C. Em seguida, foram adicionados em cada tubo 0,6mL de α -naftol e 0,2mL de hidróxido de potássio, esses reagentes permitiram detectar a presença de acetil metil carbinol (acetoína), do metabolismo da glicose pela formação de um complexo rosa/vermelho que dá essa cor ao meio de cultura. O desenvolvimento de uma cor rosa/vermelha na cultura, 15 minutos após a adição dos reagentes representava uma prova positiva. A ausência dessa cor era equivalente a uma prova negativa. (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1979; KITANCHAROEN & HATAI, 1998; ANVISA, 2004).

Figura 3.2. Chave de caracterização para bactérias do gênero *Bacillus*

Chave de Identificação de *Bacillus*



Fonte: JAMES *et al.* (2005).

3.2 MEIOS DE CULTURA

Uma variedade de meios de cultura foi feito ao longo desse trabalho. Esses por sua vez, foram esterilizados em autoclave (FANEM- Modelo 415) a 121°C por 15 minutos.

3.2.1 Isolamento

- ✓ Agar Nutritivo acrescido com 2% de NaCl e 0,2% de amido: 3g/L de extrato de carne; 5g/L de peptona; 16g/L de Agar; 0,02g/L de NaCl e 0,02g/L de amido.
- ✓ Citrato de Simmon: 2g/L de citrato de sódio; 0,2g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,0 g/L de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$; 5,0g/L de NaCl; 0,08g/L de Azul de bromotimol e 14g/L de Agar .
- ✓ Manitol: 3g/L de extrato de carne; 5g/L de peptona; 1g/L de glicose e 0,02g/L de Vermelho de fenol.
- ✓ Agar Nutritivo acrescido com 6,5% de NaCl: 3g/L de extrato de carne; 5g/L de peptona; 16g/L de Agar e 0,065g/L de NaCl.
- ✓ Caldo Glicosado Fosfatado: 5g/L de peptona; 5g/L de glicose e 5g/L de K_2HPO_4 .

3.2.2 Manutenção

- ✓ Agar Nutritivo: 3g/L de extrato de carne; 5g/L de peptona; 16g/L de Agar e pH 6,8-7,0.

3.2.3 Meio para Produção do Bioaroma

Os meios utilizados nos ensaios preliminares e no estudo cinético foram preparados a partir do melaço de cana-de-açúcar. Esses meios foram preparados em diferentes concentrações de melaço.

Para o preparo de 500 mL dos meios, pesou-se (30g, 40g e 50g) da massa de melaço em balança analítica (GEHAKA-AG200). Essas massas de melaço foram diluídas com 400 mL de água destilada e transferidas para frascos Erlenmeyers (1L), tendo como finalidade a realização da hidrólise da sacarose. A Hidrólise foi realizada adicionando HCl P.A (12,5mL, 10mL e 8,2mL) em cada frascos Erlenmeyers, seguida de um aquecimento em banho-maria a 68°C por 15 minutos. Após hidrólise adicionou-se NaOH 12M (12mL, 10mL e 8mL), em cada um dos frascos Erlenmeyers, para neutralizaçãodos meios. Por fim, transferiu-se os meios hidrolisados para balões volumétricos de 500mL e aferiu-se com água destilada.

Em seguida, os meios foram transferidos para Béqueres (1L) onde foram adicionados fontes de nitrogênio como K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $(NH_4)_2HPO_4$, $(NH_4)_2SO_4$ e extrato de levedura descrito por DE MAS, *et al.* (1988) na composição idêntica ao meio PAY como mostra a Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Composição do meio PAY (*Phosphate Ammonium Yeast*)

Componente	Concentração
K_2HPO_4	9,16g/L
KH_2PO_4	1,75g/L
$(NH_4)_2HPO_4$	2,9g/L
$(NH_4)_2SO_4$	5,8g/L
Extrato de Levedura	13,1g/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	219mg/L
$FeSO_2 \cdot 7H_2O$	44mg/L
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	8,8mg/L
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,9mg/L
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,9mg/L
EDTA	44mg/L
H_2SO_4	150mg/L
Glicose	30g/L, 50g/L

Fonte: COSTELLI, (2005)

Após a adição dos nutrientes, volumes de 50 mL de meio foram transferidos para frascos de Erlenmeyers de 125 mL previamente tamponados com algodão. Em seguida, foi feito o ajuste do pH para valores de 6,5; 7,5 e 8,5 utilizando HCl e NaOH.

3.3 PREPARO DO INÓCULO

As culturas bacterianas (*Bacillus polymyxa*, *Bacillus alvei* e *Bacillus licheniformis*) foram incubadas em frascos de Roux contendo o meio de manutenção, por 48 horas em estufa (Marconi-MA032/1) a uma temperatura de 35°C. Após o período de incubação suspensões desses micro-organismos foram transferidas para frasco Erlenmeyers estéreis através de lavagens com água destilada estéril. A extração se deu até que a turvação das suspensões estivesse de acordo com a escala nefelométrica de Mc Farland 0,3, que é equivalente a 10^8 UFC/mL (LENNETTE, *et al.*, 1985).

Para uso no reator de bancada, utilizou-se o mesmo procedimento até que fosse atingido uma suspensão com 10% do volume do meio utilizado no reator.

3.4 SUBSTRATO E CARACTERIZAÇÃO

O substrato utilizado foi o melaço de cana-de-açúcar, fornecido pela Usina São João, localizado no município de Santa Rita- PB.

Foram realizadas, no município de Campina Grande- PB, análises físico-químicas de minerais (N, P, K, Ca e Mg), cinzas, pH, açúcares não redutor e açúcares totais determinadas de acordo com a metodologia descrita pelo AOAC (2002) e o Instituto Adolf Lutz (2008).

3.5 PRODUÇÃO DE ACETOÍNA

A produção de acetoína foi inicialmente realizada utilizando frascos Erlenmeyers, através de um planejamento experimental avaliando três espécies de *Bacillus*. Após esta etapa, com os parâmetros determinados o micro-organismo que forneceu melhor conversão de substrato em produto foi submetido a um estudo cinético.

3.5.1 Delineamento Fatorial

Foi realizado um planejamento fatorial 2^3 com triplicata no ponto central, totalizando 11 ensaios. A concentração do substrato (hidrolisado de melaço de cana-de-açúcar), velocidade de agitação e o pH foram as variáveis independentes e o percentual de conversão de substrato em produto na formação de acetoína foi a variável dependente (resposta). Os ensaios foram realizados com *Bacillus licheniformis*, *Bacillus polymyxa* e *Bacillus alvei*. A escolha dessas bactérias foi devido ao maior percentual de bactérias isoladas de sedimento de mangue e por não haver na literatura estudos de produção de acetoína utilizando o *Bacillus alvei*. Os valores codificados e decodificados estão apresentados na Tabela 3.2

Tabela 3.2. Níveis codificados das variáveis para os ensaios

Ensaios	pH	Agitação (rpm)	Concentração de melaço hidrolisado(g/L)
1	-(6,5)	-(0)	-(60)
2	+(8,5)	-(0)	-(60)
3	-(6,5)	+(200)	-(60)
4	+(8,5)	+(200)	-(60)
5	-(6,5)	-(0)	+(100)
6	+(8,5)	-(0)	+(100)
7	-(6,5)	+(200)	+(100)
8	+(8,5)	+(200)	+(100)
9	0(7,5)	0(100)	0(80)
10	0(7,5)	0(100)	0(80)
11	0(7,5)	0(100)	0(80)

Os ensaios foram realizados em bancada (ensaios sem agitação) e os ensaios com agitação foi utilizado incubadora rotativa do tipo Shaker da Marca Marconi, modelo MA-420 com temperatura controlada em 35°C. Utilizou-se como reatores frascos de Erlenmeyers de 125mL, contendo 50 mL de meio (hidrolisado de melaço de cana-de-açúcar) e 5% v/v da suspensão microbiana.

Os reatores ficaram sete dias nas condições estabelecidas no planejamento fatorial e com o término desse período as amostras foram coletadas para análise.

Os dados foram analisados pelo programa Statistic for Windows 6.0, ao nível de 5% de significância.

