

EFEITO DA OXIGENAÇÃO E DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO SOBRE AS BIOPRODUÇÕES DE ACETOINA E DIACETIL

Attilio Converti^{*1}, Patrizia Perego¹, Danilo De faveri¹, Paolo Torre¹, Sunao Sato²

¹Dipartimento di Ingegneria Chimica e di Processo "G.B. Bonino", via Opera Pia 15, I-16145 Gênova, Itália, converti@unige.it

²Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580/B16, 05508-900, São Paulo, SP

ABSTRACT

Aim of the present work is the study of the bio-oxidation of 2,3-butanediol to diacetyl and acetoin, two compounds that can be used for the production of more complex flavours. Their production through the traditional chemical way implies the use of catalysts that can be hazardous for human health. A lot of work has been done on the production of these compounds by lactic bacteria, among which *Lactococcus lactis* and *Streptococcus lactis*, whereas nothing is known about their possible synthesis through 2,3-butanediol oxidation by acetic bacteria. Preliminary batch productions of diacetyl and acetoin by *Acetobacter Hansenii* have been performed to study the effects of oxygen and starting substrate levels on the yields of both products. The experimental results have then been used to propose a kinetic model able to describe this process.

1. INTRODUÇÃO

A acetoina é uma hidroxicetona com quatro átomos de carbono que tem elevada polaridade devido à hidroxila e à carbonila, acentuada pelo curto comprimento da cadeia carbônica. Esta particular característica confere ao composto uma boa solubilidade em água e um ponto de ebulição mais elevado seja do alceno que do alqueno correspondentes. A acetoina é usada como componente para a produção de diversos aromas de interesse alimentício, por ter um característico odor de manteiga. O diacetil, que é uma dicetona cuja estrutura química difere daquela da acetoina por ter a hidroxila substituída por outra carbonila, é muito hidrossolúvel, tem um ponto de ebulição relativamente elevado e possui propriedades físicas e químicas muito parecidas com as da acetoina. Também o diacetil é um aroma da indústria alimentar com sabor de manteiga, que pode ser usado como aditivo em produtos de forno ou como precursor para a síntese de outros aromas. Devido ao seu uso no setor alimentício, seria muito interessante conseguir produzir ambos estes produtos por via biotecnológica.

Embora diacetil e acetoina sejam produtos secundários do metabolismo de numerosas bactérias, os rendimentos a partir de glicose são geralmente baixos e, portanto, são procuradas as condições de processo que possam incrementá-los. Os microrganismos mais estudados são as bactérias lácticas, quais *Lactococcus lactis* e *Streptococcus lactis* (Shimazu *et al.* 1985, Cogan 1995, Cogain-Bousquet *et al.* 1996, Escamilla *et al.* 1996, Rondags *et al.* 1999, Petit *et al.* 1989).

Em alternativa, tanto o diacetil quanto a acetoina podem ser produzidos por simples oxidação do 2,3-butanediol mediante bactérias acéticas, se bem que

as referências bibliográficas a este propósito sejam praticamente inexistentes. Objetivo deste trabalho é o estudo das condições de operação ótimas (oxigênio e concentração de substrato) que possibilitem a obtenção dos melhores rendimentos e a modelagem cinética do processo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Microrganismo. *Acetobacter Hansenii* MIM 2000/5 era mantido em PDA após incubação a 28°C durante 48 h. Em seguida, as células eram utilizadas para o pré-inóculo do terreno líquido de crescimento cuja composição era: 25 g/l glicerol e 10 g/l extrato de levedura. O crescimento era conduzido em frascos de 500 ml contendo 200 ml de solução em agitador rotativo 250-300 rpm durante 48 h. A células eram separadas do meio líquido mediante centrifugação estéril a 8000 rpm por 15 min e sucessivamente utilizadas para o inóculo do terreno de fermentação, cuja composição era: 2,3-butanediol em concentração variável, 0.2 g/l K₂HPO₄ e 0.1 g/l MgSO₄·7H₂O.

