

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA**  
**AGRÍCOLA E DO AMBIENTE**

**BIOCONVERSÃO DE L-FENILALANINA EM 2-FENILETANOL POR**  
***Kluyveromyces marxianus* EM MOSTO DE UVA**

Dissertação de Mestrado

**Juliano Garavaglia**

Porto Alegre, março de 2006

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA**  
**AGRÍCOLA E DO AMBIENTE**

**BIOCONVERSÃO DE L-FENILALANINA EM 2-FENILETANOL POR**  
***Kluyveromyces marxianus* EM MOSTO DE UVA**

Juliano Garavaglia

(Tecnólogo em Viticultura e Enologia – CEFET-BG)

Dissertação apresentada como um dos requisitos à obtenção do  
grau de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

**Orientador:** Dr. Marco Antônio Záchia Ayub

Porto Alegre, Brasil

Março, 2006

## **AGRADECIMENTOS**

A conclusão deste trabalho é apenas o início de muitos projetos que se concretizarão para o desenvolvimento ainda maior da pesquisa no Brasil. Espero poder contribuir imensamente em toda a evolução da ciência durante o seu constante processo de mutação e desenvolvimento.

Agradeço de forma inesquecível a todos que contribuíram para o desenvolvimento desta importante etapa em minha jornada profissional.

# BIOCONVERSÃO DE L-FENILALANINA EM 2-FENILETANOL POR *Kluyveromyces marxianus* EM MOSTO DE UVA <sup>1</sup>

Autor: Juliano Garavaglia

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub

## RESUMO

O 2-feniletanol é um álcool superior que possui aroma característico de pétalas de rosas. É utilizado pela indústria de perfumes e fragrâncias e em menores volumes, na indústria de alimentos. Pode ser obtido através de extratos naturais de muitas flores, da síntese química a partir do estireno e benzeno, e também, por vias biotecnológicas com o uso de microrganismos. Leveduras são consideradas microrganismos bons produtores de 2-feniletanol através da bioconversão a partir de L-fenilalanina, o precursor natural de 2-feniletanol, que é fortemente dependente do meio e das condições de cultivo. Foram testadas diferentes cepas de levedura, utilizando-se um meio semisintético. O mosto de uva foi utilizado na bioconversão a partir da L-fenilalanina e um planejamento fatorial  $2^3$  foi utilizado para a otimização da bioconversão testando-se diferentes condições de pH, temperatura e concentração de L-fenilalanina. Foram realizados cultivos com mosto de uva pasteurizado (100 °C por 30 min) em biorreatores de 2L, testando-se diferentes sistemas de aeração e agitação, 250 rpm de agitação, 1 vvm e 250 rpm e 2 vvm e 500 rpm. A levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 produziu 0,19 gL<sup>-1</sup> de 2-feniletanol, demonstrando ser a melhor cepa produtora. No mosto de uva pasteurizado, esta cepa foi capaz de produzir 0,51 gL<sup>-1</sup> (aumento de 60% na produção). Altos rendimentos foram encontrados a temperatura de 37 °C, pH 7,0 e a uma concentração de L-fenilalanina de 3,0 gL<sup>-1</sup>. A aeração de 1 vvm e agitação de 250 rpm, demonstrou ser um fator importante para a bioconversão, *K.marxianus* CBS 6556 produziu 0,77 gL<sup>-1</sup> de 2-feniletanol, com um rendimento de 0,62 gg<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (104p.) Março, 2006.

# **BIOCONVERSION OF L-PHENYLALANINE INTO 2-PHENYLETHANOL BY *Kluyveromyces marxianus* YEASTS IN GRAPE MUST <sup>1</sup>**

Author: Juliano Garavaglia

Advisor: Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub

## **ABSTRACT**

The 2-phenylethanol is a high alcohol, which is the characteristic aroma of the rose petals. It is mainly used for perfume and fragrance industries and, in smaller proportions, in the food industry. 2-phenylethanol can be produced through chemical synthesis with benzene or styrene, extracted from several flowers, or by biotechnology technology with some microorganisms. Yeasts are known as the best producers of 2-phenylethanol by the bioconversion from L-phenylalanine, the natural precursor of 2-phenylethanol, that is strongly affected by medium composition and culture conditions. Different types of yeasts were tested, utilizing a semisynthetic medium. The grape must was used in the bioconversion and a 2<sup>3</sup> factorial design was used to optimize the bioconversion, testing different conditions of pH, temperature and L-phenylalanine concentration. Were realized cultivations with pasteurized grape must (100 °C for 30 minutes) during bioreactor experiments, under different conditions of aeration rate and rotation speed, 250 rpm, 1 vvm and 250 rpm and 2 vvm and 500 rpm. The yeast *K.marxianus* CBS 6556 can produce 0.19 gL<sup>-1</sup> of 2-phenylethanol, showed be the best producer. In the grape must, the yeast made 0.51 gL<sup>-1</sup> of 2-phenylethanol (60 % higher production). Higher yields were found with 37 °C, pH 7.0 and 3.0 gL<sup>-1</sup> of L-phenylalanine. The aeration rate of 1 vvm and a speed rotation of 250 rpm was showed an the best conditions to the bioconversion, during this cultivations, *K.marxianus* CBS 6556 was able to produce 0.77 gL<sup>-1</sup>, and yields of 0.62 gg<sup>-1</sup> of 2-phenylethanol.

<sup>1</sup> Master of Science Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (104p.). March, 2006.

## SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO .....	12
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	14
2.1- Aroma nos alimentos .....	14
2.2- Aromas naturais e sintéticos: .....	16
2.3- Compostos de aroma.....	19
2.4- Álcoois superiores .....	20
2.4.1- Fatores importantes na produção de álcoois superiores .....	22
2.4.1.1- Fonte de nitrogênio.....	23
2.4.1.2- Fonte de carbonos.....	23
2.4.1.3- Temperatura.....	24
2.4.1.4- pH .....	24
2.4.1.5- Aeração.....	24
2.4.2- Importância aromática dos álcoois superiores.....	25
2.5- Álcool fenilético (2-feniletanol).....	26
2.5.1- Propriedades físicas e químicas do 2-FE.....	26
2.5.2- Fontes naturais.....	28
2.5.3- Síntese química.....	30
2.5.3.1- Reação de Friedel-Craft.....	31
2.5.3.2- Síntese de Grignard .....	31
2.5.3.3- Redução de óxido de estireno.....	31
2.5.4- 2-FE na flor de rosa .....	30

2.5.5-	Rotas bioquímicas.....	32
2.5.5.1-	Via de Ehrlich.....	32
2.5.5.2-	Síntese <i>de novo</i> .....	34
2.5.6-	Utilização industrial de 2-FE.....	27
2.6-	Microrganismos produtores de 2-feniletanol.....	35
2.6.1-	Fungos filamentosos.....	36
2.6.2-	Leveduras.....	37
2.6.2.1-	<i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	37
2.7-	Composição do mosto de uva.....	39
2.8-	Planejamento experimental e metodologia de superfície de resposta	42
3-	MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
3.1-	Microrganismos.....	45
3.2-	Meio para manutenção das cepas.....	46
3.3-	Seleção de leveduras produtoras de 2-FE.....	47
3.4-	Meio de cultura.....	48
3.5-	Curva de crescimento em mosto de uva.....	48
3.6-	Planejamento Experimental.....	50
3.7-	Cultivo em biorreatores.....	53
3.7.1-	Meio e condições de cultivo.....	53
3.7.2-	Aeração e agitação.....	54
3.8-	Procedimentos analíticos.....	55
3.8.1-	Açúcares redutores.....	55
3.8.2-	Biomassa.....	56

3.8.2.1-	Peso seco .....	56
3.8.2.2-	Densidade ótica (DO).....	56
3.8.3-	Viabilidade celular.....	57
3.8.4-	2-feniletanol.....	58
3.8.5-	Etanol.....	58
3.8.6-	L-fenilalanina.....	59
4-	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	60
4.1-	Seleção de leveduras.....	60
4.2-	Utilização de mosto de uva.....	62
4.2.1-	Consumo de L-PHE e produção de 2-FE .....	64
4.3-	Otimização da produção de 2-FE .....	66
4.3.1-	Escolha do limite das variáveis independentes.....	68
4.3.2-	Análise estatística do modelo .....	68
4.3.3-	Efeito das variáveis independentes.....	71
4.3.4-	Otimização da produção de 2-FE .....	73
4.3.5-	Influência do pH na bioconversão .....	75
4.3.6-	Influência da temperatura sobre a produção de 2-FE .....	76
4.3.7-	Papel da concentração de L-PHE na bioconversão .....	77
4.4-	Experimentos em biorreatores .....	79
4.4.1-	Produção de aroma em biorreatores .....	79
4.4.2-	Produção de 2-FE em condições fermentativas.....	80
4.4.3-	Produção de 2-FE sob regime de aeração.....	83
4.4.3.1-	Experimento com 1 vvm e 250 rpm .....	83

4.4.3.2-	Experimento com 2 vvm e 500 rpm .....	86
4.4.4-	Produção de 2-FE em diferentes condições de aeração e agitação.....	88
5-	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....	91
6-	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	93

## RELAÇÃO DE TABELAS

<b>TABELA 1:</b> Propriedades físicas e químicas do 2-feniletanol .....	29
<b>TABELA 2:</b> Parâmetros enológicos do mosto utilizado no trabalho.....	49
<b>TABELA 3:</b> Variáveis e níveis utilizados para a elaboração do Planejamento Experimental para o experimento com mosto de uva.....	50
<b>TABELA 4:</b> Experimentos aplicados no planejamento fatorial completo para os experimentos com mosto de uva.....	51
<b>TABELA 5:</b> Consumo de L-PHE e bioconversão em 2-FE durante os experimentos com mosto de uva. ....	65
<b>TABELA 6:</b> Dados experimentais para a produção de 2-FE com o planejamento fatorial completo com mosto de uva .....	67
<b>TABELA 7:</b> Análise da variância (ANOVA) para o modelo de regressão. ....	69
<b>TABELA 8:</b> Coeficientes estimados para o modelo estatístico.....	71

## RELAÇÃO DE FIGURAS

<b>FIGURA 1:</b> Definições e interações entre “flavor”, aroma, paladar e sensações de tato. .....	15
<b>FIGURA 2:</b> Fórmula espacial e centesimal do álcool 2-feniletílico.....	27
<b>FIGURA 3:</b> Via de Ehrlich para a produção de 2-FE por microrganismos.....	34
<b>FIGURA 4:</b> Produção de 2-FE por leveduras nos experimentos de seleção em meio semisintético.. ..	61
<b>FIGURA 5:</b> Cinética de crescimento e produção de metabólitos por <i>K.marxianus</i> CBS 6556 no mosto de uva em agitador orbital.....	64
<b>FIGURA 6:</b> Curvas de contorno para o efeito do pH e da temperatura na produção de 2-FE por <i>K.marxianus</i> em mosto de uva.....	73
<b>FIGURA 7:</b> Curvas de superfície de resposta do efeito do pH e da concentração de L-PHE na bioconversão.....	74
<b>FIGURA 8:</b> Curva de contorno do efeito da temperatura e da concentração de L-PHE na formação de 2-FE por <i>K.maxianus</i> em mosto de uva. ....	75
<b>FIGURA 9:</b> Produção de 2-FE a partir de L-PHE em biorreator da sem aeração, somente com agitação.....	81
<b>FIGURA 10:</b> Produção de 2-FE e formação de biomassa por <i>K.marxianus</i> em mosto de uva e em biorreatores com 1vvm de aeração e 250 rpm de agitação.....	84
<b>FIGURA 11:</b> Produção de 2-FE e formação de biomassa por <i>K.marxianus</i> em mosto de uva e em biorreatores com 2vvm de aeração e 500 rpm de agitação.....	87
<b>FIGURA 12:</b> Produção de 2-FE nos diferentes sistemas de aeração e agitação testados. .....	89

## RELAÇÃO DE ABREVIATURAS

2-FE	2-feniletanol
L-PHE	L-fenilalanina
$Y_{2\text{-FE/L-PHE}}$	Fator de conversão de 2-feniletanol a partir de L-fenilalanina( $\text{gg}^{-1}$ )
$Y_{X/S}$	Fator de conversão de biomassa ( $\text{gg}^{-1}$ )
$k_{\text{ja}}$	Coefficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $\text{h}^{-1}$ )
$q_{\text{O}_2}$	Coefficiente de consumo de oxigênio ( $\text{mgO}_2\text{g}^{-1}$ )
$\text{DO}_{600\text{nm}}$	Densidade óptica num comprimento de onda de 600 nm

## 1- INTRODUÇÃO

Aromas naturais podem ser definidos como produtos que são convertidos por células livres ou enzimas isoladas. Recentemente, através da preferência dos consumidores por produtos naturais, estimulou-se o desenvolvimento de pesquisas utilizando processos biotecnológicos envolvendo microrganismos. Entretanto, a produção de aromas por microrganismos é muito dependente de vários fatores químicos, físicos e biológicos.

Os fungos podem produzir, industrialmente, uma infinidade de metabólitos aromáticos durante o processo fermentativo. Álcoois superiores são formados em grandes quantidades durante o processo de fermentação alcoólica, tanto em leveduras quanto em fungos filamentosos. A sua presença é considerada essencial para influenciar a qualidade organoléptica de muitos produtos alimentícios obtidos por fermentação.

Dentre estes compostos, os que possuem aromas florais possuem maior interesse industrial. Como exemplo disto, podemos citar o 2-feniletanol, que é um álcool superior aromático que possui odor característico de rosas. Este álcool aromático é um importante material para a indústria de perfumes e fragrâncias, porém também é utilizado na indústria de alimentos, mas em menores volumes.

Naturalmente, é encontrado em óleos essenciais de muitas flores, mas principalmente, no óleo essencial de rosas, onde se apresenta em elevadas concentrações. Pode ser obtido através de extrações com solventes a partir das pétalas de rosas, porém seu preço é muito elevado e inviabiliza sua utilização pela indústria.

Sendo assim, a maioria do 2-feniletanol utilizado é produzida por via química, através de reações catalíticas que utilizam compostos tóxicos e poluentes, e sua pureza nem sempre é elevada. O preço é um fator crucial e importante para distinguir os dois produtos. Além disso, a obtenção de 2-FE utilizando vias biotecnológicas é uma maneira de diminuir e/ou minimizar a presença de impurezas.

A produção de 2-feniletanol é aumentada quando em cultivos de leveduras são enriquecidos com L-fenilalanina, um isômero do aminoácido fenilalanina, da família dos aminoácidos aromáticos. Dentre os diferentes produtores, as espécies de leveduras *Kluyveromyces marxianus* possuem várias vantagens. Além de sua aplicação em processos industriais, não são microrganismos patogênicos e apresentam altos rendimentos.