3.5.2 Estudo Cinético

O estudo cinético foi realizado em batelada com o micro-organismo que apresentou melhor conversão de substrato em produto seguindo as condições estabelecidas pelo planejamento fatorial. Utilizou-se um biorreator (Modelo BIOFLO/CELLIGEN 115) com cuba 3L (volume útil de 1,5L) que foi previamente autoclavado por 20min a 121°C contendo o meio de produção. Foi adicionado 10% (v/v) do inóculo no biorreator contendo o meio. O período de biossíntese foi de 144 horas a uma temperatura de 35°C. Uma amostra de 10 mL foi removida a cada 24 horas, centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos a 5°C. O sobrenadante foi filtrado utilizando um sistema de filtração a vácuo (Marca Nagene Nunc/ modelo 300-4050) para se determinar as concentrações do substrato (açúcar residual) e o produto (acetoína). O sedimento foi utilizado para avaliação da concentração da biomassa. A Figura 3.4 mostra o biorreator utilizado no processo.

Figura 3.3. Processo de produção de acetoína em biorreator



3.5.3 Parâmetros Cinéticos

3.5.3.1 Velocidades Médias e Específica

As velocidades médias de formação de biomassa ($\Delta X/\Delta t$) foram calculadas a partir da seguinte fórmula:

$$\Delta X/\Delta t = (X_f - X_0) / t \quad (3.1)$$

Onde: $\Delta X/\Delta t$: velocidade média de formação de biomassa (g/L/h);

X_f : concentração de biomassa no tempo considerado (g.L⁻¹);

X_0 : concentração inicial do inóculo (g.L⁻¹);

t : tempo (h).

As velocidades médias de consumo de substrato ($\Delta S/\Delta t$) foram estimadas pela seguinte expressão:

$$\Delta S/\Delta t = (S_f - S_0) / t \quad (3.2)$$

Onde: $\Delta S/\Delta t$: velocidade média de consumo de açúcares (g/L/h);

S_f : concentração final de açúcares (g.L⁻¹);

S_0 : concentração inicial de açúcares (g.L⁻¹);

t : tempo (h).

As velocidades específicas de crescimento (μ_x) foram obtidas pela derivação de curvas relacionando o logaritmo natural da concentração de biomassa (ln X) em função do tempo (t). A velocidade específica máxima ($\mu_{m\acute{a}x}$) foi determinada na fase exponencial do crescimento, considerando que não ocorre morte durante este período.

3.5.3.2 Fatores de conversão de substrato em biomassa e em produtos

O coeficiente de conversão $Y_{X/S}$ que expressa a massa de biomassa formada por substrato consumido e o coeficiente de conversão de substrato consumido em produto formado $Y_{P/S}$ foram determinados de acordo com Schmidell *et al.* (2001).

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} \quad (3.3)$$

$$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f} \quad (3.4)$$

Onde: x_f : concentração de biomassa final ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

x_0 : concentração inicial do inóculo ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

P_f : concentração de produto final ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

P_0 : concentração de produto inicial ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

3.5.3.3 Produtividade

A produtividade para o composto formado durante o processo, em ensaio sem variação de volume, foi calculada por:

$$P_V = (P_f - P_0) / t \quad (3.5)$$

Onde: P_V : produtividade de produto ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$);

P_f :concentração final de produto ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$);

P_0 :concentração inicial de produto ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$);

t :tempo (h).

3.6 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

3.6.1 Determinação dos Açúcares

A concentração de açúcares redutores simples (ARS) e açúcares redutores totais (ART) expresso em concentração de glicose foi determinada pelo método colorimétrico do 3,5-Dinitrosalicílico (DNS), descrito por Miller (1959).

3.6.1.1 Açúcares Redutores Totais (ART)

Previamente realizou-se uma hidrólise ácida nas amostras utilizando HCl (P.A)

por 15 min a 68°C. Em seguida, neutralizou a amostra com NaOH (12M). Aferiu-se as amostras para o volume de 500 mL. Utilizou-se 0,5mL das amostras hidrolisadas e 1 mL do reagente de DNS, levou-se ao aquecimento por 5 minutos a 100°C e analisou-se a absorbância em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 540nm. A concentração de açúcar foi determinada pela conversão da Absorbância em concentração de glicose (g/L) através da curva de calibração construída previamente (Anexo-A).

3.6.1.2 Açúcares Redutores Simples (ARS)

Utilizou-se na análise um volume de amostra de 0,5 mL e 1 mL do reagente de DNS, levou-se ao aquecimento por 5 minutos a 100°C e analisou-se a absorbância em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 540nm.

3.6.2 Concentração de Produto (Acetoína)

As amostras centrifugadas foram filtradas em membrana de fibra de vidro (0,48 µm) e em seguida a concentração de acetoína foi determinada por cromatografia em fase gasosa, utilizando-se cromatógrafo CG- Master 90 equipado com detector de ionização de chama (DIC ar-hidrogênio e coluna de sílica fundida, 0,53 mm x 30 mm) Marca Supercowax, modelo 10 com sistema de aquecimento de rampa de temperatura iniciando em 55°C até 130°C, a uma taxa de 20°C/min, temperatura do injetor de 200°C e do detector 230°C. O volume da amostra foi de 1 µL. Uma curva de calibração foi preparada com concentração de acetoína de 0,01 a 1,0 g/L (Anexo-B). O tempo de análise foi de 4 minutos. As amostras e os padrões foram diluídos de forma em que a concentração encontre-se na faixa de linearidade da curva de calibração. Os cromatogramas foram obtidos e analisados com o auxílio do programa *PeakSimple*.

3.6.3 Concentração da Biomassa

A quantidade de biomassa produzida foi determinada através do método gravimétrico (Peso Seco). As membranas foram previamente taradas após 24 horas em estufa (Marca QUIMIS/ modelo-Q316M2) a temperatura de 80°C. Em seguida foi realizada uma filtração a vácuo das amostras utilizando um sistema de filtração (Marca Nalgene Nunc/ modelo 300-4050), a biomassa foi lavada três vezes com água destilada.

Após a filtração, as membranas foram colocadas em estufa a 80°C, por 24 horas. Foram pesadas em balança analítica (GEHAKA-AG200). A concentração de Biomassa, expressa em peso seco, foi calculada de acordo com a Equação 3.6.

$$PSX = \frac{(MB-MV)}{VF} \cdot 1000 \quad (3.6)$$

Onde: MB: peso da membrana com a biomassa (g)

MV: peso da membrana vazia (g)

VF: Volume utilizado (mL)

PSX: Peso seco de biomassa (g/L)

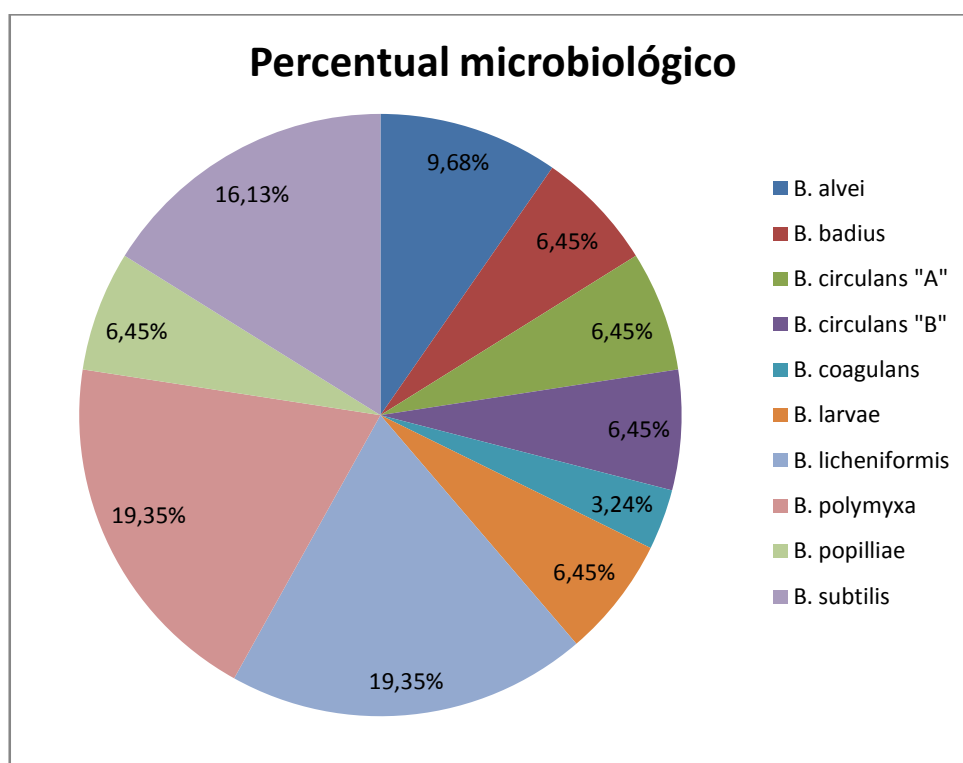
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *BACILLUS* DE SEDIMENTO DE MANGUE

Foram isoladas do sedimento de mangue da Lagoa do Araçá (Recife-Brasil) trinta e uma cepas bacterianas, sendo possível a identificação de nove espécies de micro-organismos do gênero *Bacillus*.