Condições de fermentação. As fermentações foram conduzidas num fermentador Applikon, modelo Z61103CT04, de 3 litros, equipado com um sistema de controle e regulação das variáveis de processo (Applikon ADI 1030). O pH foi mantido a 5.5 mediante adição de 0.5 N NaOH e 0.1 N H₂SO₄ de acordo com as necessidades, enquanto a temperatura selecionada foi 28°C. A concentrações desejadas de oxigênio dissolvido (variáveis entre 10.0% e 27.5% do valor de saturação à mesma temperatura) eram selecionadas regulando com um fluxímetro o fluxo de oxigênio no ingresso do fermentador e variando as condições de agitação (100-450 rpm).

Métodos analíticos. As concentrações de 2,3-butandiol, diacetil e acetoina eram detectadas através de um HPLC Hewlett Packard 1100 equipado com integrador HP 1047^A e coluna SUPELCOGEL H 300x7.8. As condições analíticas eram: $T = 35^{\circ}\text{C}$; fase móvel 0.1% H_3PO_4 em água; fluxo de 0.5 ml/min. A concentração celular era calculada por via gravimétrica usando filtros com porosidade de 0.45 μm . A produção de CO_2 era determinada mediante titulação (ISO, 1997) após coleta do gás na saída do reator em soluções de $\text{Ba}(\text{OH})_2$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ensaios foram planejados mediante um método fatorial com ponto central (Montgomery, 2000). Os parâmetros variáveis eram a aeração e a concentração inicial de substrato (1.8, 4.5, 7.0, 10.0 g/l), enquanto a concentração inicial de biomassa era mantida ao valor constante de 1.2 g/l.

Com vista à seleção das condições ótimas de aeração e à maximização dos rendimentos de produtos, foi variada a concentração de oxigênio (10.0, 15.0, 20.0, 27.5% do valor de saturação a 28°C) mantendo constante a concentração de 2,3-butandiol ao valor de 10.0 g/l. A Figura 1 ilustra os comportamentos da concentração de acetoina e de diacetil em função do tempo destas fermentações. Pode-se notar como em condições de oxigenação suficientemente elevada ($\text{O}_2 = 27,5\%$) não houve sequer produção de diacetil, enquanto a aeração a nível baixo ($\text{O}_2 = 10,0\%$) aumentou a duração total da transformação.

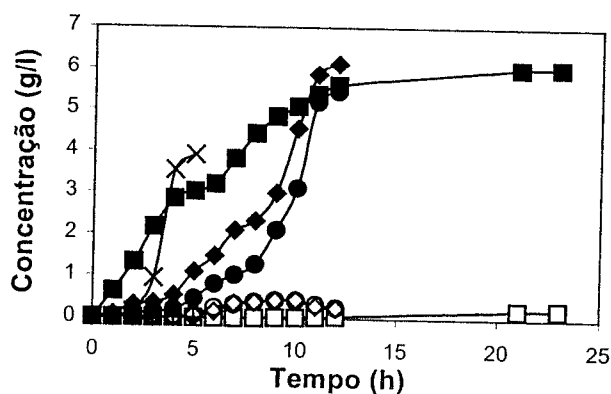


Figura 1. Concentrações de diacetil e acetoina em função do tempo. Ensaios conduzidos a diversos teores de oxigenação: (\square) Diacetil-10,0%; (\blacksquare) Acetoina-10,0%; (\diamond) Diacetil-15,0%; (\blacklozenge) Acetoina-15,0%; (\circ) Diacetil-20,0%; (\bullet) Acetoina-20,0%; (+) Diacetil-27,5%; (\times) Acetoina-27,5%.

A Tabela 1 mostra os rendimentos em acetoina e diacetil calculados para as fermentações conduzidas com oxigenação variável.

Tabela 1. Rendimento em acetoina e diacetil obtidos através de ensaios a diversos teores de oxigenação.