De maneira geral, a produção de 2-feniletanol depende principalmente do meio de cultura e do microrganismo utilizado no processo.

O objetivo do trabalho foi buscar uma levedura capaz de produzir 2-feniletanol com bons resultados através da bioconversão a partir de L-fenilalanina, utilizando-se o mosto de uva como meio para aumentar a produção de 2-feniletanol e posterior otimização das condições de cultivo, utilizando-se um planejamento fatorial completo com três variáveis independentes. Obtidas as condições ótimas para a bioconversão, o cultivo foi realizado em biorreatores, testando-se as condições de aeração e agitação favoráveis ao processo.

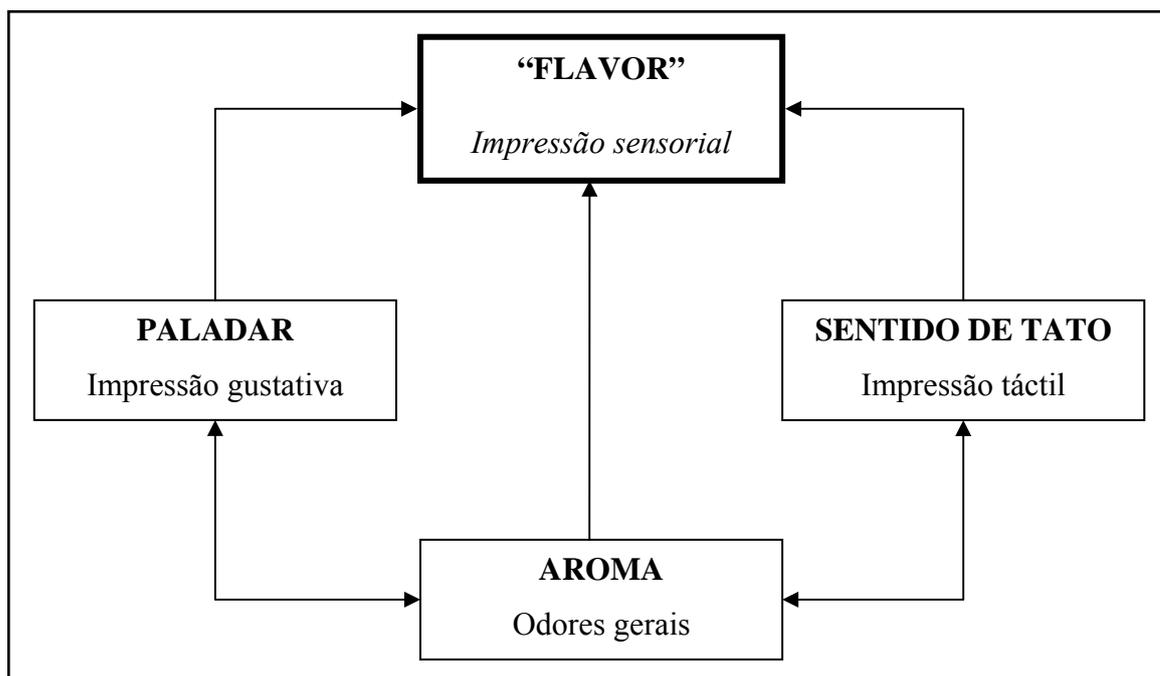
## **2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1- Aroma nos alimentos**

O termo “flavor”, ainda não está precisamente definido, porém vem sendo utilizado para designar tanto percepções no paladar, quanto, estímulos olfativos, através do nariz e todos os órgãos do sistema olfativo humano (Webb, 1967). A FIGURA 1 exemplifica as interações ocorridas para formar o “flavor” de muitos produtos.

Em alguns alimentos, principalmente naqueles provenientes de processos fermentativos, o aroma e também o “flavor”, podem ser definidos por uma soma de sensações complexas. Esta complexidade é resultado do sabor e odor característicos dos alimentos. Considera-se então, que o aroma percebido através das sensações olfativas se mistura às percepções do paladar.

No caso específico do vinho, um aroma agradável se dá pela harmonia existente no balanço entre a acidez, o gosto doce e salgado, e também, com o amargor (Bayonove, 2000). Mas ainda há a influência da adstringência e do conteúdo alcoólico do vinho, ambas sensações percebidas através do tato (Bidan, 1975).



**FIGURA 1:** Definições e interações entre “flavor”, aroma, paladar e sensações de tato (Steinhart *et al.*, 2000).

O conteúdo aromático de certos produtos é originado através da matéria-prima, ou seja, no substrato inicial é que se encontram as principais moléculas de aroma que o caracterizam. De maneira geral, podemos encontrar na matéria-prima, aroma na forma livre, ou então, na forma de precursores aromáticos. Durante o processamento de alimentos, uma grande parcela dos aromas presentes na matéria-prima é liberada. Ou então, uma grande contribuição é dada pelo processo de fermentação dos mesmos, seja na transformação de precursores aromáticos ou outros componentes essenciais do substrato.

Um grupo importante de compostos de aroma permanece inalterado durante o processamento e/ou fermentação da matéria-prima, sendo responsável pela principal parcela do aroma nos alimentos (Webb, 1967).

Um segundo grupo, é dado por compostos de aroma presentes na matéria-prima, porém estes sofrem alterações durante a fermentação e/ou processamento. Um terceiro grupo são especificamente produzidos por leveduras durante o processo de fermentação e posterior metabolismo dos açúcares ou outros componentes da matéria-prima, como por exemplo, os precursores de aroma. A produção de aromas por leveduras pode ser significativamente afetada pelas técnicas de produção, a cepa de levedura utilizada, a adição de nutrientes e a temperatura de fermentação (Hernández-Orte *et al.*, 2005).

Sendo assim, o aroma dos alimentos é dado por uma mistura de componentes (Webb, 1967). Inúmeros compostos aromáticos são encontrados em pequenas quantidades, originando complexidade e contribuindo para a qualidade do aroma total. Desta forma, o aroma é formado por vários componentes voláteis, tomando como partes do aroma e sabor de produtos alimentícios, tais como, vinho, cerveja, queijos e demais alimentos obtidos por fermentação (Gatfield, 1988).

## **2.2- Aromas naturais e sintéticos:**

De maneira geral, as moléculas aromáticas podem ser classificadas devido à sua origem, em aromas naturais e aromas sintéticos. Schrader *et al.* (2004) afirma que “flavors” naturais se refere a produtos derivados de bioprocessos iniciados por substratos naturais, os quais já foram identificados em plantas ou outras fontes naturais. A partir desta última década, houve um substancial interesse científico e econômico na utilização da biotecnologia para a produção de compostos voláteis de aroma (Feron *et al.*, 1996).

Este incremento na produção é decorrente do aumento na demanda por aromas naturais, forçando os produtores a buscarem rotas alternativas para a obtenção destes compostos. As rotas de síntese química convencionais ou o isolamento a partir de plantas, ainda são viáveis, porém a geração de aromas por biotecnologia é altamente atrativa (Krings e Berger, 1998). A partir de 1970, inúmeras pesquisas foram direcionadas na síntese microbiana e/ou enzimática de fragrâncias e aromas químicos (Rabenhorst, 2000). Na Europa, EUA e Brasil, aromas naturais são claramente definidos legalmente.

Na Europa (Diretiva 88/388/EEC), o termo “natural” é definido por uma “substância flavorizante, a qual é obtida por apropriados processos físicos (incluindo destilação e extração com solventes) ou processos enzimáticos ou microbiológicos a partir de material de origem vegetal ou animal, tanto na forma de matéria-prima, quanto no estado após o processamento para utilização no consumo humano através de tradicionais processos de obtenção de alimentos (incluindo secagem, torrefação e fermentação).”.

Nos EUA (CFR de 1993), “o termo *flavor natural* ou *flavorizante natural* é dado por óleos essenciais ou oleoresinas, essências ou extratos, hidrolisados protéicos, resíduos de destilação, ou qualquer produto obtido por torrefação, aquecimento ou lise com enzimas, o qual contenha os constituintes de aroma derivado de especiarias, suco de frutas, vegetais ou suco de vegetais, leveduras comestíveis, ervas, árvores (casca, brotos, raízes, folhas ou similares), carnes, frutos do mar, aves domésticas, ovos, laticínios ou produtos da fermentação que possuam significância tanto nutricional ou flavorizante no alimento.”.

No Brasil (portaria da ANVISA nº. 645 de 1997), “aromatizantes ou aromas naturais são obtidos exclusivamente mediante métodos físicos, microbiológicos ou enzimáticos, a partir de matérias-primas aromatizantes/aromas naturais. Entende-se por matérias-primas aromatizantes/aromas naturais os produtos de origem animal ou vegetal normalmente utilizados na alimentação humana, que contenham substâncias odoríferas e/ou sápidas, seja em seu estado natural ou após um tratamento adequado (torrefação, cocção, fermentação, enriquecimento, enzimáticos, etc.). Os aromatizantes/aromas naturais compreendem óleos essenciais, extratos, bálsamos, oleoresinas e oleogomaresinas e substâncias aromatizantes/aromas isolados.”.

A produção de aromas naturais durante fermentações microbianas é uma tecnologia competitiva para obter moléculas químicas que são isoladas de extratos de plantas, óleos essenciais ou outras fontes (Rabenhorst, 2000). Muitos microrganismos são capazes de produzir “flavors” por meio da fermentação que é iniciada por nutrientes simples, tais como, açúcares e aminoácidos (Janssens *et al.*, 1992).

A fermentação de alimentos é resultado da atividade enzimática de culturas microbianas, a qual modifica e melhora as características aromáticas dos produtos (Feron *et al.*, 1996). A biocatálise compreende o uso de enzimas isoladas ou através de culturas microbianas complexas sobre substratos naturais, que podem ter interesse industrial (Schrader *et al.*, 2004). Aromas são considerados compostos bioativos e com características altamente quirais, portanto o uso da biocatálise para a sua geração é indispensável (Krings e Berger, 1998).

A bioconversão ou biotransformação pode ser utilizada por diversos processos microbianos ou enzimáticos para originarem compostos de aroma. A bioconversão é muito barata, facilmente desenvolvida por microrganismos através do

uso de precursores naturais, os quais são convertidos em moléculas altamente aromáticas (Kring e Berger, 1998). Iniciada através de substratos específicos, diferentes reações como oxidações, reduções, hidrólises, reações de desidratação, formação de novas ligações C—C e várias reações de degradação podem ser realizadas por microrganismos durante a biotransformação de moléculas de aroma naturais (Janssens *et al.*, 1992).

Como exemplo, a vanilina composto característico de óleos essenciais de vagens de baunilha, pode ser obtida a partir de guaiacol ou lignina (Rabenhorst, 2000). Benzaldeído, composto com aroma característico de cereja e amêndoas, pode ser obtido através do metabolismo da L-fenilalanina (Kring e Berger, 1998).  $\gamma$ -decalactona, um compostos que possui aroma e gosto de pêssgo, pode ser obtido pela bioconversão a partir do ácido ricinoléico (Schrader, *et al.*, 2004).

### **2.3- Compostos de aroma**

O aroma de alimentos e bebidas fermentadas pode ser considerado como muito complexo, pois é o resultado de uma grande seqüência de reações biológicas e bioquímicas sobre a matéria-prima. Bayonove *et al.* (2000) afirma que o aroma do vinho é composto por um elevado número de constituintes voláteis (mais de 500 já identificados), cujas concentrações vão desde algumas nanogramas a alguns miligramas por litro.

Dentre os compostos aromáticos, os ésteres possuem uma crucial importância nas sensações agradáveis do aroma (Torrea *et al.*, 2003). Os níveis de ácido isobutírico e isovalérico e de seus ésteres, dos álcoois isobutanol e isoamílico, de 2-

feniletanol e seu éster acetato, de acetato de isoamila e de outros ésteres são encontrados em quantidades muito variadas em alimentos obtidos por fermentação (Hernández-Orte *et al.*, 2002).

Os ésteres acetatos possuem um aroma frutado (Torrea *et al.*, 2003). Assim sendo, os ésteres são considerados compostos de aroma extremamente importantes na qualidade organoléptica de inúmeros produtos.

Lactonas geralmente possuem aroma agradável e são potentes materiais aromatizantes, encontradas em frutas, vegetais, nozes, carnes, laticínios e produtos de padaria (Gatfield, 1988). Ácidos voláteis pouco contribuem para a totalidade do aroma de alimentos fermentados. Dentre estes, destaca-se o ácido acético (produto de deterioração em alimentos), o butírico, o capríco, o amílico e o isovalérico. Os álcoois superiores são responsáveis pela qualidade do aroma de muitos produtos.

#### **2.4- Álcoois superiores**

São compostos produzidos pelas leveduras durante o metabolismo fermentativo, sendo representados por inúmeros compostos. São formados por álcoois de cadeia simples ou ramificada, com número de carbonos maior que dois e com ponto de ebulição superior ao do etanol (Bidan, 1975).

A formação de álcoois superiores e ésteres durante a fermentação alcoólica é relacionada com a espécie de levedura envolvida (Cabrera *et al.*, 1988). Álcoois superiores podem ser produzidos diretamente a partir do metabolismo glicolítico dos açúcares, e também através do catabolismo de aminoácidos (Bertolini *et al.*, 1996). A produção destes álcoois parece ser uma propriedade geral das leveduras, embora as

quantidades produzidas variem não somente de acordo com as condições de cultivo, mas também, com relação ao gênero, espécie e cepa de levedura (Giudici *et al.*, 1990).

A formação de álcoois superiores se dá a partir de substâncias nitrogenadas. Ehrlich (1906 -1912) foi o primeiro a demonstrar que estes álcoois se formam a partir de aminoácidos correspondentes por meio da ação de enzimas (Bidan, 1975). Os mais importantes álcoois superiores são: o n-propanol derivado da treonina; o iso-butanol (2-metil-propanol) derivado da valina; o álcool isoamílico (3-metil-butanol) derivado da leucina e o álcool amílico ativo (2-metil-butanol) derivado da isoleucina (Zambonelli, 1999).

A adição do aminoácido correspondente ao meio de cultura antes da fermentação leva a um aumento nos teores em álcoois superiores (Bidan, 1975). A influência da fonte nitrogenada é muito importante para a formação de álcoois superiores (Bayonove *et al.*, 2000).

Podem ser considerados como produtos secundários naturais da fermentação alcoólica, e são importantes constituintes de bebidas alcoólicas (Giudici *et al.*, 1990). O mecanismo de formação de álcoois superiores ocorre através da via de Ehrlich e compreende a ação de enzimas e de co-enzimas. A utilização de fontes de nitrogênio secundárias pelas leveduras requer a síntese de enzimas catabólicas específicas e permeases (Cruz *et al.*, 2002).