As espécies do gênero *Bacillus* identificadas no isolamento foram: *Bacillus alvei*, *Bacillus badius*, *Bacillus circulans* "A", *Bacillus circulans* "B", *Bacillus coagulans*, *Bacillus larvae*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus popilliae* e *Bacillus subtilis*. A Figura 4.1 apresenta as espécies identificadas em função do percentual de cepas isoladas.

Figura 4.1. Percentual microbiológico de *Bacillus* na Lagoa do Araçá (Recife- Brasil)



Os *Bacillus licheniformis* e *Bacillus polymyxa* mostraram-se mais abundantes no habitat de estudo, ambos apresentando 19,35% dos isolados. O *Bacillus subtilis* também apresentou um percentual considerável, chegando a 16,13%. Segundo Xiao & Lu (2014),

Bacillus licheniformis são conhecidos pela eficiência de numerosas enzimas hidrolíticas para o meio ambiente, isso permite que as células degradem e cresçam em uma variedade de substratos. Já os *Bacillus polymyxa* são conhecidos como fixadores de nitrogênio (LUERCE, 2002).

Foi possível observar a diversidade das espécies deste gênero nos sedimentos de mangue da Lagoa do Araçá (Recife-Brasil), contribuindo assim para um estudo viabilizando a aplicação biotecnológica de produção bioaromas.

Após a identificação das espécies, os micro-organismos foram submetidos ao teste VP para avaliar a habilidade de cada um em produzir acetoína. Dentre as nove espécies identificadas cinco foram produtoras do bioaroma acetoína, sendo estas as seguintes: *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus alvei* e *Bacillus coagulans*.

Estudos realizados por Xiao & Lu (2014) evidenciaram algumas tendências gerais de micro-organismos para a produção de acetoína, o gênero *Bacillus* foi um dos grupos que apresentou maior tendência para essa produção, seguido da espécie *Paenibacillus polymyxa*, das bactérias do ácido láctico e da família *Enterobacteriaceae*.

As espécies do gênero *Bacillus* mais encontradas na literatura para a produção de acetoína são: *Bacillus polymyxa*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*. (MARIOTTO, 2007; LUERCE, 2002; COSTELLI, 2005; BARROS, 2011; LIU, *et al*, 2011). Não há relatos da produção de acetoína com as bactérias *Bacillus alvei* e *Bacillus coagulans* até o momento.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO MELAÇO

O melaço de cana-de-açúcar utilizado apresentou 62,53% de açúcares totais (Tabela 4.1), sendo o maior percentual constituído de sacarose, uma quantidade bastante alta em relação ao teor de açúcar encontrado por Najafpour & Shan (2003) de 45 a 50%.

Além dos açúcares o melaço apresentou nutrientes como, Nitrogênio (0,57%), Fósforo (0,03%), Potássio (2,37%), Cálcio (0,59%) e Magnésio (0,36%) esses resultados estão mostrados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Composição físico-química do melaço de cana-de-açúcar

Constituintes	Concentração (%)
Nitrogênio	0,57
Fósforo	0,03
Potássio	2,37
Cálcio	0,59
Magnésio	0,36
pH	5,81
Cinzas	7,96
Açúcar não redutor (Sacarose)	36,95
Açúcar redutor (Frutose e Glicose)	25,58
Açúcar Total	62,53

Considerando que para o crescimento de qualquer micro-organismo o substrato deve atender as necessidades nutricionais e energéticas do mesmo (carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e sais minerais), o meio de melaço de cana-de-açúcar foi enriquecido com sais que continham amônia, enxofre, fósforo e extrato de levedura (hidrolisado protéico) com finalidade de suprir as carências da matéria-prima e também favorecer a produção de acetoína. A concentração destes sais foi de acordo com o meio PAY descrito por DE MAS, *et al.*(1988).

A Tabela 4.2 mostra os resultados dos açúcares totais obtidos nos meios de melaço em diferentes concentrações.

Tabela 4.2. Resultados da determinação de açúcares totais em meio de melaço hidrolisado

Concentração de melaço (g/L)	Concentração de açúcar total (g/L)
60	41,80
80	53,28
100	62,53

4.3 PLANEJAMENTO FATORIAL

Na Tabelas 4.3 estão apresentadas as respostas, em percentual de conversão ($Y_{P/S}$ (%)),

obtidas no planejamento fatorial para os *Bacillus licheniformis*, *Bacillus alvei* e *Bacillus polymyxa*.

Tabela 4.3. Resultado obtido do planejamento fatorial 2³

Ensaio	pH	Concentração de melaço (g/L)	Agitação (rpm)	Y _{P/S} (%) <i>Bacillus</i> <i>licheniformis</i>	Y _{P/S} (%) <i>Bacillus</i> <i>alvei</i>	Y _{P/S} (%) <i>Bacillus</i> <i>polymyxa</i>
1	6,5	60	0	20,50	19,75	19,97
2	8,5	60	0	27,16	28,26	26,43
3	6,5	100	0	17,18	14,72	15,44
4	8,5	100	0	32,43	33,89	29,01
5	6,5	60	200	44,38	40,26	31,90
6	8,5	60	200	31,03	32,33	29,88
7	6,5	100	200	52,88	38,35	32,04
8	8,5	100	200	34,73	46,35	35,21
9	7,5	80	100	22,92	22,20	42,69
10	7,5	80	100	21,92	23,96	42,13
11	7,5	80	100	21,35	22,80	44,25

Na tabela 4.3 pode ser observado que os maiores resultados de conversão foram obtidos pelo *Bacillus licheniformis* (52,88%) e *alvei* (46,35%), com a máxima agitação e concentração de melaço (g/L).

Por se tratarem de bactérias aeróbias a agitação favorece a oxigenação do meio contribuindo na conversão do substrato em produto (XIÃO & LU, 2014).

A maior concentração de substrato (100g/L) foi fundamental para a conversão com essas bactérias, devido apresentar maior quantidade açúcares disponíveis. Esses açúcares são convertidos pelas enzimas, sintetizadas pelos micro-organismos, em acetoina.

A análise de variância (ANOVA), obtida para o resultado de conversão de substrato em produto pelo *Bacillus licheniformis*, *Bacillus alvei* e *Bacillus polymyxa* estão representadas na Tabela 4.4.

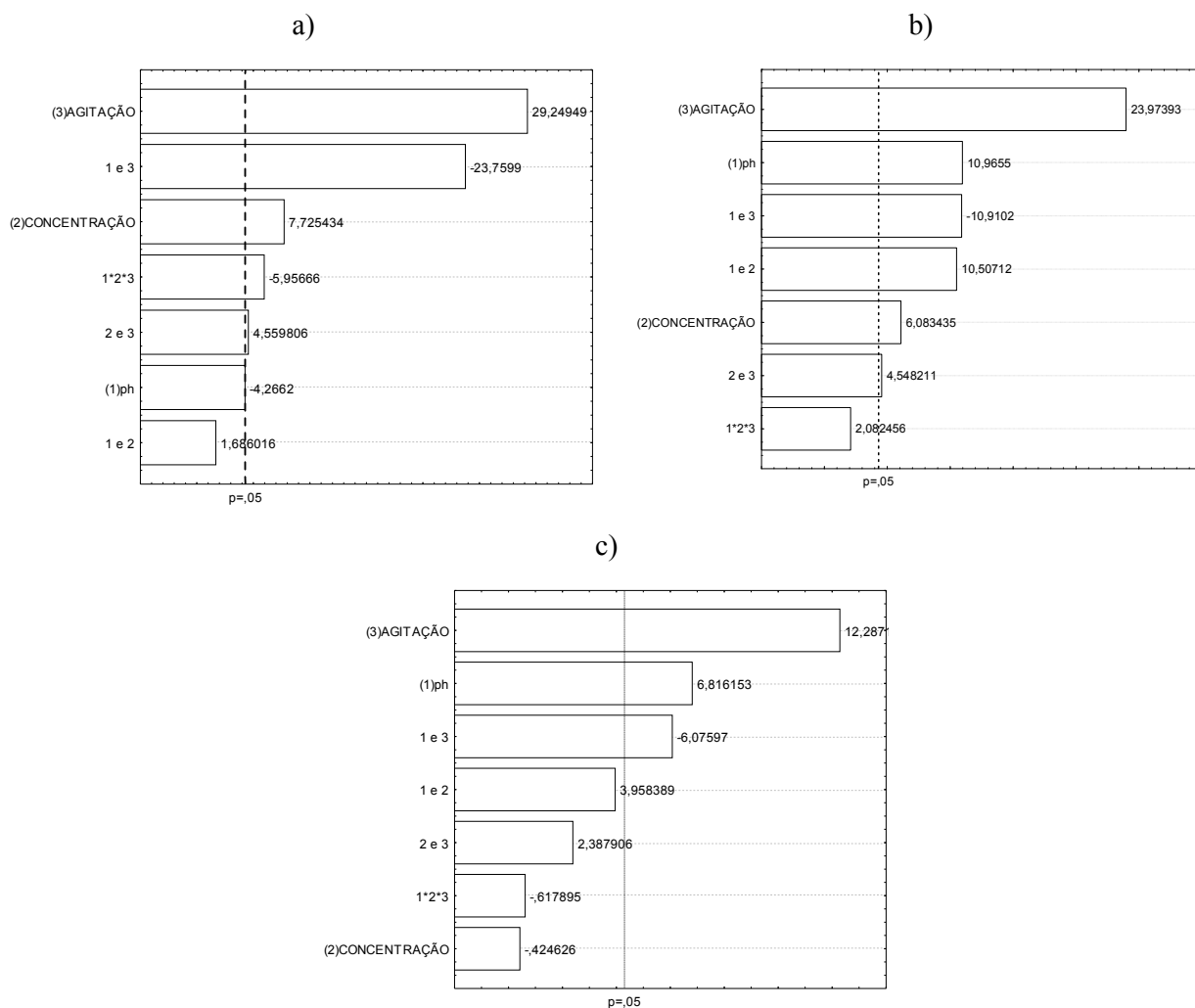
Tabela 4.4. Tabela de análise de variância para a conversão de substrato em produto obtida nos ensaios realizados com *Bacillus licheniformis*, *Bacillus alvei* e *Bacillus polymyxa*.