O_2 (%)	Y acetoina (g_a/g_s)	Y diacetil (g_d/g_s)
10.0	0.602	0.0230
15.0	0.612	0.0438
20.0	0.545	0.0428
27,5	0.390	0,0000

Pois os melhores resultados foram obtidos em presença de concentração de oxigênio entre 15,0 e 20,0% do valor de saturação, as sucessivas fermentações a diversas concentrações iniciais de substrato foram executadas mantendo o nível de oxigenação perto deste valor ótimo ($\text{O}_2 = 15,0\%$). A Figura 2 ilustra os resultados salientes destes ensaios em termos de concentrações de acetoina e diacetil em função do tempo. Pode-se ver como a produção de acetoina seja particularmente interessante, enquanto a concentração de diacetil fique sempre a níveis insatisfatórios.

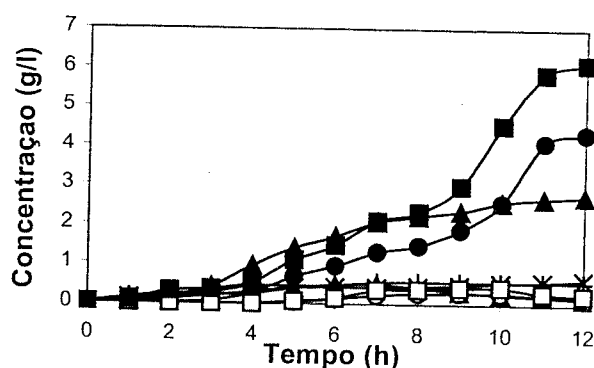


Figura 2. Concentrações de diacetil e acetoina em função do tempo. Ensaios conduzidos a diversas concentrações iniciais de substrato: (+) Diacetil-1,8 g/l; (\times) Acetoina 1,8-g/l; (Δ) Diacetil 4,5-g/l; (\blacktriangle) Acetoina-4,5g/l; (\circ) Diacetil 7,0-g/l; (\bullet) Acetoina-7,0 g/l; (\square) Diacetil-10 g/l; (\blacksquare) Acetoina-10 g/l.

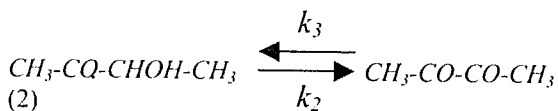
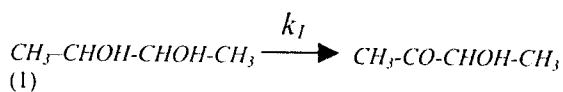
Em adição, os dados de Tabela 2 evidenciam um progressivo aumento do rendimento em acetoina e uma progressiva diminuição do rendimento em diacetil ao crescer da concentração de substrato.

Tabela 2. Rendimento em acetoina e diacetil obtidos através de ensaios a diversas concentrações iniciais de substrato (C_i).

C_i (g/l)	Y acetoina (g_a/g_s)	Y diacetil (g_d/g_s)
1,8	0.354	31,81
4,5	0.609	11,33
7,0	0.620	4,28
10,0	0.612	4,38

Vale ressaltar o fato que os rendimentos foram calculados usando sempre os valores máximos de concentração dos produtos, que no caso da acetoina sempre coincidiram com o valor final, enquanto no caso do diacetil foram freqüentemente encontrados antes do término da fermentação.

Na segunda fase do trabalho tem sido realizado um estudo cinético com vista a possíveis aplicações futuras do processo em escala industrial. As equações cinéticas se baseiam sobre a hipótese que *A. hansenii* atue a oxidação completa do 2,3-butandiol através de duas reações em serie. No primeiro estágio, o substrato seria transformado em acetoina e no segundo em diacetil, graças à oxidação de ambas as hidroxilas. Supõe-se também que a primeira oxidação seja irreversível enquanto a segunda seria reversível, com uma constante de equilíbrio que favoreceria a formação do composto menos oxidado (acetoina):