Alternativamente, as leveduras podem formar pequenas quantidades destes compostos através do metabolismo dos açúcares. Quantidades significativas de álcoois superiores são formadas ao curso da fermentação alcoólica da levedura mesmo num meio sem aminoácidos (Bidan, 1975). Sendo assim, a formação de álcoois superiores pode ocorrer a partir da concentração de ácido pirúvico no interior da célula da levedura

(Bidan, 1975; Bertolini *et al.*, 1996 e Giudici *et al.*, 1990). Sendo assim, o ácido pirúvico pode sofrer reações de redução e descarboxilação, formando diferentes álcoois superiores; esta rota é regulada pela quantidade de ácidos cetônicos no interior da célula da levedura.

Webb (1967), afirma que o hexanol se forma a partir da redução do ácido capríco ao curso da fermentação alcoólica. O 2-feniletanol é sintetizado pela levedura tanto em presença quanto na ausência de fenilalanina, seu precursor natural (Bidan, 1975). Neste caso, a quantidade de álcoois formada é proporcional aos açúcares assimilados (Bidan 1975). Outra rota utilizada pela levedura se dá através do conteúdo de ácidos cetônicos presente na célula, os quais são gerados pela biossíntese de aminoácidos na levedura. Os mais importantes são: o ácido pirúvico, o ácido  $\alpha$ -cetolático, o ácido  $\alpha$ -cetobutírico, o ácido  $\alpha$ -cetoisovalérico, o ácido  $\alpha$ -cetoisocaprílico, o ácido  $\alpha$ -ceto- $\beta$ -metil-valérico e o ácido cetohidroxibutírico (Bidan, 1975).

Porém, o álcool isoamílico e o álcool feniletílico são encontrados em quantidades importantes durante a fermentação dos açúcares (Webb, 1967).

#### **2.4.1- Fatores importantes na produção de álcoois superiores**

A levedura desempenha um papel fundamental na formação de álcoois superiores. Porém, o meio de cultura e as condições de cultivo são importantes fatores para se obter um alto rendimento. Os níveis de álcoois superiores formados durante a fermentação do suco da uva dependem da temperatura de fermentação, da cepa de levedura, dos nutrientes nitrogenados e das condições de aeração (Ough e Bell, 1980).

#### **2.4.1.1- Fonte de nitrogênio**

A complexidade da fonte de nitrogênio pode influenciar o metabolismo da levedura e conseqüentemente, a quantidade de produtos secundários da fermentação alcoólica. A produção de álcoois superiores se dá em função dos teores de aminoácidos e de amônio do meio (Bidan, 1975). A adição de sais de amônio no meio de cultura gera uma diminuição na formação de álcoois superiores, porém, um meio sem sais de amônio propicia uma maior formação de álcoois superiores (Bidan, 1975).

A adição de aminoácidos faz com que haja um aumento na produção de vários álcoois superiores devido à ativação da via de Erhlich (Giudici *et al.*, 1990). Existe uma forte correlação entre o espectro de aminoácidos no mosto e nos níveis absolutos de álcoois superiores no vinho (Hernández-Orte, *et al.*, 2002).

A produção de álcoois superiores é potencializada com o aumento na concentração de nitrogênio e glicose no meio e com a taxa de aeração (Bidan, 1975).

#### **2.4.1.2- Fontes de carbono**

Não existe uma forte correlação entre a quantidade de açúcares no meio e a totalidade de álcoois superiores formada. Porém, para a mesma concentração de nitrogênio no meio e diferentes quantidades de açúcares, há um aumento na produção de álcoois superiores em níveis maiores de açúcares (Bidan, 1975). De maneira geral, a natureza da fonte carbono gera uma forte influencia no metabolismo microbiano. Estudos morfológicos revelam a predominância da formas filamentosas em cepas de *K.marxianus* quando cultivadas com etanol, glicerol ou maltose como fonte de carbonos (Fabre *et al.*, 1998).

A natureza da fonte de carbono pode ter um papel importante na formação de álcoois superiores quando num meio pobre em nitrogênio (Bidan, 1975). A adição de ácido málico pode aumentar a taxa de formação de álcoois superiores (Webb, 1967).

#### **2.4.1.3- Temperatura**

Temperaturas baixas causam uma menor produção de álcoois superiores. A produção ótima de álcoois superiores se dá a uma temperatura média de 25 °C (Bidan, 1975). A diferentes temperaturas, a maior taxa de produção de álcoois superiores ocorre a 20 °C, mais que em temperaturas de 15 ou 25 °C, 30 ou 35 °C (Zambonelli, 1999).

#### **2.4.1.4- pH**

De maneira geral, se formam mais álcoois superiores em pH ligeiramente ácidos, como pH 4,5 que em pH ácido ou básico, como pH 2,6 ou pH 6,0, respectivamente (Bidan, 1975)

#### **2.4.1.5- Aeração**

A taxa de oxigênio disponível para a levedura desempenha uma importante influencia sobre o seu metabolismo. Durante o processo de fermentação dos vinhos, ou seja, em condições anaeróbias, há uma maior produção de álcoois superiores, devido ao metabolismo fermentativo da levedura. Porém uma aeração durante a fermentação aumenta a quantidade de álcoois superiores formados, principalmente o isobutanol (Bidan, 1975).

Estas variações ocorrem, pois não são os mesmos álcoois superiores que são formados em condições aeróbias e anaeróbias (Bidan, 1975). Em aerobiose, os álcoois isobutírico e isoamílico são formados em grandes quantidades (Crowell e Guymon, 1963).

#### 2.4.2- Importância aromática dos álcoois superiores

Os álcoois superiores, assim como os ésteres, são quantitativamente dominantes no aroma dos vinhos e são importantes nas propriedades sensoriais e qualidade dos vinhos (Gil *et al.*, 1996). Além disso, os álcoois superiores influenciam grandemente o aroma e sabor de vinhos e outros alimentos obtidos por fermentação (Bidan, 1975).

Os álcoois superiores, em concentrações moderadas ( $<0,3 \text{ gL}^{-1}$ ) formam uma complexidade desejada ao aroma, porém em altas concentrações, podem deteriorar o aroma em sua sensação global (Torrea *et al.*, 2003).

Os álcoois superiores são responsáveis, principalmente, pelas notas florais e frutadas do aroma. Como exemplos, o álcool isoamílico (notas de banana), o álcool fenilético (notas de rosas e jasmim), o álcool benzílico (notas de amêndoas e nozes). Também, estes compostos são reconhecidos por seu forte e pungente aroma (Torrea *et al.*, 2003).

Dentre os álcoois superiores formados durante o processo de fermentação, o 2-feniletanol possui um forte impacto no aroma final. De maneira geral, durante o processo de fermentação dos vinhos, sempre ocorre a produção deste composto, porém em maior ou menor proporção dependendo da cepa utilizada, das condições de fermentação e da composição nitrogenada da matéria-prima. Este composto tem um agradável odor de rosas e pode ser um atributo positivo no aroma total a baixas concentrações (Bertolini *et al.*, 1996).

## 2.5- Álcool feniletílico (2-feniletanol)

Dentre o grupo dos álcoois superiores, o 2-FE é considerado o mais comercialmente importante componente de aroma (Fabre *et al.*, 1999). 2-FE é uma importante molécula de aroma em certas frutas e bebidas, mas também na fragrância de rosas (Vandamme e Soetaert, 2002). O 2-FE é um álcool superior aromático com um odor característico de rosas; a fragrância de rosas é altamente desejada e popular (Etschmann *et al.*, 2002). Huang *et al.* (2001), caracteriza o 2-FE com uma delicada fragrância de pétalas de rosas.

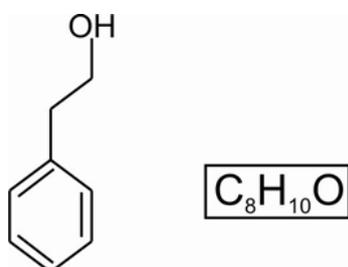
Desta forma, este composto possui um considerável interesse industrial (Fabre *et al.*, 1999). Principalmente, é adicionado para modificar certas composições de aromas, especialmente em formulações de notas frutadas, onde contribui organolépticamente (Stark *et al.*, 2003a).

### 2.5.1- Propriedades físicas e químicas do 2-FE

Como a maioria dos compostos químicos, possui várias denominações usuais e oficiais. Pode ser conhecido como álcool feniletílico ou 2-feniletanol, álcool 2-feniletílico, álcool  $\beta$ -feniletílico, benzil carbinol,  $\beta$ -hidroxi-etil-benzeno. A FIGURA 2 mostra a fórmula espacial e centesimal do 2-FE, o qual apresenta oito átomos de carbono.

Pode ser percebido pelo olfato humano em concentrações de 12 a 24  $\text{ngL}^{-1}$ , no ar e 1000  $\mu\text{gL}^{-1}$  (Etschmann *et al.*, 2002) ou 125 ppm (Vandamme e Soetaert, 2002) em solução aquosa.

Resultados de testes, tanto *in vivo*, quanto *in vitro*, indicam que o 2-FE e compostos correlatos, podem ser utilizados como substâncias flavorizantes, pois não são mutagênicos e nem tóxicos (Adams *et al.*, 2005). Desta forma, estes compostos estão incluídos no catálogo FEMA-GRAS, de compostos seguros para serem utilizados em alimentos (O 2-FE está cadastrado sob o número 2858) (Adamas *et al.*, 2005)



**FIGURA 2:** Fórmula espacial e centesimal do álcool 2-feniletílico.

Como todos os álcoois superiores, o álcool 2-feniletílico apresenta mais que dois átomos de carbono e alto peso molecular (122) e ponto de ebulição elevado, como pode ser visto na TABELA 1.

### 2.5.2- Utilização industrial de 2-FE

Como a grande maioria de substâncias de aroma, é utilizado como uma molécula flavorizante na formulação de muitos alimentos. Além disso, pode ser amplamente utilizado na composição de essências, perfumes ou fragrâncias.

O 2-FE é uma fragrância muito importante usada na indústria de perfumaria e cosméticos, mas também, é amplamente usado em alimentos por sua nota

organoléptica (Lomascolo *et al.*, 2001). Sua principal aplicação é na indústria de fragrâncias e em menores volumes, na indústria de alimentos para aumentar o sabor e aroma de bebidas leves, bombons, biscoitos e outros alimentos (Etschmann *et al.*, 2003). Além disso, é considerado como o segundo álcool mais usado em perfumaria e em cosméticos (Etschmann *et al.*, 2004).

Na indústria de alimentos, é amplamente utilizado para modificar certas composições de aroma na matéria-prima, tais como, formulas frutadas, sorvetes, bombons, pudins e gomas de mascar (Huang *et al.*, 2001). O álcool feniletílico apresenta interessante característica organoléptica influenciando a qualidade do vinho, bebidas destiladas ou outros alimentos fermentados (Fabre *et al.*, 1998).

### **2.5.3- Fontes naturais**

O 2-feniletanol pode ser encontrado em inúmeros produtos obtidos por fermentação, principalmente alimentos. Como por exemplo, o 2-FE é considerado como um composto aromático característicos de vinhos tintos produzidos na região vitivinícola de Baga, em Portugal (Rocha *et al.*, 2004). Pode ser encontrado em duas formas principais: na forma livre, apresentando as propriedades aromáticas características, ou então, na forma de conjugados ligados por pontes glicosídicas, portanto, sem notas odoríferas.

A sua principal fonte, é o óleo essencial de rosas. O óleo essencial de rosas pode, dependendo da variedade, conter mais de 60% de 2-FE (Schradler *et al.*, 2004). Este álcool pode ser naturalmente encontrado em óleos essenciais de flores e plantas, tais como jasmims, jacintos, narcisos, pinho *Alep* (Lomascolo *et al.*, 2001) e lírios,

porém em muitos casos, as concentrações são muito baixas (Etschmann *et al.*, 2002). O 2-FE natural (extraído de rosas ou outros óleos essenciais) é muito caro, alternativamente pode ser obtido a partir de resíduos de destilação (Savina *et al.*, 1999).

**TABELA 1:** Propriedades físicas e químicas do 2-feniletanol (Etschmann *et al.*, 2002).

<i>Propriedade</i>	<i>Descrição</i>
Coloração	Não apresenta cor
Ponto de ebulição (101,3 KPa)	219,8 °C
Ponto de fusão	-27 °C
Peso molecular	122
Densidade a 20 °C	1,0202
Índice de refração a 20 °C	1,5325
Solubilidade	19 gL <sup>-1</sup> em água a 20 °C, solúvel em álcoois, ésteres, aldeídos, benzil benzoato, óleo mineral

Além disso, naturalmente, pode ser encontrado em alimentos fermentados e em muitos óleos essenciais (Serra *et al.*, 2005).

A sua obtenção se dá principalmente pela destilação de pétalas de rosas, a qual requer uma grande quantidade de rosas cultivadas, o que reflete no custo da molécula de aroma obtida (Savina *et al.*, 1999).

#### 2.5.4- 2-FE na flor de rosa

2-FE livre foi detectado em níveis de traços no início da abertura do botão da flor de rosa (*Rosa damascena*), onde a maior parte é encontrada na forma de  $\beta$ -D-glicopiranosídeos (Watanabe *et al.*, 2002). Além disso, um ciclo rítmico de emissão de voláteis é encontrado em muitas espécies de rosas (Picone *et al.*, 2004). A emissão de aromas está correlacionada com a atração de insetos polinizadores e/ou o afastamento de herbívoros (Picone *et al.*, 2004).

Durante a separação das pétalas, a atividade de  $\beta$ -glicosidasas aumenta enormemente, o que contribui para a liberação de 2-FE que estava na forma de glicopiranosídeos (não volátil). Estas enzimas atuam sobre 2-feniletil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo, liberando diretamente 2-FE (Watanabe *et al.*, 2002). Nos tecidos da planta, a L-PHE é transformada em feniletilamina, ácido fenilpirúvico ou ácido *trans*-cinâmico, levando a formação de 2-FE ou então, 2-feniletil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo (Watanabe *et al.*, 2002). A emissão rítmica de 2-FE pode ser influenciada pela luz, temperatura e outros fatores endógenos (Picone *et al.*, 2004).

#### 2.5.5- Síntese química

Devido ao alto custo, o álcool fenilético é gerado quimicamente, minimizando os custos de sua utilização pela indústria. Quase 80% de aromas e fragrâncias consumidas no mundo todo são produzidas quimicamente (Krings e Berger, 1998). Anualmente, em torno de 7000ton de 2-FE são produzidas através da síntese química (Etschmann *et al.*, 2003).