<i>Bacillus licheniformis</i>				
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	p
(1)ph (L)	11,496	1	11,4960	0,050794
(2)CONCENTRAÇÃO(L)	37,697	1	37,6974	0,016346
(3)AGITAÇÃO(L)	540,383	1	540,3828	0,001167
1L e 2L	1,796	1	1,7955	0,233839
1L e 3L	356,579	1	356,5785	0,001767
2L e 3L	13,133	1	13,1328	0,044883
1x2x3	22,412	1	22,4115	0,027045
Falta de ajuste	226,637	1	226,6366	0,002775
Erro puro	1,263	2	0,6316	
Total	1211,394	10		
<i>Bacillus alvei</i>				
(1)ph (L)	96,2578	1	96,2578	0,008214
(2)CONCENTRAÇÃO(L)	29,6263	1	29,6263	0,025973
(3)AGITAÇÃO(L)	460,1061	1	460,1061	0,001735
1L e 2L	88,3785	1	88,3785	0,008937
1L e 3L	95,2890	1	95,2890	0,008297
2L e 3L	16,5600	1	16,5600	0,045096
1x2x3	3,4716	1	3,4716	0,172731
Falta de ajuste	157,6917	1	157,6917	0,005038
Erro puro	1,6011	2	0,8005	
Total	948,9822	10		
<i>Bacillus polymyxa</i>				
(1)ph (L)	56,0741	1	56,0741	0,020853
(2)CONCENTRAÇÃO(L)	0,2176	1	0,2176	0,712427
(3)AGITAÇÃO(L)	182,2141	1	182,2141	0,006559
1L e 2L	18,9112	1	18,9112	0,058296
1L e 3L	44,5568	1	44,5568	0,026034
2L e 3L	6,8820	1	6,8820	0,139575
1x2x3	0,4608	1	0,4608	0,599629
Falta de ajuste	528,1089	1	528,1089	0,002278
Erro puro	2,4139	2	1,2069	
Total	839,8394	10		

Na tabela 4.4 verifica-se que a falta de ajuste foi significativa nos três modelos, ou seja, não ocorreu um bom ajuste do modelo dentro da faixa das variáveis independentes pesquisadas, sendo necessário pesquisas futuras com ampliação de faixas do pH, concentração do melaço e agitação. Assim a discussão será focada no comportamento obtido através dos modelos gerados das variáveis independentes (pH, concentração do melaço e agitação) sobre a resposta $Y_{P/S}(\%)$ com *Bacillus licheniformis*, *Bacillus alvei* e *Bacillus polymyxa*.

Na Figura 4.2 observa-se os efeitos significativos das variáveis independentes (pH, concentração do melaço e agitação) sobre o processo de conversão de substrato em produto com os três micro-organismos (*Bacillus licheniformis*, *Bacillus alvei* e *Bacillus polymyxa*).

Figura 4.2. Efeitos principais e de interação na conversão de substrato em acetoína, nos ensaios realizados com *Bacillus licheniformis* (a), *Bacillus alvei* (b) e *Bacillus polymyxa* (c).

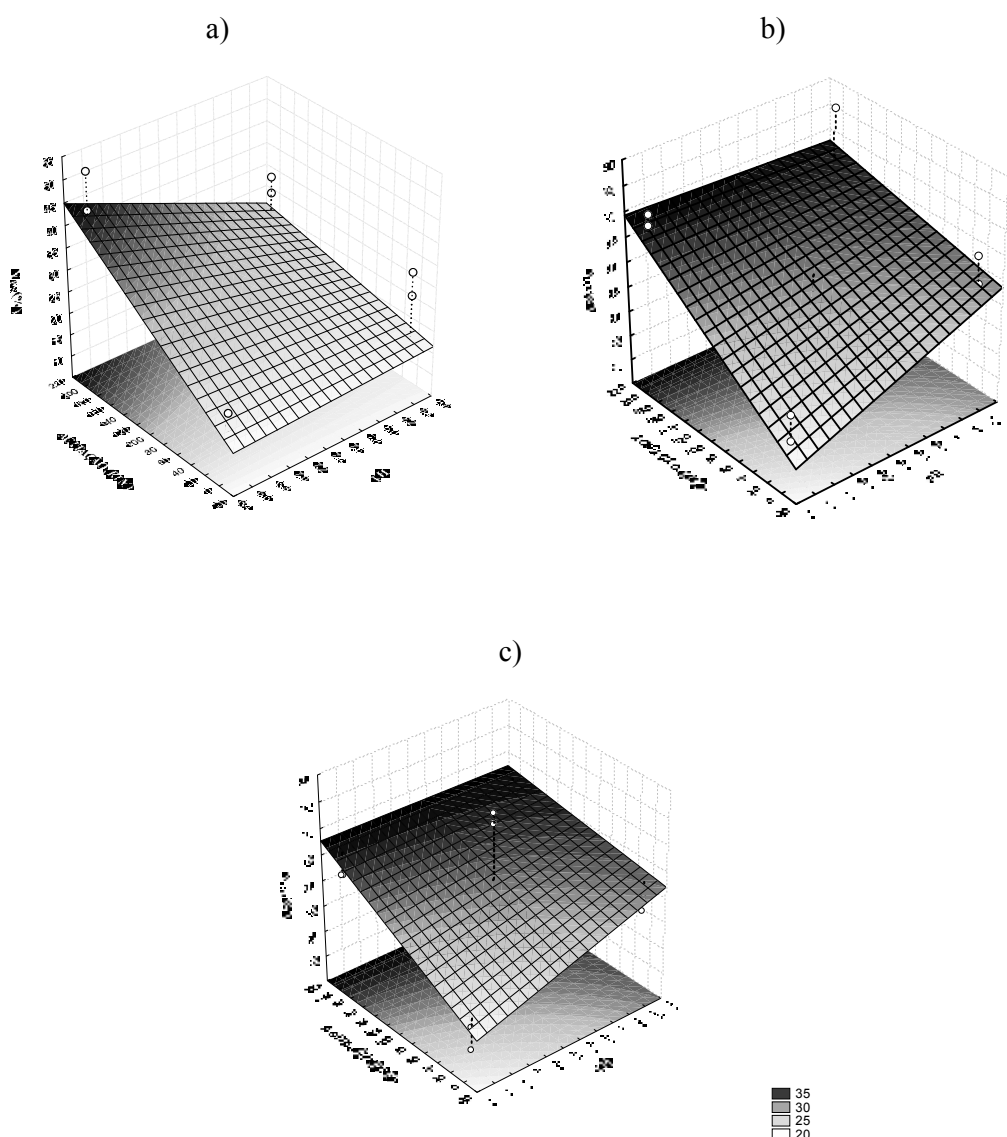


Analisando a Figura 4.2 a, b e c, verifica-se que a agitação pode ser considerada a principal variável que afetou os três processos de conversão de substrato em acetoína, pois apresentou maior magnitude dos efeitos, fato este que pode ser explicado pela utilização de micro-organismos aeróbios, que com agitação favorece a aeração, possibilitando maior consumo de oxigênio.