Considerando que essas reações procedem em solução aquosa em presença de biomassa e que o rendimento em diacetil decresce com o aumento da concentração de 2,3-butandiol, a hipótese mais direta é a cinética de Monod combinada com inibição devida ao substrato. Tem sido também considerado o efeito da oxigenação sobre o crescimento e a produção dos compostos oxidados. Com base nessas hipóteses e desprezando, em primeira aproximação a produção de CO₂, todas as gerações (crescimento celular, produção de acetoina e produção de diacetil) teriam a forma:

$$r_i = \frac{\mu_{max} \cdot \mu_{maxO} \cdot C_i \cdot C_O \cdot C_x}{\left(k_i + C_i + \frac{C_i^2}{k_I} \right) \cdot (k_O + C_O)} \cdot y_{xi} - m_i \cdot C_x \quad (3)$$

Pois esse modelo não seria fácil de se utilizar por causa da presença de um número excessivo de parâmetros, supõe-se que tanto a reação direta quanto aquela inversa do segundo estágio possam ser descritas pela cinética de Michaelis-Menten, o que equivale a dizer que o consumo dos produtos acetoina e diacetil não contribui ao crescimento celular. O modelo cinético, portanto, torna-se constituído pela relação anterior (Eq. 3) e pela seguinte equação:

$$r_{pi} = \frac{V_{maxi} \cdot C_{pi}}{k_{mi} + C_{pi}} \quad (4)$$

De acordo com as simplificações acima descritas, o número de parâmetros a serem determinados reduz-se de 18 para 10, de modo a limitar a possibilidade de erro de interpolação dos dados numéricos em relação aos fenômenos físico-químicos envolvidos. Os parâmetros têm sido determinados sob base estatística utilizando-se um programa de elaboração de dados baseado sobre o método da máxima verossimilhança. Todavia, foi possível estimar só 7 dos 10 parâmetros cinéticos devido a um número de dados experimentais insuficiente para o modelo proposto. Em adição, os dados experimentais de alguns dos ensaios não são bem interpolados pelo modelo proposto, o que sugere de executar um maior número de ensaios e de efetuar um estudo microcinético mais aprofundado.

Vale salientar, em fim, que os rendimentos em acetoina foram mais satisfatórios dos que os de diacetil seja para aos ensaios a oxigenação variável que para aqueles a concentração inicial de substrato variável. Em condições de oxigenação limitada (O₂ = 10%), o microrganismo foi incapaz de oxidar completamente o 2,3-butandiol, acumulando-se desta forma acetoina no meio de cultivo; ao contrário, em presença de um teor suficientemente elevado de oxigênio a produção de diacetil foi totalmente inibida. Com base a essas considerações e aos resultados apresentados, as condições ótimas para a produção de ambos os produtos parecem encontrar-se com valores intermediários de oxigenação (15,0-20,0%) e com a concentração de substrato mais baixa (1,8 g/l).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cogain-Bousquet M, Garrigues C, Loubiere P, Lindley ND (1996) *Antonie Van Leeuwenhoek* **70**: 253-267.
- Cogan TM (1995) *J. Appl. Bacteriol. Symp.* **79**: 49s-64s.
- Montgomery DC (2000) *Design and Analysis Experiments*, 5th ed., Wiley, New York, pp. 218-240.
- Escamilla-Hurtado ML, Tomasini-Campocoso A, Valdés-Martinez S, Soriano-Santos J (1996) *Revista Latinoamericana de Microbiologia* **38**: 129-137.
- ISO. 1997. In: *Drafts International Standards ISO/DIS 14852, ISO/TC 61/SC 5*, International Organization for Standardization, pp. 1-24.
- Jansen NB, Flickinger MC, Tsao TG (1984) *Biotechnol Bioeng* **26**: 362-369.
- Petit C, Vilchez F, Marzac R (1989) Influence of citrate on the diacetyl and acetoin production by fully grown cells of *Streptococcus lactis subsp. diacetylactis*, Laboratory of Biological Chemistry, University of Nancy, Vandoeuvre les Nancy-Cedex, France.

Rondags E, Germain P, Marc I (1999) *Biotechnol. Lett.*
21: 303-307.

Shimazu Y, Uehara M, Watanabe M (1985) *Agric. Biol. Chem.* 49: 2147-2157.