Pode ser sintetizado a partir do tolueno, benzeno, estireno ou metilfenilacetato (Serpe *et al.*, 2003). Estes compostos utilizados nestas reações são carcinogênicos e/ou perigosos à saúde humana e ao meio-ambiente (Etschmann *et al.*, 2003). Várias reações catalíticas são utilizadas na síntese de 2-FE.

#### **2.5.5.1- Reação de Friedel-Craft**

É uma reação realizada entre o óxido de etileno e o benzeno na presença de quantidades molares de cloreto de alumínio, a adição do cloreto de alumínio gera uma hidrólise, liberando assim 2-FE. A maior desvantagem deste processo, é que os catalisadores são corrosivos, além disso, são tóxicos ao ambiente e a purificação do produto é dificultada (Kirm *et al.*, 2005).

#### **2.5.5.2- Síntese de Grignard**

É uma reação iniciada com cloro benzeno, que é convertido até cloreto de fenilmagnésio, que reage com óxido de etileno e origina cloreto de feniletóximagnésio que é decomposto em presença de ácido sulfúrico formando 2-FE.

#### **2.5.5.3- Redução de óxido de estireno**

O óxido de estireno é hidrogenado a baixas temperaturas com níquel de Raney como catalisador e baixas concentrações de hidróxido de sódio. O 2-FE é produzido como um subproduto da formação de óxido de propileno, produto da reação de óxido de estireno e hidróxido de sódio.

Em todos os processos químicos, a purificação do produto é o maior problema (Etschmann *et al.*, 2002).

### 2.5.6- Rotas bioquímicas

De maneira geral, inúmeras leveduras são capazes de produzir 2-FE durante seu metabolismo (Etschmann *et al.*, 2002). O álcool feniletílico pode ser obtido através de rotas metabólicas usando glicose como fonte de carbono, ou então pela adição de L-fenilalanina, seu precursor natural (Wittmann *et al.*, 2002). Sendo assim, se obtém 2-FE através da bioconversão de L-PHE ou então, pela síntese *de novo* a partir do catabolismo da glicose.

#### 2.5.6.1- Via de Ehrlich

A bioconversão a partir da L-PHE se dá através da rota de Ehrlich (Stark *et al.*, 2002). Ehrlich (1907) demonstrou que vários álcoois superiores procediam da degradação metabólica dos aminoácidos, mediante um mecanismo que engloba reações subseqüentes de desaminação, descarboxilação e redução ou deshidrogenação (Lepe e Leal, 1992). Os aminoácidos executam o papel principal de precursores destes álcoois em vários produtos obtidos por fermentação, como exemplo, a leucina pode transformar-se em álcool isoamílico (odor de banana), valina é transformada em álcool isobutílico. Dependendo da composição em aminoácidos, diferentes álcoois superiores podem ser formados através da rota de Ehrlich.

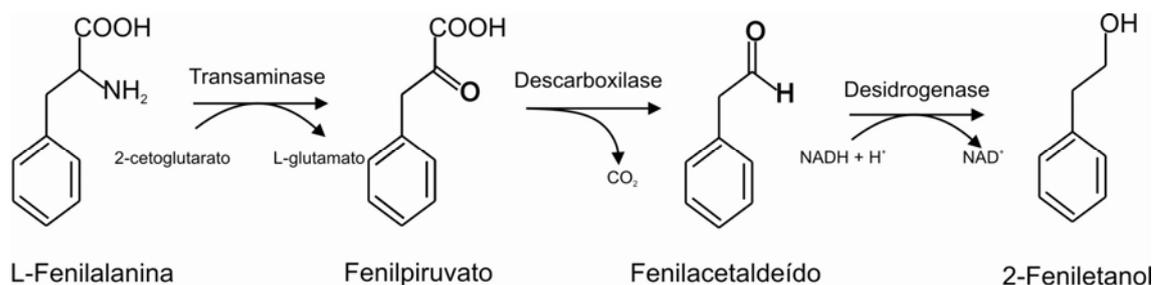
A FIGURA 3 ilustra as reações envolvidas na via de Ehrlich. O primeiro passo da via é uma transaminação, a qual libera amônia que se condensa com  $\alpha$ -cetoglutarato, formando glutamato (Stark *et al.*, 2003a). A L-PHE é transaminada formando fenilpiruvato, o qual é descarboxilado até fenilacetaldeído e este, sofre uma redução rendendo 2-FE (Etschmann *et al.*, 2003). A etapa da redução é realizada por

um enzima álcool desidrogenase, formando álcool feniletílico (Serp *et al.*, 2003) Através da suplementação no meio com L-PHE, a rota de Ehrlich é acelerada e altas concentrações do produto podem ser encontradas (Etschmann *et al.*, 2003). Como a maioria dos álcoois superiores, o 2-FE é tóxico para a célula produtora. Concentrações entre 2 a 3 gL<sup>-1</sup> inibem completamente o crescimento de vários microrganismos. Uma concentração de 2,5 gL<sup>-1</sup> de 2-FE diminui em 75% a taxa de crescimento específico de *Saccharomyces cerevisiae* (Stark *et al.*, 2003b).

A atividade da rota de Ehrlich é associada ao crescimento, altas taxas de formação de 2-FE foram encontradas durante a fase de crescimento celular (fase log ou de crescimento exponencial) (Wittmann *et al.*, 2002; Stark *et al.*, 2002 e Etschmann *et al.*, 2003). A fase inicial do cultivo (de 9h às 15h) é caracterizada pela pequena taxa de crescimento e menor produção de 2-feniletanol, visto que a L-fenilalanina é pouco degradada (Fabre *et al.*, 1997).

Quando a L-PHE é a única fonte de nitrogênio disponível, a via de Ehrlich predomina sobre a síntese *de novo*, a qual prevalece quando baixas concentrações de aminoácidos são encontradas (Etschmann *et al.*, 2003). O papel central é feito pelo fenilpiruvato, o qual é um metabólito utilizado na rota de biossíntese de fenilalanina na célula da levedura, e também, na produção de 2-FE (Wittmann *et al.*, 2002).

A via de Ehrlich, e subsequente formação de 2-FE são influenciadas por vários fatores. Porém, diferentes nutrientes e a temperatura são variáveis importantes na produção de 2-FE, independente da cepa de levedura utilizada na bioconversão (Etschmann *et al.*, 2004).



**FIGURA 3:** Via de Ehrlich para a produção de 2-FE por microrganismos.

Para serem metabolizados, os aminoácidos são transportados para o citoplasma celular através da membrana. Existem 15 diferentes mediadores de transporte de aminoácidos descritos em *Saccharomyces cerevisiae* e sua atividade é regulada pela presença de amônia e da concentração de aminoácidos no meio (Hernández-Orte *et al.*, 2002).

#### 2.5.6.2- Síntese *de novo*

Independente da atividade da via de Ehrlich, importantes quantidades de 2-FE podem ser obtidas a partir do metabolismo da glicose. Muitas leveduras sintetizam álcool 2-feniletílico *de novo* a partir da via do shiquimato ou via do cinamato (Serp *et al.*, 2003).

Na via do shiquimato, a eritrose-4-fosfato (ciclo das pentoses) e fosfoenolpiruvato (via glicolítica), são condensados formando o shiquimato. Esta etapa é catalisada pela enzima DAHP sintase (3-dioxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato sintase) (Etschmann *et a.*, 2002). O shiquimato sofre uma série de reações catalisadas por enzimas (corismato sintase) formando corismato, que é convertido a preferato

(enzima corismato mutase) (Lehninger *et al.*, 1995). O prefenato sofre uma desidratação (enzima prefenato desidratase) originando fenilpiruvato (Etschmann *et al.*, 2002).

A partir do fenilpiruvato, pode haver uma transaminação com glutamato, que atua como doador de grupos amino, formando-se L-PHE (Lehninger *et al.*, 1995). Ou então, o fenilpiruvato segue, normalmente, a via de Ehrlich e é descarboxilado e reduzido até 2-FE. Grandes quantidades de L-PHE causam uma inibição retroativa sobre as enzimas DAHP sintase e prefenato desidratase, inibindo a via de síntese *de novo*. Porém, se pequenas quantidades de L-PHE estão no meio, esta rota é ativada, formando baixas quantidades de 2-FE, ou então L-PHE, dependendo das necessidades metabólicas da célula.

Em *Saccharomyces cerevisiae* e *Zygosaccharomyces rouxii*, a síntese *de novo* durante a biossíntese de aminoácidos aromáticos é regulada através da inibição por “feedback” e por mecanismos de repressão da L-fenilalanina sob a enzima 3-dioxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato sintase (DAHP) e na enzima prefenato desidratase (Fukuda *et al.*, 1992). Os efeitos da inibição catabólica são expressos ao nível dos genes que codificam as enzimas essenciais na síntese *de novo* (DAHP sintase e prefenato desidratase). Mutantes de *S.cerevisiae* podem formar 750mg/L de 2-feniletanol *de novo* e a reação é controlada pela inibição por “feedback” na enzima DAPH sintase que é codificada pelos genes ARO3 e ARO4 (Akita *et al.*, 1990).

## **2.6- Microrganismos produtores de 2-feniletanol**

Os microrganismos possuem um importante papel na geração de compostos naturais, particularmente componentes de aroma em alimentos (Medeiros *et al.*, 2001).

Naturalmente, microrganismos podem ser utilizados como uma alternativa à síntese química de compostos de aroma (Fabre *et al.*, 1995). Semelhante a muitos álcoois superiores, o 2-feniletanol é um metabólito oriundo do processo de fermentação alcoólica (Etschmann *et al.*, 2002).

### 2.6.1- Fungos filamentosos

Os fungos são conhecidos pela sua habilidade em sintetizar componentes de aroma (Lomascolo *et al.*, 2001). O espectro de voláteis produzidos por fungos, especialmente *Basidiomycetes*, é muito diverso e semelhante ao encontrado em plantas (Krings e Berger, 1998). Espécies de *Ceratocystis* são capazes de produzir uma grande variedade de terpenos, os quais possuem aromas frutado e floral (Vandamme e Soetaert, 2002). Algumas espécies, tais como *Hericium erinaceus* e *Nigrosporus durus*, são utilizados para a produção de 2-feniletanol, através da síntese *de novo* (Abraham e Berger, 1994).

A bioconversão de L-fenilalanina em 2-feniletanol por espécies de *Aspergillus niger*, *Polyporus tuberaster* e *Ischnoderma benzoinum* tem sido avaliada obtendo-se bons rendimentos (Lomascolo, *et al.*, 2001). Fungos *Ascoidea hylecoeti* são capazes de produzir 2-feniletanol e outros álcoois superiores (Janssens *et al.*, 1992). Fungos *Ischnoderma benzoinum* são capazes de metabolizar L-PHE levando a formação de 2-FE e álcool benzílico (Lomascolo *et al.*, 1999).

### 2.6.2- Leveduras

Dentre os metabólitos produzidos durante a fermentação por leveduras, os álcoois superiores podem ser considerados como o maior grupo de componentes aromáticos formados, e sua presença é essencial para a qualidade do aroma total (Fabre *et al.*, 1997). Diferentes espécies de leveduras como *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae* catalisam a bioconversão de L-fenilalanina em 2-feniletanol e são de interesse para o desenvolvimento de um processo biotecnológico de obtenção de 2-feniletanol (Wittmann *et al.*, 2002).

As leveduras são ótimas produtoras de 2-feniletanol, tanto através do catabolismo dos açúcares e/ou o anabolismo de L-fenilalanina. Muitas espécies são capazes de produzir álcool fenilético, porém, as quantidades e a rota utilizada podem sofrer modificações dentre as espécies de leveduras produtoras.

*Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula anomala* e várias cepas de *Kluyveromyces* são capazes de formar grandes quantidades de 2-FE a partir de L-PHE (Stark *et al.*, 2003b). *Pichia fermentans* L5, uma cepa isolada do solo, é capaz de produzir 2-FE (Huang *et al.*, 2001).

*Kluyveromyces marxianus* é capaz de produzir uma grande quantidade 2-FE (Etschmann e Schrader, 2003). Dentre várias cepas de levedura, as espécies de *Kluyveromyces marxianus* apresentam os maiores níveis de produção de 2-FE e poderia ser empregadas num processo industrial de produção de 2-FE.

#### 2.6.2.1- *Kluyveromyces marxianus*.

*Kluyveromyces marxianus* é um dos melhores produtores de 2-FE descritos na literatura (Wittmann *et al.*, 2002). As cepas deste gênero possuem um grande interesse industrial, devido ao seu metabolismo e suas características de crescimento.

Esta levedura é capaz de crescer a altas temperaturas, sendo que a temperatura ótima de crescimento é 40 °C (Rouwenhorst, 1987). As altas temperaturas de crescimento podem reduzir o risco de contaminação com outras leveduras, diminuindo os custos de um processo industrial.

Rouwenhorst (1987) afirma que *Kluyveromyces marxianus* apresenta várias características fisiológicas importantes: cresce muito rapidamente (taxa de crescimento,  $\mu = 0,89 \text{ h}^{-1}$ ); temperatura ótima em 40°C; possui alta afinidade para vários açúcares; metaboliza lactose, xilose, rafinose e sacarose; efeito Cabtree negativo, pois produz pequenas quantidades de etanol (metabolismo oxidativo); não é capaz de flocular, produz muitas glicosidases; mas seu genoma ainda não é totalmente conhecido.

Como vantagens na bioconversão, é um microrganismo reconhecido como GRAS (Generally Recognized As Safe), portanto, pode ser utilizado em alimentos e produtos farmacêuticos (Wittmann *et al.*, 2002). *Kluyveromyces marxianus* é uma levedura de efeito Cabtree negativo, o que significa uma vantagem para um processo de produção de aroma, pois a formação de etanol como um subproduto tóxico sob condições aeróbias, pode ser minimizada (Wittmann *et al.*, 2002).

Além disto, quando comparada com leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* apresenta uma maior quantidade de substratos que podem ser metabolizados, principalmente substratos oriundos de processos industriais e que apresentam baixo custo (Rouwenhorst, 1987). Como exemplo, a levedura pode crescer em soro de queijo – substrato rico em lactose (Rech *et al.*, 1999) e hidrolisado de madeira (Rouwenhorst, 1987). Esta versatilidade é um ponto importante, pois possibilita a utilização de substratos com menor preço, facilitando a aplicação a nível industrial.

## 2.7- Composição do mosto de uva

O mosto pode ser caracterizado como um líquido turvo, mais ou menos viscoso, que é obtido pelo esmagamento ou prensagem da uva madura (Oreglia, 1978). Sua composição é extremamente complexa. É uma mistura de água, açúcares, compostos nitrogenados, ácidos orgânicos, compostos fenólicos e outros compostos (Walker *et al.*, 2003). A presença de carotenóides no mosto pode ser importante na composição aromática do vinho, principalmente  $\beta$ -caroteno e luteína (Oliveira *et al.*, 2003).