Conforme apontam alguns trabalhos na literatura o suprimento de oxigênio é, naturalmente, uma variável importante na produção de acetoína, favorecendo a produção do bioaroma (XIÃO & LU, 2014; COSTELLI, 2005; MOES, *et al.*, 1985).

Nas Figuras 4.3 a, b e c verifica-se o comportamento da agitação e pH no processo de conversão pelos micro-organismos *Bacillus licheniformis*, *Bacillus alvei* e *Bacillus polymyxa* através da superfície de resposta.

Figura 4.3. Superfície de resposta da conversão em acetoína realizados com *Bacillus licheniformis* (a), *Bacillus alvei* (b) e *Bacillus polymyxa* (c), em função do pH e agitação.



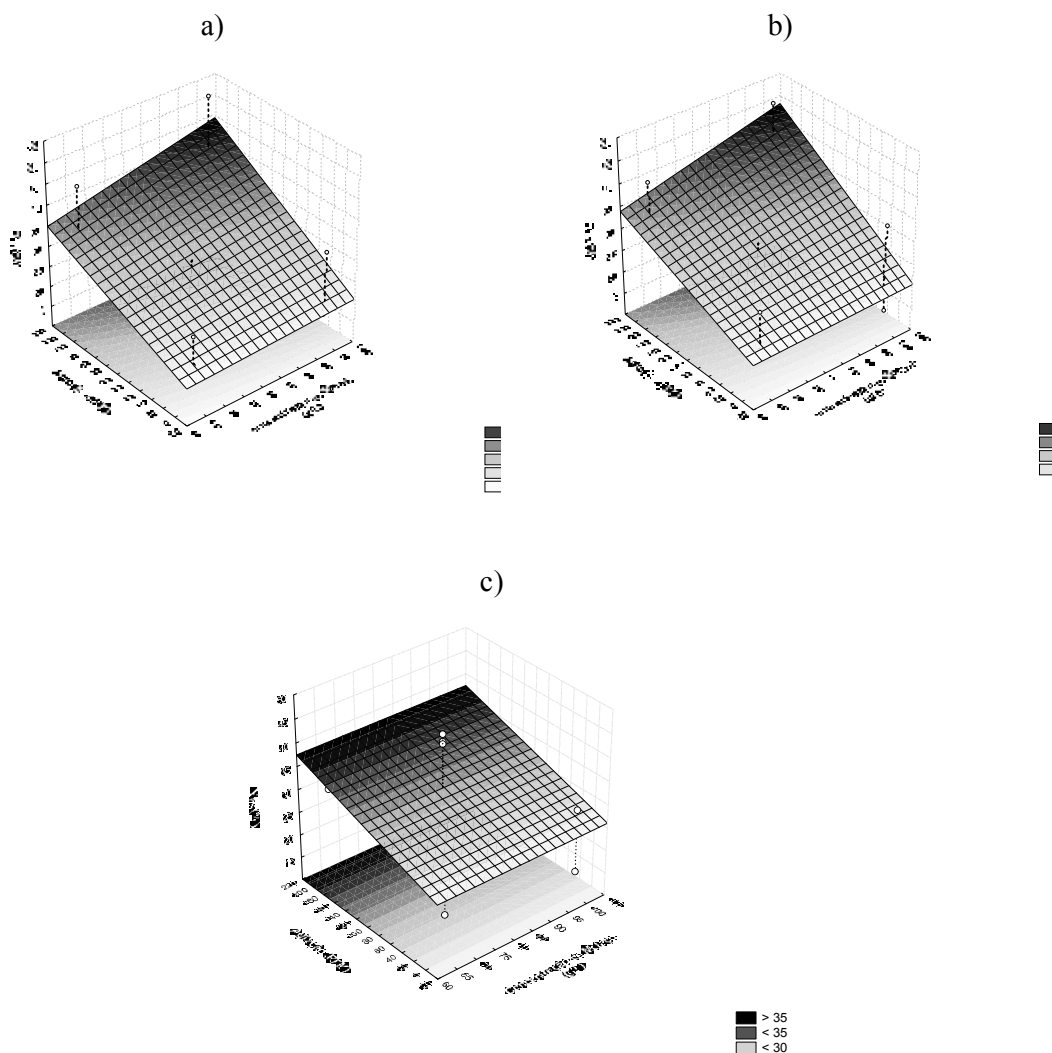
Nas Figuras 4.3 b e c, ficaram constatados que o pH teve efeito significativo, o aumento deste favoreceu a conversão do substrato pelos micro-organismos *Bacillus alvei* e *Bacillus polymyxa*, diferentemente com o *Bacillus licheniformis* (Figura 4.3 a), este não sofreu influência do pH. Este comportamento pode ser explicado pelo fato destes *Bacillus* produzirem enzimas que apresentam uma estabilidade no pH, fazendo com que as mesmas consigam produzir em valores de pH mais baixos 3,5 até valores mais altos como 12. (CARVALHO, 2007; BERNHARDSDOTTER, *et al.* 2005).

De acordo com a Figuras 4.3 b os micro-organismos *Bacillus alvei* apresentaram maior conversão de substrato em produto em pH 8,5, na literatura não há relatos de produção de acetoina nesse valor de pH. Vários autores avaliaram a produção de acetoina em pH mais ácidos (4,5; 5,0; 5,5 e 6,5) (LUERCE, 2002; COSTELLI, 2005; MARIOTTO, 2008).

Na Figura 4.3 a, b e c, constatou-se que a interação entre a agitação e pH teve influência significativa, ou seja, quanto menor o pH e maior a agitação, maior a conversão do substrato em acetoina pelos três micro-organismos, fato este comprovado pelo sinal negativo mostrado na Figura 4.2 a, b e c. Apesar de alguns trabalhos (CARVALHO, 2007; BERNHARDSDOTTER, *et al.* 2005) apontarem a capacidade dos micro-organismos do gênero *Bacillus* produzirem enzimas em diferentes valores de pH, cada enzima possui o pH ótimo para sua atividade, essa eficiência de produção com as enzimas depende uma série de fatores (substrato, temperatura e agitação), que interligados tem a função de melhorar ou até desfavorecer a produção.

Nas Figuras 4.4 a, b e c verificou-se o comportamento da agitação e concentração do melaço no processo de conversão pelos micro-organismos *Bacillus licheniformis*, *Bacillus alvei* e *Bacillus polymyxa* através da superfície de resposta.

Figura 4.4. Superfície de resposta da conversão em acetoína realizados com *Bacillus licheniformis* (a), *Bacillus alvei* (b) e *Bacillus polymyxa* (c), em função da agitação e concentração de melaço.



A Figura 4.4 a e b é possível verificar que a conversão de substrato em acetoína pode ser melhorada pelo aumento da concentração de substrato para os micro-organismos *Bacillus licheniformis* e *Bacillus alvei* diferentemente do comportamento do *Bacillus polymyxa* (Figura 4.4 c). Esse fato possivelmente pode ser explicado pela capacidade deste micro-organismos produzirem uma quantidade maior de enzimas, necessitando de uma quantidade mais elevada de substrato para converter em produto.

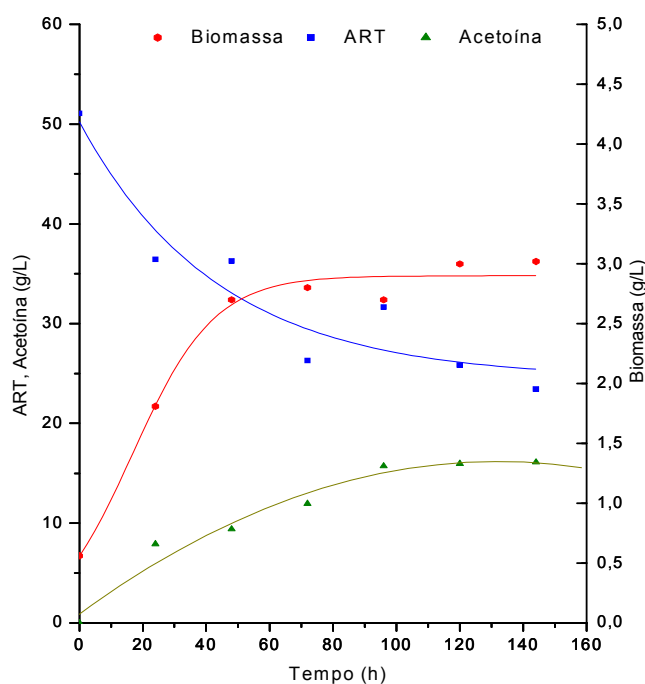
Estudos realizados por Luerce (2002) também afirmam que os maiores teores de acetoína são obtidos pelo aumento da concentração do substrato (glicose). Em seu experimento a concentração máxima de glicose utilizada foi de 50 g/L, valor inferior a concentração de açúcar (62,53g/L) presente no melaço (100g/L) utilizado na pesquisa.

4.4 CINÉTICA DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ACETOÍNA

Após a avaliação estatística do processo de produção de acetoína, viu-se que o micro-organismo *Bacillus licheniformis* foi o que apresentou um melhor percentual de conversão substrato em produto (52,88%) comparado ao *Bacillus alvei* (46,35%) e *polymyxa* (42,69%), consequentemente foi realizado um estudo cinético com este micro-organismo.

O estudo foi realizado por um período de 144 horas com agitação de 200rpm, pH de 6,5 e a concentração de melaço de 100g/L. A temperatura (35°C) e a suspensão bacteriana (10%) permaneceram constantes. A Figura 4.5 mostra as evoluções da concentração de substrato, biomassa e acetoína.

Figura 4.5 Evoluções da concentração de substrato, biomassa e acetoína no tempo.



Na Figura 4.5, é possível observar que o crescimento do micro-organismo não apresentou fase de adaptação, apenas fases exponencial e estacionária. O não ocorrido da fase de adaptação pode ser explicado pelo pH que se encontrava próximo a neutralidade e o inóculo já estava adaptado a esse valor. Mariotto (2007) estudou a influência do pH na produção de acetoína e 2,3- butanodiol por *Bacillus polymyxa* e observou que em pH 4,5 a fase de adaptação do micro-organismo foi de aproximadamente 40 horas. Aumentando o pH para 5,5, o micro-organismo foi capaz de se adaptar ao meio de cultura em apenas 3 e 8 horas. No caso do pH 6,5 a fase de adaptação foi muito pequena, podendo ser desconsiderada.

O *Bacillus licheniformis* atingiu a fase exponencial entre 0 e 48 horas de cultivo, com uma velocidade específica máxima de crescimento celular de $0,025 \text{ h}^{-1}$.

A concentração de biomassa atingiu um valor constante a partir de 48 horas de processo (Figura 4.5), com produção máxima de aproximadamente $3,0 \text{ g/L}$. O crescimento do micro-organismo pode estar sofrendo o efeito da inibição pelo produto. Segundo Luo *et al* (2014), a acetoína é tóxica para o crescimento celular, inibindo, assim, a capacidade das células consumirem a glicose. Os possíveis efeitos negativos da acetoína podem ser devido à sua toxicidade para a célula, podendo prejudicar a produção.

O micro-organismo começa a consumir o substrato presente no meio de cultura, visando paralelamente, a formação de células e de produto. Nesta fase, a velocidade de formação de biomassa é de $0,05 \text{ g/L.h}^{-1}$, entre 0 e 48 horas de cultivo (Figura 4.5).

Na fase exponencial, o substrato é convertido em produtos, e a sua velocidade de consumo da glicose foi de $0,30 \text{ g/L.h}^{-1}$, entre 0 e 48 horas. No final do cultivo $16,11 \text{ g/L}$ de acetoína foi produzido. Essa produção apresentou uma produtividade de $0,11 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}$.

Pode ser observado na Figura 4.5 uma maior produção de acetoína, na fase estacionária indicando que a produção não está diretamente ligada ao crescimento de células. Costelli (2005) também observou este mesmo comportamento em um estudo realizado com pH 5,5 atingindo $7,8 \text{ g/L}$ de acetoína pela bactéria *Bacillus polymyxa*.

A conversão de substrato em produto foi de $0,58 \text{ g}_{\text{sub}}/\text{g}_{\text{pro}}$ e de substrato em células foi de $0,09 \text{ g}_{\text{sub}}/\text{g}_{\text{cel}}$. Mariotto (2007) apresentou uma $Y_{X/S}$ de $0,08 \text{ g}_{\text{sub}}/\text{g}_{\text{cel}}$ bem semelhante a este trabalho, utilizando *Bacillus polymyxa* com pH 5,5 para produção de acetoína.

5 CONCLUSÃO

As principais conclusões obtidas foram:

- Os *Bacillus* isolados do sedimento de mangue da Lagoa do Araçá apresentaram potencial para produção do bioaroma. Dentre nove espécies de *Bacillus* identificadas, cinco eram produtoras de acetoína.
- O *Bacillus licheniformis* foi a linhagem que apresentou melhor resultado em percentual de conversão substrato em produto igual a 52,88%.
- A falta de ajuste foi significativa nos três modelos (*Bacillus*, *licheniformis*, *Bacillus alvei* e *Bacillus polymyxa*) sendo necessário pesquisas futuras com ampliação de faixas do pH, concentração de melaço e agitação.
- Uma condição que influenciou bastante na produção de acetoína foi a agitação no processo, evidenciando que as bactérias deste gênero dão preferência por rotas bioquímicas aeróbicas.
- A interação entre a agitação e pH teve influência significativa, ou seja favorece a conversão do substrato em acetoína pelas três linhagens.
- A concentração de melaço influenciou apenas os *Bacillus licheniformis* e *Bacillus alvei*.
- O hidrolisado de melaço pode ser uma alternativa para produção do bioaroma acetoína, porém esta produção pode ser melhorada através de uma otimização.

6 SUGESTÕES

- ✓ Estudar a produção de acetoína pelos *Bacillus coagulans* já que não foi encontrado nenhum relato na literatura.
- ✓ Realizar uma otimização da produção de acetoína pelos *Bacillus* estudados neste trabalho, através um delineamento composto central rotacional (DCCR) a fim de obter melhores resultados em relação a $Y_{P/S}$ e o modelo gerado.
- ✓ Realizar um estudo cinético com o *Bacillus alvei* em pH 8,5.

REFERÊNCIAS

ALCARDE, A.R. Processamento da cana-de-açúcar. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa. 2007, Brasília, DF. Anais.

ALEXANDRINO, A.M.; FARIA, H. G.; SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v.27, n.2, p. 364-368, 2007.

ANDRADE, S. A. C.; METRI, J. C.; BARROS NETO, B.; GUERRA, N. B. Desidratação osmótica do jenipapo (*Genipa americana* L.). **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v.23, n.2, p. 276-281, 2003.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes/ Aromas. Brasília, Poder Executivo, RDC nº 2 de 15 de janeiro de 2007.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos- Módulo IV, 2004.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**, 17 ed. Arlington : 2002, 1141 p.

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

BARROS, F. F. C. **Obtenção de compostos de aroma, enzimas e biossurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* em manipueira**. Tese de Doutorado. Campinas, SP: UNICAMP, 2011. 129p.

BERNHARDSDOTTER, E.C.M.J., N. G, J.D., GARRIOTT, O.K., PUSEY, M.L. Enzymic properties of an alkaline chelator-resistant α -amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate L1711. **Process Biochemistry**, v.40, p.2401–2408, 2005.

BLOM R. H. Configuration of acetylmethylcarbinol. **J Am Chem Soc.** v.67, n.8, p.494–8, 1945.

Burdock G. A. Fenaroli's handbook of flavor ingredients. 5th ed. London: CRC Press; 2004:11–2 [ISBN-13: 978–0849330346]

CAMPOS, S. Saiba mais sobre os aromas e flavorizantes, 2009.

Disponível em:

<<http://www.drashirleydecampos.com.br/imprimir.php?noticiaid=24600>>

Acesso em: 21 novembro de 2013.

CARMINES E. L. Evaluation of the potential effects of ingredients added to cigarettes. Part 1: Cigarette design, testing approach, and review of results. **Food Chem Toxicol.** v.40, p.77-91, 2002.

CARVALHO, R. V. **Produção e Caracterização de α -amilase por *Bacillus sp.* SMIA-2 Termofílico Utilizando proteínas do soro de leite, e algumas aplicações da enzima.** Tese de doutorado. Campos dos Goytacazes, RJ: UENF, 2007. 113 p.