O mosto é composto por inúmeros componentes, tais como: água (75 a 80%), açúcares redutores e não-redutores, ácidos orgânicos, sais minerais, compostos nitrogenados, compostos fenólicos, pectinas, lipídeos e vitaminas. As substâncias presentes no mosto são provenientes de reações metabólicas ocorridas na baga da uva através do metabolismo da planta. Alguns compostos são produzidos nos tecidos celulares da videira e são translocados e armazenados no interior das bagas da uva.

Os açúcares encontrados no mosto são quase que exclusivamente, compostos por glicose e frutose. Quantidades importantes de sacarose podem ser encontradas, dependendo da variedade de uva e das condições edafoclimáticas (Ribereáu-Gayon *et al.*, 2003). Alguns açúcares são encontrados em pequenas quantidades, como L-arabinose, D-xilose, ramnose, maltose e rafinose. As concentrações de açúcares do mosto são muito dependentes do grau de maturação da uva e das condições ambientais. Os açúcares acumulados na baga provêm da mobilização das reservas de amido da videira durante o repouso vegetativo, e também, dos açúcares elaborados pelos órgãos verdes (Oreglia, 1978).

Uma grande variedade de compostos contendo nitrogênio é encontrada no mosto de uva, dependendo da variedade de uva e do tempo da colheita (Salmon e Barre, 1998). As substâncias nitrogenadas encontradas no mosto influenciam o metabolismo das leveduras durante o processo de fermentação alcoólica e a produção de produtos secundários (Torrea *et al.*, 2003). Os íons amônio podem constituir mais de 10% do nitrogênio assimilável total (Salmon e Barre, 1998). Aminoácidos representam fontes de nitrogênio alternativas às rotas facilmente assimiláveis (Salmon e Barre, 1998) e sua composição no mosto depende da variedade de uva (Hernández-Orte *et al.*, 2002).

Os ácidos orgânicos podem ser considerados como os componentes mais numerosos no mosto depois dos açúcares. A sua composição é muito variável e é, de maneira geral, fortemente influenciada pelos fatores fenotípicos e genotípicos das variedades de uva. Evoluem de maneira diversa que os açúcares, no início da maturação e são encontrados em altas quantidades, porém, com o decorrer da maturação sofrem uma grande diminuição até o ponto da colheita (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003). Os principais ácidos do mosto são o tartárico (encontrado quase que exclusivamente na uva), málico (é pouco estável e facilmente consumido pela planta e/ou microrganismos) e o cítrico.

A composição do mosto em sais é muito diversa, e varia em função dos métodos culturais (irrigação e adubação, principalmente), do solo e das condições climáticas (Ribéreau-Gayon e Peinaud, 1960). A composição do solo pode influenciar de maneira efetiva a composição em minerais do mosto, assim como, a utilização de adubos e tratamentos fitossanitários (Oreglia, 1978). Alguns minerais podem influenciar tanto positivamente, quanto negativamente o metabolismo microbiano durante o processo de fermentação alcoólica. O mosto é rico em potássio, cálcio e magnésio, ferro

e sódio. Os minerais podem ser utilizados como cofatores em várias reações enzimáticas realizadas pelas leveduras durante seu metabolismo no mosto.

As substâncias pécticas são encontradas em pequenas quantidades no mosto e podem representar dificuldades na filtração (Vogt *et al.*, 1986). A pectina, um polímero de ácido galacturônico parcialmente esterificado por álcool metílico, é encontrada em várias frutas e é hidrolisada durante a fermentação, liberando ácido péctico e metanol (Peynaud, 1984). As gomas são constituídas por cadeias de moléculas de açúcar e se encontram em torno de 0,3 a 6 gL<sup>-1</sup> no mosto (Oreglia, 1978) e possuem um papel de proteção coloidal no mosto e vinho (Peynaud, 1984).

Além da vitamina C, no mosto de uva somente se encontram as vitaminas hidrossolúveis do complexo B (Vogt *et al.*, 1986). As vitaminas no mosto possuem um papel importante como fatores de crescimento para leveduras e bactérias (Peynaud, 1984).

Os compostos fenólicos são importantes componentes do mosto, são responsáveis pelas diferenças entre os vinhos, tanto no sabor quanto na coloração e possuem propriedades bactericidas, antioxidantes, e previnem doenças cardiovasculares (Ribéreau-Gayon, 2003). São representados principalmente, pelos ácidos fenólicos, os taninos e as antocianinas. Os taninos possuem um sabor adstringente e são presentes no mosto em várias concentrações, dependendo da variedade de uva, da intensidade da prensagem e do esmagamento. Os pigmentos do mosto que são dados pelas antocianinas (uva tinta) e antoxantinas (nas uvas brancas), e também, estão presentes em quantidades muito variáveis e dependentes de vários fatos ambientais e tecnológicos.

A adstringência dos taninos é devido ao tamanho dos polímeros de taninos formados ao curso da vinificação (Oreglia, 1978). Além disso, quando condensados a

sais de ferro, formam compostos de pigmento amarelo a marrom (Vogt *et al.*, 1978). Os taninos são componentes incolores (Oreglia, 1978). As antocianidinas são glicosídeos e liberam açúcares e antocianinas (compostos de cor vermelha) quando hidrolisadas (Vogt *et al.*, 1978). São encontradas no mosto na forma de monoglicosídeos e diglicosídeos, dependendo da espécie de videira (*Vitis vinifera* L. ou outras variedades híbridas e de origem americana).

## **2.8- Planejamento experimental e metodologia de superfície de resposta**

A análise experimental através da utilização de curvas de superfície de resposta pode ser considerada como uma técnica estatística efetiva para a otimização de processos complexos (Lee *et al.*, 2006). A otimização é uma ferramenta essencial para a engenharia de alimentos na eficiente operação de sistemas de processamento, adaptando processos para gerar produtos altamente agradáveis aos consumidores (Madamba, 2002). A metodologia de superfície de resposta é utilizada para diminuir a quantidade de experimentos, porém é necessária para avaliar múltiplos parâmetros e suas interações (Lee *et al.*, 2006).

A otimização de um processo pode ser definida como a melhor condição onde a combinação das diferentes variáveis gera melhores rendimentos em produtos. Além disso, a convencional metodologia para otimização utilizando multifatores (uma variável fixa e variam-se as outras), requer tempo e é incapaz de detectar o ótimo verdadeiro, devido especialmente a interação entre as variáveis (Tanyildizi *et al.*, 2005).

A grande vantagem de se utilizar esta ferramenta estatística é a análise da combinação ou interação entre as diferentes variáveis, definindo o ótimo verdadeiro. Além disso, existe a possibilidade de obter produtos com melhores características e diminuir o tempo de seu desenvolvimento. Outra vantagem é o aumento da produtividade de processos minimizando a sensibilidade de produtos às variações de condições ambientais. A melhor utilização de matérias-primas pode significar uma menor incidência de custos sobre o produto destinado ao consumidor final e um maior ganho pela indústria.

Durante um processo de fermentação, as variáveis interagem e influenciam cada efeito na resposta, isto é importante para determinar as condições ótimas experimentais (Tanyildizi *et al.*, 2005). Com o Planejamento Experimental busca-se desenvolver um novo produto, ou então, melhorar algo já existente, mediante a otimização de seu processo de produção.

A primeira etapa no Planejamento Experimental é a definição de quais são as variáveis (também chamadas de fatores) e as respostas de interesse para o sistema. Em seguida é preciso definir quais os objetivos que devemos buscar com a realização destes experimentos, pois isso determinará que tipo de Planejamento Experimental deva ser utilizado. Elaborado o Planejamento Experimental, realizam-se os experimentos e as respostas são coletadas e é feita a validação do modelo mediante testes estatísticos de análise da variância (ANOVA).

Após, são geradas as curvas de superfície de resposta e definem-se quais as faixas ótimas de trabalho, mediante análise dos resultados obtidos. A técnica de metodologia de superfície e resposta é utilizada para mostrar os efeitos das variáveis combinados a todos os fatores num processo de fermentação, é uma coleção de

estratégias experimentais, métodos matemáticos e inferência estatística (Tanyildizi *et al.*, 2005).

### 3- MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1- Microrganismos

Foram utilizadas leveduras cedidas da coleção particular do Prof. Juan L. Carrau do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul (IB-UCS):

**KI:** Levedura Killer do tipo K2, identificada como *Saccharomyces cerevisiae* e isolada pelo Prof. P. Barre do Institut de la Recherche Agronomique de Montpellier, França. É uma das leveduras mais utilizadas no meio enológico na forma de levedura seca ativa.

**1A1G:** Levedura nativa da flora do Rio Grande do Sul, isolada e identificada como *Saccharomyces* sp. pelo Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul. É um sub-clone da linhagem 1Am que apresenta a característica de aumentar a acidez fixa dos mostos durante a vinificação. É sensível a linhagens Killer.

**THORNTON:** Levedura isolada pelo Prof. Rankine no Roseworthy Agricultural College em Adelaide, Austrália. Foi identificada como *Schizosaccharomyces malidevorans*. Este clone é um mutante incapaz de produzir gás sulfídrico (H<sub>2</sub>S), que foi patenteado nos EUA pela Nacional University of New Zealand.

Encontra-se depositado no IB-UCS desde a obtenção da patente americana do clone MB7TCμ.

**R709:** Identificada como *Saccharomyces cerevisiae* e isolada pelo Prof. Rankine no Roseworthy Agricultural College em Adelaide, Austrália. É uma levedura floculante de gemação incompleta que apresenta atividade desmalificante.

***Kluyveromyces marxianus* CBS 6556:** Esta cepa foi obtida a partir da coleção de cepas do Prof. Marco A.Z. Ayub do Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICTA-UFRGS).

**BLASTOSEL:** Levedura de uso industrial enológico, identificada como *S.cerevisiae*. É vendida na forma de levedura seca ativa, e foi doada pela empresa Vêneto Mercantil Importadora Ltda. de Bento Gonçalves-RS.

### **3.2- Meio para manutenção das cepas**

As cepas de leveduras foram transferidas para placas com meio YEPD, contendo ( $\text{gL}^{-1}$ ): glicose, 20; peptona, 20; extrato de levedura, 10 e ágar, 20. As placas foram colocadas em estufa e mantidas a 37 °C por no mínimo 24 horas, ou até o aparecimento de colônias grandes e isoladas. As cepas foram estocadas a 10 °C e, mensalmente, as mesmas foram transferidas para novas placas para manter as células renovadas.

Cultivos em meio YEPD líquido (na mesma composição, porém sem ágar) foram realizados para estocar as leveduras em glicerol. Alíquotas das culturas de 24 horas em YEPD líquido foram transferidas para microtubos contendo glicerol estéril, na

proporção de 1:1, ou seja, 500  $\mu\text{L}$  de cultura foram adicionados a 500  $\mu\text{L}$  de glicerol estéril. Os microtubos foram armazenados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **3.3- Seleção de leveduras produtoras de 2-FE**

Inicialmente, foi realizada uma seleção dentre as cepas de leveduras, com o intuito de buscar uma levedura que tivesse a capacidade de produzir altas concentrações de 2-FE.

A seleção foi realizada com um meio semissintético modificado a partir de Etschmann *et al.*, (2003), contendo ( $\text{gL}^{-1}$ ): glicose, 30 ; L-PHE (Nuclear, Brasil), 5; ácido cítrico, 12;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,6;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 24; YNB (Yeast Nitrogen Base-Difco), 0,17. O pH foi ajustado para 5,0, utilizando-se soluções de HCl ou NaOH, ambas na concentração de 1N. O meio foi esterilizado por autoclave a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos, com exceção das soluções de L-PHE e YNB, as quais foram esterilizadas com filtração a membrana de  $0,22\text{ }\mu\text{m}$  (éster de celulose, Millipore, USA).

O experimento foi realizado em frascos de Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de meio. O inóculo foi padronizado com uma pré-cultura de no mínimo 24 h, dependendo da cepa de levedura, a partir da cultura em meio YEPD sólido. Na pré-cultura ou pré-inóculo, foi adicionado  $0,5\text{ gL}^{-1}$  de peptona bacteriológica, visando obter-se uma maior quantidade de células. O pré-inóculo foi diluído até se obter uma densidade ótica ( $\text{DO}_{600\text{nm}}$ ) de 1,0. Logo após, foi transferida uma alíquota de 1 mL para cada frasco contendo meio estéril. Após, os frascos foram transferidos para um agitador orbital mantido a 120 rpm de agitação e a temperatura de  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Foram retiradas amostras a cada 12 horas, num total de 72 horas de cultivo. As amostras foram centrifugadas, as células foram utilizadas para análise de peso seco, enquanto que o sobrenadante foi congelado e armazenado para as posteriores análises.

### **3.4- Meio de cultura**

O mosto de uva foi utilizado para avaliar a bioconversão de L-PHE em 2-FE por *K.marxianus*. A TABELA 2 mostra as características enológicas do mosto.

Foi obtido o mosto da uva branca Riesling Itália, na Cooperativa Vinícola Aurora Ltda. As uvas foram colhidas e selecionadas, depois foram desengaçadas (separação dos grãos de uva e o engaço do cacho) e esmagadas para a obtenção do mosto. O mosto sofreu um processo de clarificação com a utilização de filtro à vácuo, foi adicionado de enzimas pectolíticas a dose de 0,02 gL<sup>-1</sup> e anidrido sulfuroso (SO<sub>2</sub>) (Tabela 2). O mosto foi fracionado em sacos plásticos, num volume máximo de 5L e foi congelado para manter sua integridade até a realização do trabalho.

### **3.5- Curva de crescimento em mosto de uva**

Com os experimentos de seleção de cepas, a levedura *K.marxianus* demonstrou um maior rendimento em 2-FE que as outras cepas, portanto, foi utilizada para todos os experimentos realizados para a otimização da bioconversão a partir da L-PHE. A partir da seleção, foram realizados experimentos iniciais para utilização de mosto de uva como meio para produção de 2-FE.

**TABELA 2:** Parâmetros enológicos do mosto utilizado no trabalho.

<b>Parâmetro</b>	
pH	3,46
Acidez total	5,45 gL <sup>-1*</sup>
Densidade	1,075
SO <sub>2</sub> livre	4,8 mgL <sup>-1</sup>
SO <sub>2</sub> total	27,2 mgL <sup>-1</sup>
Açúcares redutores	186,2 gL <sup>-1</sup>
Nitrogênio total	600 mgL <sup>-1</sup>

\*Expressado em ácido tartárico

O mosto então, foi descongelado, o pH foi ajustado para 5,0 e foi adicionado de 5gL<sup>-1</sup> de L-PHE. Após, o mosto passou por um processo de filtração esterilizante com membrana de 0,45 µm (éster de celulose, Millipore, USA), pois naturalmente, o mosto possui uma flora muito diversa de leveduras provenientes da uva. Após filtração, o mosto foi transferido para frascos de Erlenmeyer de 250 mL, previamente esterilizados (autoclave a 121 °C e 15 mim), num volume de 50 mL. O inóculo foi padronizado para uma DO<sub>600nm</sub> de 1,0, como descrito para o experimento de seleção das cepas, porém utilizando o mosto de uva como meio de crescimento. Após a realização do inóculo, os frascos foram colocados num agitador orbital com agitação de 120 rpm a 30 °C.

Foram retiradas amostras a cada 12 horas, num total de 120 horas de cultivo. Todos os experimentos foram realizados em duplicata, obtendo-se a média dos valores obtidos para as duas repetições. Com a verificação da influencia benéfica do mosto de

uva sobre a produção de 2-FE, foram realizados experimentos para otimizar a produção de 2-FE em mosto de uva, utilizando a ferramenta estatística de Delineamento Experimental e Análise das Curvas de Superfície de Resposta.

### 3.6- Planejamento Experimental

Foi utilizado para a análise do efeito das variáveis pH ( $x_1$ ), concentração de L-PHE ( $x_2$ ) e temperatura ( $x_3$ ), na produção de 2-FE ( $Y$ ). os valores reais e codificados das variáveis independentes encontram-se na TABELA 3.

**TABELA 3:** Valores reais e codificados das variáveis independentes e seus diferentes níveis utilizados para a otimização da produção de 2-FE em mosto de uva.

Variáveis	Códigos	Níveis				
		$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
pH	$x_1$	3	4	5	6	7
L-PHE (gL <sup>-1</sup> )	$x_2$	0,5	1,5	3,0	4,5	5,5
Temperatura (°C)	$x_3$	23	26	30	34	37

Para o estudo das variáveis, foi realizado um planejamento fatorial completo  $2^3$  de segunda ordem para as três variáveis independentes. Desta forma, foram obtidos 17 experimentos: 8 ensaios na combinação das variáveis em seus diferentes níveis, 3 ensaios no ponto central e 6 ensaios com os pontos axiais ou estrela ( $+\alpha$  e  $-\alpha$ ) para a

obtenção de um modelo quadrático como pode ser visto na TABELA 4. O valor de  $\alpha$  foi calculado através da fórmula,  $\alpha = (2^3)^{1/4}$ , obtendo-se um valor de 1,68.

**TABELA 4:** Experimentos aplicados no planejamento fatorial completo para a otimização da produção de 2-FE em mosto de uva.

<b>Experimento</b>	<b>pH <math>X_1</math></b>	<b>Temperatura <math>X_2</math></b>	<b>L-PHE <math>X_3</math></b>
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
<b>Pontos Axiais</b>			
9	-1,68	0	0
10	+1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	+1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	+1,68
<b>Pontos Centrais</b>			
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

As variáveis independentes foram codificadas de acordo com a seguinte fórmula:

$$x_i = \left( \frac{X_i - X_0}{\Delta X_i} \right) \quad (1)$$

onde,  $x_i$  é o valor codificado da variável,  $X_i$  é o valor real dado para a variável independente,  $X_0$  é o valor real dado para o ponto central (codificado por 0) e  $\Delta X_i$  é a valor da variação entre os dois valores.

A análise dos resultados obtidos nos diferentes ensaios foi realizada com o auxílio do programa Statistica 5.0. Para a validação do modelo, foi utilizada a Tabela de Análise da Variância (ANOVA), através cálculo do valor de  $F$  (teste de Fisher), comparando-se o valor de  $F$  dos dados experimentais com o valor tabelado.

A resposta para as três variáveis foi a produção de 2-feniletanol, tomando-se os dados após 120 horas de cultivo. Foram utilizadas as amostras no cultivo de 120 horas, devido à obtenção dos maiores valores pontuais. A análise dos dados foi realizada a um nível de significância de 95%.

O modelo foi representado por uma equação de segunda ordem (Equação 2), a qual foi utilizada para gerar as curvas de superfície de resposta:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 + \varepsilon \quad (2)$$

A variância dos dados experimentais do modelo foi dada pelo coeficiente de correlação,  $R^2$ .

### **3.7- Cultivo em biorreatores**

Para a realização destes experimentos foram utilizados biorreatores BIOSTAT B de 2L (B.Braun Biotech International, Alemanha), utilizando-se um volume de trabalho de 1,5L. No biorreator, foram acoplados os eletrodos para medição de pH (Mettler-Toledo) e da concentração de oxigênio dissolvido (Mettler-Toledo). O pH foi mantido num valor constante durante o cultivo, através da adição automática de soluções de NaOH a 0,1N ou H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a 0,01N. As soluções foram adicionadas com o auxílio de bombas peristálticas que eram acionadas mediante a variação do pH no meio.

#### **3.7.1- Meio e condições de cultivo**

Foi utilizado o mosto de uva como meio de cultura. As condições de cultivo foram adotadas mediante os resultados obtidos pela análise das curvas de superfície de resposta no planejamento fatorial completo. Primeiramente, o meio foi adicionado de L-PHE na dose de 3 gL<sup>-1</sup> e o pH foi corrigido para 7,0. O mosto de uva foi então colocado no biorreator juntamente com os eletrodos. O eletrodo de pH foi calibrado com soluções tampão de pH 7,0 e pH 4,0 e o eletrodo de oxigênio dissolvido foi calibrado no momento da preparação do inóculo no biorreator, com O<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>, após o período necessário para polarização do eletrodo.

O biorreator foi pasteurizado, mantendo-o a uma temperatura de 100 °C (vapor de água fluente na autoclave) durante 30 minutos. 50 mL de pré-cultura foram crescidos por 18 horas num frasco de Erlenmeyer de 250 mL, num agitador orbital a 30 °C e 120 rpm de agitação. Após, foi padronizado o inóculo como nos experimentos

anteriores, para uma  $DO_{600nm}$  de 0,5. O inóculo foi realizado num volume de 10% do volume total de trabalho no biorreator, ou seja, 150 mL e então, foi colocado no biorreator juntamente com uma solução de ampicilina (100  $\mu\text{g/mL}$ ), para impedir o desenvolvimento de bactérias contaminantes. Para prevenir a formação de espuma, foram adicionadas cinco gotas de anti-espumante (Sigma-Aldrich).

O pH da cultura foi mantido em 7,0 e a temperatura foi mantida em 37 °C. As amostras foram tomadas num intervalo de 2 horas, num total de 100 horas de cultivo. As amostras coletadas foram congeladas para as posteriores análises, com exceção da medida da  $DO_{600nm}$ . Foram testadas condições de agitação e aeração.

### **3.7.2- Aeração e agitação**

Para verificar a influência destas duas variáveis na produção de 2-FE, foram realizados três diferentes experimentos, todos feitos em duplicata. Primeiramente, foi realizada uma fermentação, mantendo-se a aeração nula, mas com uma agitação de 250 rpm. Um segundo experimento foi realizado com uma agitação de 250 rpm, porém com uma aeração de 1 vvm. E um terceiro experimento, foi realizado com uma agitação de 500 rpm e uma aeração de 2 vvm.

Todos os experimentos foram realizados em batelada sem alimentação, num total de 100 horas de cultivo e em duplicata. A agitação foi realizada por um rotor central munido de duas hélices de pás quadradas. A aeração foi realizada com ar sintético. Nos experimentos com aeração, o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio,  $k_{La}$ , foi calculado de acordo com o método dinâmico representado na equação 3:

$$k_{la} = \frac{\ln\left(\frac{C_i - C_0}{C_i - C}\right)}{\Delta t} \quad [\text{h}^{-1}] \quad (3)$$

onde: C, C<sub>i</sub>, C<sub>0</sub> são concentrações específicas de oxigênio e Δt é o intervalo de tempo entre as medições da concentração de oxigênio dissolvido no meio.

### **3.8- Procedimentos analíticos**

#### **3.8.1- Açúcares redutores**

Foi utilizado o método DNSA (ácido 3,5-dinitrosalicílico, Sigma-Aldrich) (Miller, 1959). A curva de calibração foi realizada com uma solução de glicose a 0,5%, relacionando a concentração de glicose com a absorbância das amostras. 100 μL de amostra foi misturado com 1 ml do reagente de DNSA, a amostra foi agitada em vórtice e logo depois, transferida para um banho de água fervente e mantida por 10 minutos. Após resfriar, foi mediada a absorbância da amostra num comprimento de onda de 570 nm, utilizando-se um espectrofotômetro (Hitachi U 1100, Japão).

As amostras foram comparadas com a equação da reta obtida na curva de calibração, para o cálculo da quantidade de açúcares redutores. As amostras foram diluídas, sempre que necessário. A concentração de açúcares foi dada em gL<sup>-1</sup>.

### **3.8.2- Biomassa**

#### **3.8.2.1- Peso seco**

Foram utilizados tubos Falcon de polipropileno com volume de 15 mL. As análises foram feitas em triplicata, cada uma, representada por um tubo diferente. Os tubos foram secados previamente a uma temperatura de 75 °C em estufa durante 24 h, logo após foram pesados (balança Adam Equipment-AE ADA 210/C, Inglaterra) e seu peso foi anotado. Aliquotas de 10 mL da amostra foram colocadas nos três diferentes tubos e foram centrifugadas a uma velocidade de 3500 rpm por 15 minutos (Centrífuga Sigma 4K 15, Alemanha), logo após, o sobrenadante foi recolhido e congelado para as posteriores análises.

As células foram adicionadas de água destilada e ressuspendidas (agitador de vórtice), sendo novamente centrifugadas nas mesmas condições. Após foi retirado o sobrenadante e as células foram lavadas e centrifugadas novamente nas mesmas condições anteriores. Os tubos foram mantidos em estufa a 75 °C por no mínimo 24 horas ou até se obter um peso constante e logo após, foram pesados e seu peso anotado.

A quantidade de células foi obtida através da subtração dos dois pesos do tubo, antes de ser colocada a amostra e depois de conter as células lavadas e centrifugadas. Os valores de peso seco foram convertidos para  $\text{gL}^{-1}$ .

#### **3.8.2.2- Densidade ótica (DO)**

A medida da densidade ótica foi utilizada para os experimentos com biorreatores, comparando-se o valor da  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  com uma curva de peso seco realizada ao final do cultivo. A curva foi feita nas mesmas condições da medida de biomassa por

peso seco, porém tomando-se 80 mL de amostra. O cultivo foi diluído obtendo-se 4 pontos e correlacionando com o valor da  $DO_{600nm}$  para obtenção da equação da reta.

Uma alíquota de 1 mL de amostra foi transferida para um microtubo de 1,5 mL e centrifugada por 5 minutos (Eppendorf Centrifuge 5410, Alemanha). Então, o sobrenadante foi retirado e as células foram resuspendidas em água destilada e foi medida a DO no comprimento de onda de 600nm, com o auxílio de um espectrofotômetro (Hitachi U 1100, Japão). As amostras foram diluídas, sempre que necessário e o valor da  $DO_{600nm}$  foi correlacionado com o valor da biomassa obtido na curva padrão de peso seco. O valor da biomassa foi dado em  $gL^{-1}$ .

### **3.8.3- Viabilidade celular**

As células foram visualizadas em microscópio ótico (400X) (Olimpus 5060, Japão) utilizando corante azul de metileno (10 ml de solução de azul de metileno a 0,1% em álcool, 2 g de citrato de sódio e completa-se para 100 ml com água destilada) para verificar a viabilidade celular da cultura, porém as células não foram contadas (biomassa por peso seco).

A 100  $\mu L$  de amostra foi adicionada 100  $\mu L$  de corante azul de metileno, a amostra foi agitada em vórtice e uma ou duas gotas foram pingadas numa lâmina de vidro e por cima foi colocada uma lamínula, para obter uma visualização a fresco da cultura. A visualização dos cultivos a fresco, também foi utilizada para verificar a presença de contaminantes durante o cultivo, feita a cada 12 horas de crescimento celular.

#### 3.8.4- 2-feniletanol

A medida de 2-feniletanol foi realizada por Cromatografia Gasosa (CG), de acordo com a metodologia utilizada por Huang *et al.* (2000). Foi utilizando um cromatógrafo Shimadzu GC 14B, equipado com uma coluna capilar de sílica fundida DB-1 de 30 m x 0,25 mm x 0,25 $\mu$  (Jew Scientific, USA) e um detector FID. Hidrogênio foi utilizado como gás de arraste. A temperatura do forno foi mantida a 50 °C por 2 minutos, após foi aumentada a 220 °C a uma taxa de 10 °C por minuto e depois, mantida a esta temperatura por 10 minutos. A temperatura do injetor e do detector foram mantidas constantes a 250 °C.

A amostra sofreu uma extração com solvente éter/pentano (1:1) (Merck) e como padrão interno, foi utilizando álcool benzílico (Merck). Foi feita uma curva de calibração: a relação entre a área do pico do padrão (álcool benzílico) com a área do pico da amostra foi correlacionada com a relação entre a massa do padrão e a massa da amostra (2-FE). Foi obtida a equação da reta e a quantidade de 2-feniletanol foi dada em gL<sup>-1</sup>.

#### 3.8.5- Etanol

A análise de etanol foi realizada com Cromatografia Gasosa (CG), utilizando-se um cromatógrafo Shimadzu GC 14B, equipado com uma coluna capilar de sílica fundida DB-1 de 30 m x 0,25 mm x 0,25 $\mu$  (Jew Scientific, USA) e um detector FID. Foi programado o aparelho para usar o detector e o injetor a 250°C e a coluna a 50°C por 2 min, sendo que a análise completa ocorre em 32 min. Como padrão interno

foi utilizado *n*-propanol (Rech *et al.*, 1999). A quantificação de etanol também foi realizada com uma curva padrão. A concentração de etanol foi dada em  $\text{gL}^{-1}$ .

### **3.8.6- L-fenilalanina**

A L-PHE foi analisada por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Definição). Foi utilizado um cromatógrafo Shymadzu LC-10A, equipado com uma coluna de fase reversa Supelcosil C18 de 5  $\mu$ , 250 mm x 4,6 mm (Supelco, USA). Foi utilizado um detector UV/VIS SPD-10 A (Shymadzu, Japão) no comprimento de onda de 216 nm. A curva de calibração foi realizada com diferentes concentrações de L-PHE padrão HPLC (Sigma-Aldrich). A fase móvel foi composta por uma solução de acetonitrila (Merch, USA) e acetato de amônio a 1% (Nuclear, Brasil), num fluxo de 1 mL/min. A solução da fase móvel foi filtrada previamente com membranas de 0,22  $\mu$ m (Sartorius, USA). A L-PHE é identificada após 4 minutos.