CALASANS, P. N. **Produção de Aroma de coco por *Trichoderma harzianum* Utilizando bagaço de cana.** Dissertação de mestrado. São Cristóvão, SE: UFS, 2012. 91p.

CELINSKA, E.; GRAJEK, W. Biotechnological production of 2,3-butanediol: current state and prospects. **Biotechnology Advances**. v. 27, p. 715-725, 2009.

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

EUROPEAN COMMISSION – Directorate-General for Research. Towards a European knowledge-based bioeconomy – workshop conclusions on the use of plant biotechnology for the production of industrial biobased products. EUR 21459. Disponível em: <http://ec.europa.eu/research/agriculture/pdf/towards_know-based_bioeconomy.pdf> Acesso em: 19 novembro 2014.

CHIAPPINI, C. C. J. Aromas naturais produzidos por microrganismos. **Food Ingredients**. Brasil, n.4, 2008.

COGGINS C. R. E., JEROME A. M., EDMISTON J. S., OLDHAM M. J. A comprehensive evaluation of the toxicology of cigarette ingredients: aliphatic carbonyl compounds. **Inhal Toxicol**. v. 23, p.102–18, 2011.

CORREIA, J. L. A.; SANTOS, T. R. dos; SILVA JR, A. A. da; MARQUES, O. M. **Isolamento, identificação e avaliação do potencial enzimático de bactérias autóctones de sedimento de mangue da lagoa do Araçá-PE.** In: Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia Química- COBEQ 2014, 20, 2014, Florianópolis, SC. Editora Blucher Chemical Engineering Proceedings, v. 1, n. 2, p. 1567-1574, 2015.

COSTA, J. M. G. **Eficiência de diferentes encapsulantes e condições operacionais de secagem por atomização na produção e aplicação de micropartículas de biomassa de queijo suíço.** Tese de doutorado. Lavras. MG: UFLA, 2013.151p.

COSTELLI, M. C. **Cultivo de *Bacillus polymyxa* para a produção de acetoína: Influência do pH e do Tempo de Cultivo do Inóculo.** Dissertação de mestrado. Florianópolis, SC: UFSC, 2005. 90p.

FANI, M. Aromas e Biotecnologia. **Aditivos & Ingredientes**. Ed Insumos, n.82, p 44-50, setembro, 2011.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H. Estudo da influência de diferentes parâmetros na produção de enzimas líticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.28, n.2, p.299-310, 2008.

FUNCIONAIS E NUTRACEUTICOS. Enzimas Catalisadoras de Reações Biológicas. Revista Insumos. n.86, p.20-29, 2015. Disponível

em:<http://www.insumos.com.br/funcionais_e_nutraceuticos/materias/86.pdf> Acesso em: 03 out. 2015.

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

GIRARDI, V. Emprego do glicerol como fonte de carbono na produção fermentativa 2,3-Butanodiol por *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048. Dissertação de mestrado. Caxias do Sul, RS: UCS, 2014, 85p.

GONZALEZ R. A. A., BAUER A., CAPPLEMAN R. S., HARTH H., HILSMANN J., LAHN W., STURM M. Particles containing perfume having improved fragrance properties. 2008, United States patent application 20080207476.

GATFIELD, I. L. Perfumer & Flavorist. 1995.

HANKIN, L. & ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**. v. 67, p. 597-607, 1979.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo). Métodos físico-químicos para análise de alimentos /coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea -- São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008 p. 1020

JAMES, T. S., CHAIRMAN, D. R. B., VICE, C., DON, J. B., PAUL. V., GEORGE, M. G., MICHAEL, G., NOEL, R. K., FRED, A. R., KARL-HEINZ, S. (Ed.) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2ª Edição, volume 1, New York: Springer. 721p., 2005.

JI, X. J.; HUANG, H.; DU, J.; ZHU, J. G.; REN, L. J.; LI, S. Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca* using a two-stage agitation speed control strategy. **Bioresource Technology**. v.100, p. 3410-3414, 2009.

KITANCHAROEN, N. & HATAI, K. Some Biochemical Characteristics of Fungi Isolated from Samonid Eggs. **Mycoscience**, v. 39. 1998.

KUTA, F. A., NIMZING, L., ORKA`A, P. Y. Screening of *Bacillus* species with potentials of antibiotics production. **Applied Medical Informatics**. v. 24, n. 1-2, p. 42-46, 2009.

LENNETTE, E. H.; BALOWS, A.; HAUSLER, W. J.; SHADOMY, H. J. – Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1985, 959p.

LIMA, L. A; FILHO, R. F. C.; SANTOS, J. G.; SILVA, W. C. Produção de protease colagenolítica por *Bacillus stearothermophilus* de solo amazônico. **Acta Amazonica**. v.44, n.4, p.403-410, 2014.

LISBOA, C. R.; COSTA, F. A. A.; BURKERT, J. F. M.; BURKERT, C. A. V. Síntese de galacto-oligossacarídeos a partir de lactose usando β -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis*. **Braz. J. Food Technol.** v 15, n.1, p. 30-40, 2012.

LIU, Y.; ZHANG, S.; YONG, Y.-C.; JI, Z.; MA, X.; XU, Z.; CHEN, S. Efficient production of acetoin by the newly isolated *Bacillus licheniformis* strain MEL09. **Process Biochemistry**. v.46, p. 390-394, 2011.

LUERCE, R. F.. **Produção de acetoina por *Bacillus polymyxa***. Dissertação de mestrado. Florianópolis, SC: UFSC, 2002. 67p.

LUO, Q.; WU, J.; WU, M. Enhanced acetoin production by *Bacillus amyloliquefaciens* through improved acetoin tolerance. **Process Biochemistry**. v.49, p. 1223-1230, 2014.

LUZ, M. P. **Produção de Bioaromas pela fermentação de permeado de soro de queijo por *Propionibacterium freudenreichii* PS-1**. Dissertação de mestrado. Lavras, MG: UFLA, 2010. 104p.

MANTOVAN, J.; ALVES, D. S., CELLIGOI, M. A. P. C. Produção de Levana por *Bacillus subtilis* natto utilizando Melão de Cana-de-açúcar. **BBR- Biochemistry and Biotechnology Reports**, v.2, n.3, p. 328-330, 2013.

MARIOTTO, J. L., **Produção de acetoina e 2,3-butanodiol por *Bacillus polymyxa***. Dissertação de mestrado. Florianópolis, SC: UFSC, 2007. 75p.

MERCK INDEX ,1990.

MEZAROBA, S.; MEGUETTI, C. C.; GROFF, A. M. Processos de produção do açúcar de cana e os possíveis reaproveitamentos dos subprodutos e resíduos resultantes do sistema. IV Encontro de Engenharia de Produção Agroindustrial. FECILCAM. Campo Mourão-PR, 2010.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Pioneering Research Division, Quartermaster Research and Engineering Center, Natick, Mass, 1959.

MOES J, GRIOT M, KELLER J, HEINZLE E, DUNN IJ, BOURNE JR. A microbial culture with oxygen-sensitive product distribution as a potential tool for characterizing bioreactor oxygen transport. **Biotechnol Bioeng** 1985;27:482-9.

MORRIS P. Safety assessment of acetoin as a food ingredient. In: Burdock Group, organization author. Legacy Tobacco Documents Library. University of California, San Francisco, 2002.

Disponível em:

<<http://legacy.library.ucsf.edu/tid/pa191g00;jsessionid=D969F4FC6DE84BC5539765BA1139B9FF.tobacco01>> Acesso em : 10 de fevereiro 2015.

MONTGOMERY, 2004. **Introdução ao controle estatístico da qualidade**. 4ª Edição. Editora LTC, 2004.

NAJAFPOUR, G. D.; SHAN, C. P. Enzymatic hydrolysis of molasses. **Bioresource Technology**, v. 86, n. 1, p. 91-94, 2003.

NEGISHI T, OKANO T, YAMAMOTO T, KAWAMOTO S. Fly attractant and trap for catchingfly. 2001, Japan patent 2001–233709.

OLIVEIRA, S. M. M.; **Avaliação da Produção Biotecnológica de 2- Feniletanol em Resíduo Líquido de Fecularia**. Dissertação de mestrado. Cascavel, PR: UNIOESTE, 2010, 72p.

OMELIANSKI, V. L. Aroma-Producing Microorganisms. **Journal Bacteriology**, v.8 n.4 p. 393,1923.