As amostras foram injetadas (alça de injeção de 50  $\mu$ L) diretamente no injetor, acoplando-se na seringa filtros descartáveis de 0,45  $\mu$ m (éster de celulose) e 13 mm de diâmetro (Millipore, USA). As amostras foram diluídas sempre que necessário. A concentração de L-PHE foi calculada em  $\text{gL}^{-1}$ .

## 4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

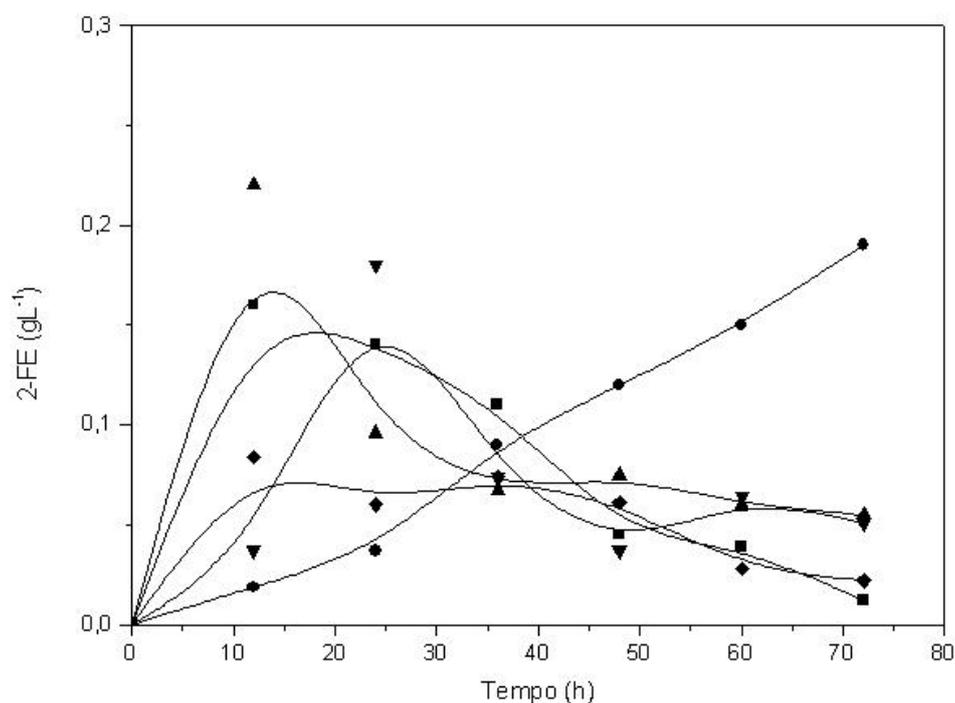
### 4.1- Seleção de leveduras

Todas as cepas, com exceção da levedura R709, foram capazes de se desenvolver no meio semisintético e produzir 2-FE (FIGURA 4). Quando se comparando a produtividade de cada cepa, *K.marxianus* foi a melhor produtora de 2-FE. Esta cepa foi capaz de produzir 0,19 gL<sup>-1</sup> de 2-FE, enquanto que a cepa KI (*S.cerevisiae*) produziu 0,055 gL<sup>-1</sup>. Comparando as duas cepas, *K. marxianus* apresentou um rendimento 70% maior que a levedura KI, ao final do cultivo (72h).

Para todas as cepas, com exceção da *K. marxianus*, houve uma substancial produção no início do cultivo, que foi diminuindo com o decorrer do experimento. A cepa de *S. malidevorans*, não é uma boa produtora de 2-FE (Bidan, 1975), rendendo apenas 0,051 gL<sup>-1</sup>. As cepas de *S.cerevisiae* apresentaram uma pequena taxa de conversão de 2-FE, porém, todas as cepas possuem a habilidade de produzir 2-FE, variando de 0,012 gL<sup>-1</sup> (cepa 1A1 G), até 0,055 gL<sup>-1</sup> (cepa KI).

As leveduras *Kluyveromyces* sp. são citadas na literatura como microrganismos bons produtores de 2-FE através da bioconversão a partir da L-PHE (Witmann *et al.*, 2002; Etschmann *et al.*, 2002). *K.marxianus* CBS 600 produziu 0,21

$\text{gL}^{-1}$  num meio sintético a  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $0,89\text{ gL}^{-1}$  quando a glicose foi substituída por melação de beterraba (Etschmann *et al.*, 2004). Inicialmente, de 14 cepas de leveduras testadas para a produção de 2-FE em melação de beterraba, 11 demonstraram ser capazes de produzir 2-FE após 41 horas de cultivo (Etschmann *et al.*, 2003).



**FIGURA 4:** Produção de 2-FE por leveduras nos experimentos de seleção em meio semisintético. *K.marxianus* CBS 6556 (●), 1A1G (■), KI (▲), Thornton (▼), Blastosel (◆).

*Pichia fermentans* L5, num meio contendo extrato de levedura e sacarose, foi capaz de produzir  $0,461\text{ gL}^{-1}$ , após 72 horas de cultivo, a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  e pH inicial de 8,5 (Huang *et al.*, 2001).

A diferença nos valores obtidos com a seleção é devido às diferentes características genéticas das cepas estudadas. A produção de 2-FE (seja através da via de Ehrlich ou pela síntese *de novo*) é fortemente dependente da cepa de levedura e do meio utilizado na bioconversão (Etschmann *et al.*, 2004).

#### **4.2- Utilização de mosto de uva**

O mosto de uva pode ser considerado um meio complexo. Seu conteúdo em substâncias nitrogenadas facilmente assimiláveis (TABELA 2) pelos microrganismos (principalmente amônia), proporciona uma baixa atividade da rota de Ehrlich no início do cultivo. Além disso, para a utilização de L-PHE e outros aminoácidos, as leveduras necessitam de um sistema de transporte específico, já foram identificados 15 diferentes sistemas em leveduras *S.cerevisiae* (Hernández-Orte *et al.*, 2002). A atividade destes sistemas de transporte é regulada pela presença de amônia e da concentração relativa dos diferentes aminoácidos no meio (Hernández-Orte *et al.*, 2002).

Em decorrência da regulação exercida pela concentração de amônia, a atividade da via de Ehrlich é muito reduzida, o que reflete a baixa produção de 2-FE. Com o consumo das fontes de nitrogênio facilmente assimiláveis, a levedura inicia a utilização da L-PHE presente no meio, e aumenta então, a atividade da via de Ehrlich.

Durante o cultivo em mosto de uva, *K.marxianus* CBS 6556 foi utilizada devido ao seu alto rendimento em 2-FE obtido nos primeiros experimentos de seleção. Utilizando-se mosto de uva, houve um aumento na produção final de 2-FE, comparando-se com o meio semisintético. Com o meio semisintético com YNB, a cepa produziu 0,19 gL<sup>-1</sup> após 72 horas de cultivo a 30 °C.

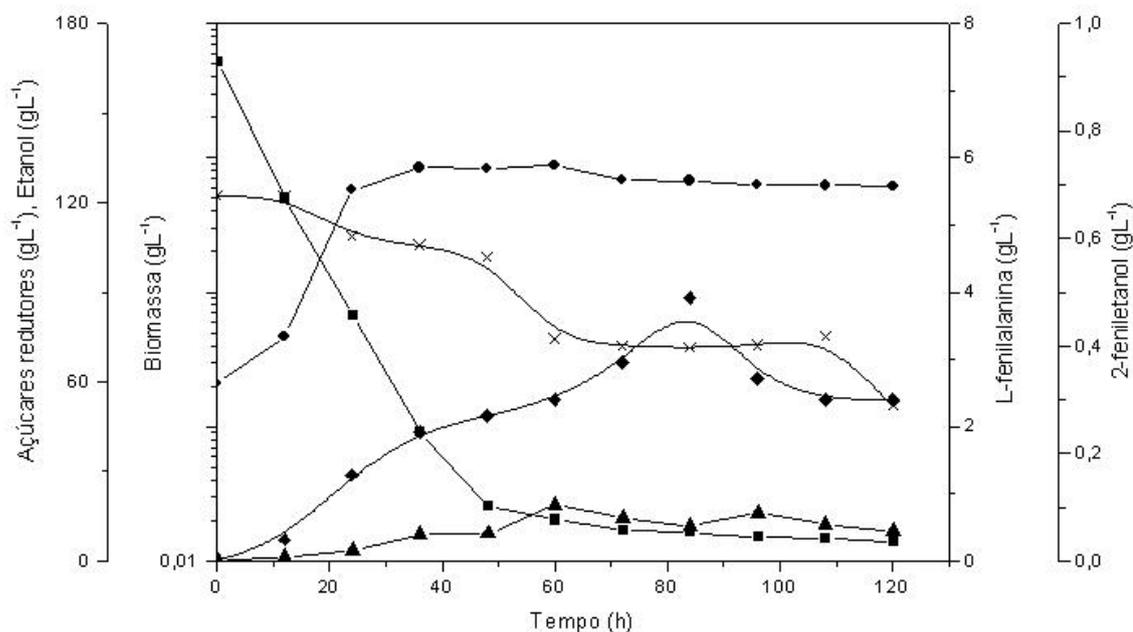
Utilizando-se mosto de uva, *K.marxianus* CBS 6556 foi capaz de produzir 0,51 gL<sup>-1</sup> de 2-FE, representando um aumento de 62,7% na produção de 2-FE. Quando se comparando o meio sintético com o meio com melação de beterraba, cepas podem produzir muito 2-FE no meio sintético e pouco no meio com melação e vice-versa (Etschmann *et al.*,2003).

Sendo assim, a produção de álcool fenilético foi aumentando gradativamente com o passar do tempo, chegando ao máximo em 84 horas de cultivo (FIGURA 5). Depois de atingido o valor máximo, a concentração de 2-FE foi diminuindo permanecendo constante, 0,30 gL<sup>-1</sup>, até o final do cultivo (120 horas).

Experimentos com melação de beterraba demonstram um perfil de produção de 2-FE parecido, obtendo-se um máximo de 3,03 gL<sup>-1</sup> a 35 °C após 70 horas de cultivo e utilizando-se um processo extração *in situ* com álcool oléico (Etschmann *et al.*, 2003). Utilizando meio semisintético e 5 gL<sup>-1</sup> de L-PHE, *K.marxianus* (Hansen van der Walt) produziu 0,81gL<sup>-1</sup> de 2-FE (Fabre *et al.*, 1998).

Durante o cultivo, houve uma pequena fase de adaptação ao meio, porém a fase lag de crescimento foi curta. Logo após, na fase de crescimento exponencial (fase log) o valor máximo na formação de biomassa foi encontrado após 60 horas de cultivo, 8,76 gL<sup>-1</sup>. A partir de 72 horas de cultivo, a levedura iniciou a fase estacionária de crescimento até o final do experimento, obtendo uma concentração de biomassa de 6,11 gL<sup>-1</sup> em 120 horas de cultivo.

A maior produtividade em 2-FE foi obtida quando a levedura iniciou a fase estacionária de crescimento, a partir de 72 horas de cultivo. Wittmann *et al* (2002) e Fabre *et al* (1997) afirmam que a produção de 2-FE é aumentada durante esta fase de crescimento da levedura.



**FIGURA 5:** Cinética de crescimento e produção de metabólitos por *K.marxianus* CBS 6556 no mosto de uva em agitador orbital (30 °C, 120 rpm e  $DO_{inicial} = 1,0$ ). Biomassa (●), Açúcares redutores (■), 2-feniletanol (◆), Etanol (▲) e L-fenilalanina (×).

#### 4.2.1- Consumo de L-PHE e produção de 2-FE

A bioconversão de L-PHE em 2-FE pode ser influenciada pela quantidade de precursor que está disponível para a célula. Desde o início do cultivo até 48 horas, a fenilalanina é consumida gradativamente pela célula. Porém após, ocorre um grande consumo de L-fenilalanina pela levedura, coincidindo com a maior formação em biomassa durante o cultivo (FIGURA 5). Ao final de 120 horas de cultivo, há um residual de  $2,3 \text{ gL}^{-1}$  de L-PHE (TABELA 5).

**TABELA 5:** Consumo de L-PHE e bioconversão em 2-FE durante os experimentos com mosto de uva.

Tempo (h)	L-Fenilalanina (gL <sup>-1</sup> )	2-feniletanol (gL <sup>-1</sup> )	Y <sub>2-FE/L-PHE</sub> (gg <sup>-1</sup> )
0	5,42	0	-
12	5,42	0,04	0,007
24	4,82	0,16	0,27
36	4,69	0,24	0,33
48	4,52	0,27	0,30
60	3,3	0,3	0,14
72	3,2	0,37	0,17
84	3,17	0,51	0,23
96	3,21	0,34	0,15
108	3,34	0,3	0,14
120	2,3	0,3	0,09

Segundo Fabre *et al.* (1998), utilizando 2 gL<sup>-1</sup> de L-PHE, em torno de 50 % do precursor é rapidamente consumido em 24 horas, porém aumentando até 5 gL<sup>-1</sup>, não é encontrado um aumento significativo na produção de 2-FE. Somente com *K.marxianus* a totalidade de 2 gL<sup>-1</sup> foi totalmente consumida ao final de 192 horas de cultivo (Fabre *et al.*, 1997). Em experimentos com melão de beterraba e utilizando pervaporação organofílica para extração de 2-FE *in situ*, ao final do cultivo, havia 1,4 gL<sup>-1</sup> de L-PHE residual (Etschmann *et al.*, 2005).

Com relação ao rendimento em 2-FE, até 48 horas de cultivo manteve-se elevado diminuindo com o passar do tempo até o fim do cultivo (120 horas). A diminuição do rendimento pode ser devido ao efeito inibitório do etanol e 2-FE acumulados no meio. Concentração de 2-FE próxima a  $0,94 \text{ gL}^{-1}$ , corresponde ao valor crítico para inibição na bioconversão (Fabre *et al.*, 1998).

A presença de etanol e 2-FE no meio resultam numa inibição no crescimento da levedura, a qual reduz a tolerância das células e reduz a concentração final de 2-FE (Serp *et al.*, 2003). A taxa de formação de 2-FE parece ser constante e independente do conteúdo de glicose, onde o valor teórico encontrado foi de  $0,74 \text{ gg}^{-1}$  (Stark *et al.*, 2002).