OLIVEIRA, D. N. A.; CORREIA, J. L. A.; MARQUES, O. M.; SILVA, I. J. S.; TRINDADE, F. C. S.; PEREIRA, Y. Isolamento, identificação e avaliação de bactérias do gênero *Bacillus* com potencial para produção do bioaroma acetoina. 54º Congresso Brasileiro de Química, 2014, Natal-RN.

PARK, J. M.; SONG, H; LEE, H. J.; SEUNG, D. Genome-scale reconstruction and *in silico* analysis of *Klebsiella oxytoca* for 2,3-butanediol production. **Microbial. Cell Fact.** v.12 n.20, p. 1-20, 2013.

PAZ, M. C. F. Identificação e caracterização de *Bacilluslicheniformis* e *Geobacillus stearothermophilus*. Produção de biossurfactante e degradação de dibenzotiofeno (DBT) por uma nova amostra de *Geobacillus stearothermophilus* UCP 986. Tese de Doutorado. Recife, PE:UFPE, 2005. 170p.

PELCZAR, M. J., CHAN, E. C. S., KRIEG, N. R. Microbiologia: Conceitos e Aplicações, volume I, 2ª edição, 2008. São Paulo: Pearson, 524p.

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

PEREIRA, C. D. A.; **Produção de Metabólitos Voláteis frutais por *Kluyveromyces marxianus* em fermentação submersa em meio à base de Melaço de soja**. Dissertação de mestrado, Curitiba, PR: UFPR, 2007, 80p.

RODRIGUES, M. I.; LEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. 2ª. Ed. Campinas-SP, 2009.

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

ROMIO, T. **Produção de 2,3-Butanodiol a partir de glycerol por *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724**. Dissertação de mestrado. Caxias do Sul, RS: UCS, 2014, 62p.

ROSSI, S.C. *et al.* Improving fruity aroma production by fungi in SSF using citric pulp. **Food Research International**, v.42, n.4, p. 484-486, 2009.

SCHMIDELL, W.; LIMA, A. U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: E. Blücher, 2001. v. 2, 254 p.

SILVA, I. J. S.; CORREIA, J. L. A. C.; OLIVEIRA, D. N. A.; MARQUES, O. M.; LIMA, V. F.; SCHULER, A. R. P. Produção do bioaroma acetoina a partir de macaxeira avariada por meio de bactéria do gênero *Bacillus*. In: 54º Congresso Brasileiro de Química, 2014, Natal-RN.

SUN J.; ZHANG L.; RAO B.; HAN Y.; CHU J.; ZHU J. Enhanced acetoin production by *Serratia marcescens* H32 using statistical optimization and a two-stage agitation speed control strategy. **Biotechnol Bioprocess Eng.** v.17, p 598-605, 2012

THIESEN K, KLAUCK R, SORS N, KOEHLER M, WENDICKE S. Hair treatment composition, useful e.g. for dyeing keratinous fibers, preferably feathers or hair, comprises 1,3-dihydroxyacetone, other carbonyl compounds comprising e.g. glutaraldehyde or glyoxylic acid, and an amino component. 2012, German patent DE102011017519-A1

TOKASHIKI, T.; YAMAMOTO, H. WATANABE, H; NAKAJIMA, R; SHIMA, J. A functional compound contained sugar cane molasses the fermentation ability of baker's yeast in high-sugar dough. **Journal of General and Applied Microbiology.** v.57. Japan, 2011.

TODA F, TANAKA K, TANGE H. New reduction method of diketones, oxo amides, and quinones with Zn-EtOH in the presence of a salt. **J Chem Soc, Perkin Trans,** v.1, p.1555-1556, 1989.

TRABULSI, L. R., ALTERTHUM, F. Microbiologia, 5ª edição, 2008. São Paulo: Atheneu, 760p.

UENOJO, M. **Produção e caracterização de aromas de frutas por microrganismos pectinolíticos utilizando-se resíduos agroindustriais.** 2003. 134 f. Dissertação de mestrado. Campinas, SP: UNICAMP, 2003, 134p.

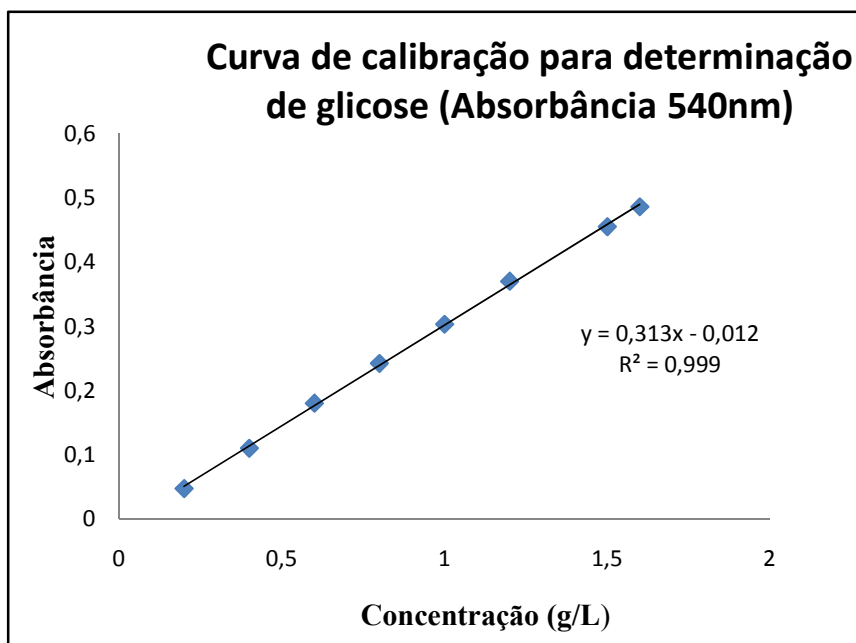
UNICA- Açúcar e álcool de Brasil – Commodities da Energia e do Meio Ambiente. União da Agroindústria Canavieira de São Paulo, maio de 2004.
Disponível em:
< <http://www.unica.com.br/> > Acesso em: 12 de dezembro 2015.

XIAO, Z. & LU, J. R. Strategies for enhancing fermentative production of acetoin: A review. **Biotechnology Advances.** v. 32, p. 492-503, 2014.

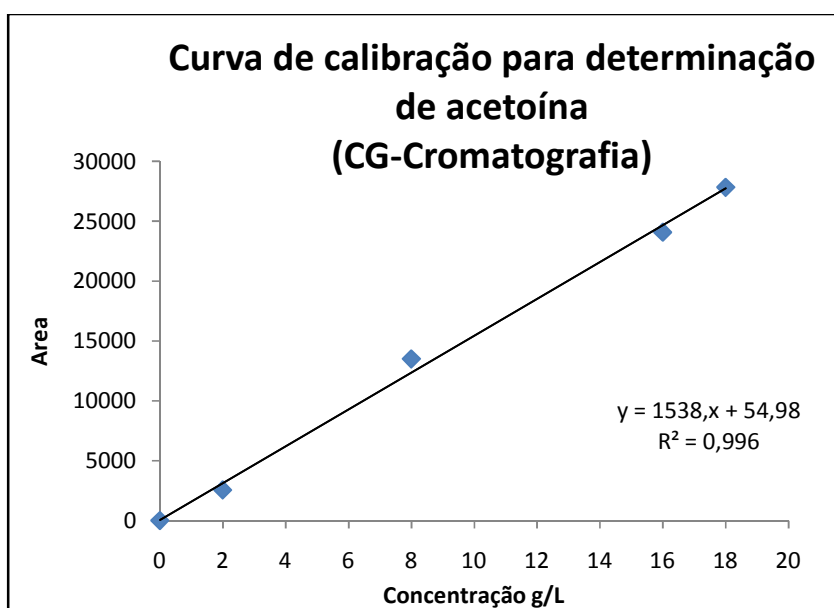
ZHANG, Y.; HUANG, Z.; DU, C.; LI, Y.; CAO, Z. Introduction of an NADH regeneration system into *Klebsiella oxytoca* leads to an enhanced oxidative and reductive metabolism of glycerol. **Metab. Eng.** v. 11, p 101-106, 2009.

ANEXOS

Anexo A- Curva de Calibração para determinação de glicose



Anexo B- Curva de Calibração para determinação de acetoína



Anexo C- Resultados obtidos na cinética

Tempo (h)	Produto final (g.L⁻¹)	Substrato inicial (g.L⁻¹)	Substrato final (g.L⁻¹)
0	0	51,05	51,0523
24	7,907968	51,05	36,43973
48	9,395619	51,05	36,28029
72	11,95141	51,05	26,31537
96	15,72403	51,05	31,65657
120	15,97437	51,05	25,83705
144	16,11419	51,05	23,44547