A maior taxa de consumo de L-PHE foi encontrada durante o final da fase de crescimento logarítmica, logo após na fase estacionária, a levedura continuou a consumir L-PHE até o final do cultivo, porém em menor proporção (FIGURA 5). A bioconversão da L-PHE depende da atividade da rota de Ehrlich, porém uma grande variedade de fatores pode influenciar a produção de 2-FE.

#### **4.3- Otimização da produção de 2-FE**

Esta etapa do trabalho foi feita utilizando-se o planejamento experimental e a metodologia de superfície de resposta. A produção de 2-FE e os 17 ensaios realizados podem ser observados na TABELA 6. Como a produção de 2-FE é fortemente influenciada pelo meio de cultura (Etschmann *et al.*, 2004), condições de cultivo e da

cepa de levedura utilizada (Fabre *et al.*, 1999), uma otimização no processo pode aumentar o rendimento na bioconversão.

**TABELA 6:** Dados experimentais para a produção de 2-FE e valores reais para a variáveis independentes utilizados para o planejamento fatorial completo com mosto de uva

<b>Experimento</b>	<b>pH</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>L-fenilalanina (g<math>L^{-1}</math>)</b>	<b>2-FE (g<math>L^{-1}</math>)</b>
1	4	26	1,5	0,13
2	4	26	4,5	0,16
3	4	34	1,5	0,22
4	4	34	4,5	0,11
5	6	26	1,5	0,22
6	6	26	4,5	0,37
7	6	34	1,5	0,59
8	6	34	4,5	0,29
9	3	30	3,0	0,27
10	7	30	3,0	0,50
11	5	23	3,0	0,16
12	5	37	3,0	0,36
13	5	30	0,5	0,24
14	5	30	5,5	0,14
15	5	30	3,0	0,34
16	5	30	3,0	0,31
17	5	30	3,0	0,30

#### 4.3.1- Escolha do limite das variáveis independentes

O limite dado para as três diferentes variáveis independentes para a formulação do planejamento e as curvas de contorno e resposta foi definido através de testes prévios. A produção de 2-FE durante o processo de fermentação pode ser influenciada por diversas condições de cultivo. Altas temperaturas e aeração do meio podem aumentar a produção de 2-FE (Bidan, 1975).

A diferença experimental dos cinco níveis da variável temperatura foi definida devido a pesquisas anteriores, ou seja, a produção de 2-FE aumenta com o aumento da temperatura, chegando ao máximo na temperatura de 33-35 °C (Etschmann *et al*, 2004). Com relação à variação do pH, foi utilizada a faixa de 3,0 a 7,0, mantendo-se mais próximo possível do pH encontrado naturalmente nos mostos de uva em condições encontradas na região da Serra Gaúcha (por volta de 3,0-4,0).

A concentração de L-PHE foi variada de 0,5 até 5,5 gL<sup>-1</sup>, porém, 3,0 gL<sup>-1</sup> foi considerado como ótimo para obter-se um bom rendimento em 2-FE utilizando leveduras *K.marxianus* (Fabre *et al.*, 1999).

#### 4.3.2- Análise estatística do modelo

O valor de  $F$  é utilizado para verificar se o modelo estatístico é significativo, além disso, através do teste  $F$  é possível verificar a relevância estatística dos fatores experimentais no valor das respostas. O teste  $F$  consiste em verificar se há uma relação entre as variáveis independentes e a resposta, ou variável dependente (Barros *et al.*, 1995). Para o modelo aplicado, o valor de  $F$  foi de 8,96, o que indica que o valor é 4

vezes maior que o valor de  $F$  tabelado, por isso, o modelo é considerado significativo.

A TABELA 7 mostra a análise da variância (ANOVA) feita para o modelo.

Barros *et al.* (1995), afirmam que a regressão é significativa e preditiva quando o valor de  $F$  é 5 vezes maior que o valor de  $F$  tabelado numa regressão de referência, e ainda, os valores experimentais podem ser representados pelo modelo proposto.

**TABELA 7:** Análise da variância (ANOVA) para o modelo de regressão.

Fonte de Variação	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média	$F$ calculado	$F$ tabelado
Regressão	0,250301698	9	0,0278113	8,96237018	2,72
Resíduo	0,021721832	7	0,003103119		
Falta de Ajuste	0,004066667	2	0,002033333	0,57584659	
Erro Puro	0,017655165	5	0,003531033		
Total	0,272023529	16			

$R^2 = 0,92015$ . Nível de significância de 95%.

O valor de  $R^2$  é muito importante para determinar se o modelo pode ser ou não considerado significativo.  $R^2$ , coeficiente de correlação, é um parâmetro estatístico calculado através da comparação entre a variância dos pontos experimentais no modelo com a quantidade de pontos experimentais obtidos (Box, 1978). O valor de  $R^2$  para ter um bom ajuste no modelo, deve ser maior que 0,80 (Sin *et al.*, 2006).

O  $R^2$  para o modelo proposto foi de 0,92015 a um nível de significância de 95%. Este valor demonstra que há uma boa reprodutibilidade e o modelo é significativo, indicando que uma alta proporção de variabilidade foi explicada pelo modelo estatístico

(Serra *et al.*, 2005). A TABELA 8 mostra os coeficientes de regressão, o valor de  $R^2$  e o valor das probabilidades ( $P$ ) para as diferentes variáveis independentes.

Os coeficientes de regressão foram utilizados para gerar a equação matemática do modelo. A variável dependente, ou seja, a produção de 2-FE pode ser relacionada numa equação polinomial de segunda ordem. Desta forma, pode-se prever a resposta mediante mudanças nas variáveis independentes. Sempre que possível, o modelo estatístico pode ser simplificado através da eliminação dos termos não significativos. Propõe-se então, que o modelo quadrático pode ser reduzido na seguinte equação:

$$Y = 0,3141 + 0,0906 x_1 - 0,0738 x_2 \cdot x_3 - 0,029 x_2^2 - 0,046 x_2 \cdot x_2 \quad (4)$$

Na equação 4,  $Y$  é a resposta (produção de 2-FE) predita do modelo,  $x_1$  é o valor codificado para o pH,  $x_2$  é o valor para a concentração de L-PHE e  $x_3$  é o valor codificado para temperatura (TABELA 3).

A validação do modelo foi realizada mediante a comparação dos resultados experimentais com os resultados obtidos da resposta com a equação quadrática (4). Foram utilizadas as seguintes condições: pH 7, 0, temperatura de 37 °C e 3,0 gL<sup>-1</sup> de L-PHE, as quais foram considerados os valores ótimos para o modelo sugerido. Desta forma, os valores codificados das variáveis foram:  $x_1 / x_3 = 1,68$  e  $x_2 = 0$ , representando a resposta predita pelo modelo de 0,4663 gL<sup>-1</sup> de 2-FE, num nível de confiança de 95% (Equação 4). Experimentalmente, obteve-se o valor de 0,47 gL<sup>-1</sup> de 2-FE, confirmando a aproximação dos resultados experimentais e do modelo estatístico.

**TABELA 8:** Coeficientes estimados para o modelo estatístico.

<b>Variáveis independentes</b>	<b>Coeficientes de regressão (<math>\beta</math>)</b>	<b>Desvio padrão (<math>\beta</math>)</b>	<b>Valor de P</b>
Interação ( $\beta_0$ )	0,314	0,026	0,0068
pH *	0,091	0,012	0,0177
pH . pH	0,023	0,013	0,2312
T	0,046	0,012	0,0629
T . T	- 0,025	0,013	0,2045
L-PHE **	-0,029	0,012	0,1394
L-PHE . L-PHE ***	- 0046	0,013	0,0752
pH . T	0,031	0,015	0,1890
pH . L-PHE	- 0,009	0,015	0,6382
T . L-PHE *	-0,074	0,015	0,0437

\* Variáveis significativas a 95% de confiança

\*\* Variáveis significativas a 87% de confiança

\*\*\* Variáveis significativas a 93% de confiança

#### **4.3.3- Efeito das variáveis independentes**

Dentre as variáveis testadas, o efeito do pH inicial foi considerado significativo na resposta, e também, a interação entre a temperatura e a concentração de L-PHE (TABELA 8). O efeito do pH inicial foi considerado significativo na resposta, pois o valor de  $P$  foi menor que 0,05. Isto indica que a produção de aroma é fortemente influenciada pelo pH inicial do cultivo, obtendo-se uma maior produção de 2-FE quando se utilizam valores de pH neutros ou levemente básico.

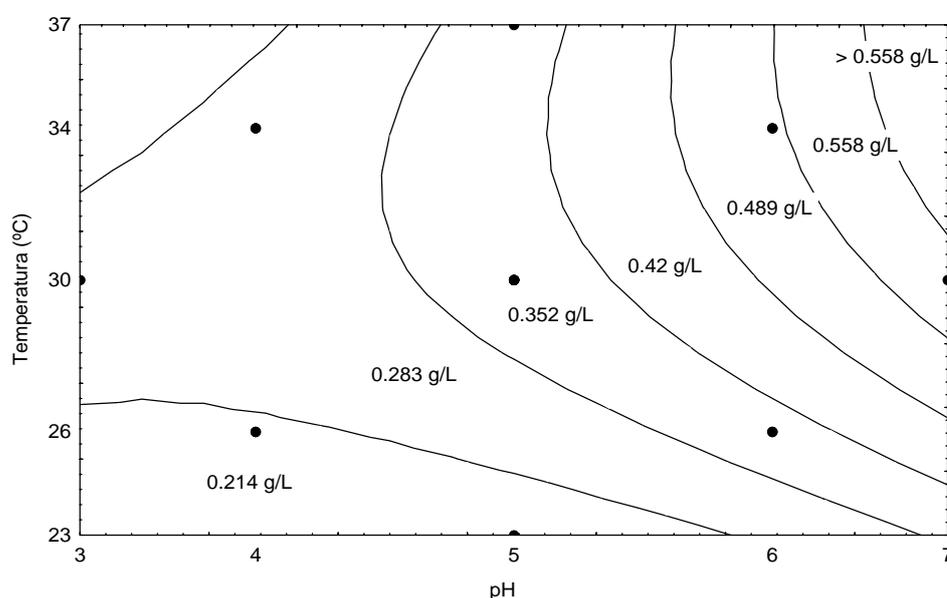
Com relação à temperatura, esta influencia fortemente o crescimento até certas temperaturas, favorecendo a via de Ehrlich, a qual é associada ao crescimento (Wittman *et al.*, 2002). A temperatura ótima para a bioconversão depende, principalmente, da cepa de levedura e do meio utilizados. A interação da temperatura com a concentração de L-PHE foi significativa, demonstrando que as duas variáveis desempenham um importante papel na taxa de produção de 2-FE e ambas podem ser limitantes para a produção de 2-FE.

Os efeitos linear e quadrático da concentração de L-PHE no meio não foram considerados significativos pelo modelo a 95% de significância (TABELA 8). Como a quantidade de L-PHE no meio influencia fortemente a quantidade de 2-FE produzida (Fabre *et al.*, 1998) e o valor de *P* foi próximo a 0,05, o efeito da concentração de L-PHE tanto na forma linear quanto quadrática, foram considerados significativos na produção de 2-FE. Além disso, se a L-PHE não está presente no meio, a via de Ehrlich não é ativada pela levedura e o rendimento em 2-FE é reduzido (Etschmann *et al.*, 2002).

O efeito da concentração de L-PHE no meio é considerado significativo para aumentar a quantidade de 2-FE formada no cultivo. Wittman *et al* (2002) afirma que a totalidade de 2-FE produzida é derivada da L-PHE presente no meio, e é considerada o precursor dominante na bioconversão. Alta concentração de L-PHE é necessária para aumentar o fator de conversão de 2-FE ( $Y_{2-FE/L-PHE}$ ) até o valor máximo de  $0,93 \text{ molmol}^{-1}$  (Stark *et al.*, 2003a).

#### 4.3.4- Otimização da produção de 2-FE

Os coeficientes de regressão foram utilizados para gerar as curvas de contorno, as quais mostram a melhor condição para se obter a maior resposta na bioconversão. A Figura 6 mostra as curvas de contorno para o pH e a temperatura, a concentração de L-PHE foi mantida no ponto central (codificado como 0).

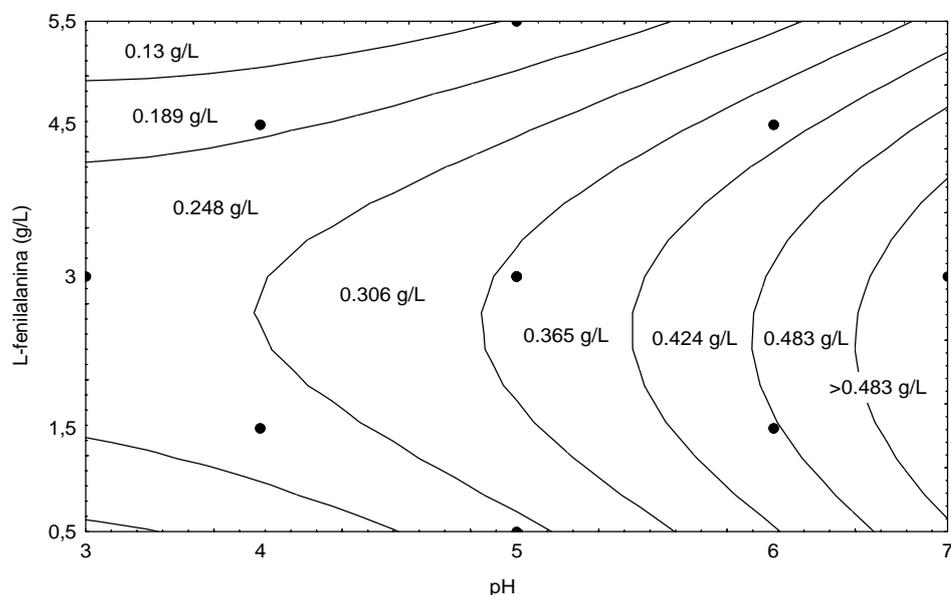


**FIGURA 6:** Curvas de contorno para o efeito do pH e da temperatura na produção de 2-FE por *K.marxianus* CBS 6556 em mosto de uva.

Com a análise da FIGURA 6, nota-se que o aumento na produção de 2-FE se dá com o aumento no pH inicial do cultivo, obtendo-se a região ótima no maior valor de pH testado, pH 7,0. Isto também se aplica à temperatura, demonstrando que a 37 °C a bioconversão se torna mais eficiente e a produção de aroma é evidenciada. A FIGURA 7 mostra as curvas de contorno para a concentração de L-PHE e pH. A concentração de

L-PHE mantida a  $3,0 \text{ gL}^{-1}$  e o pH a  $7,0$ , representam as melhores condições para a produção de 2-FE (FIGURA 7).

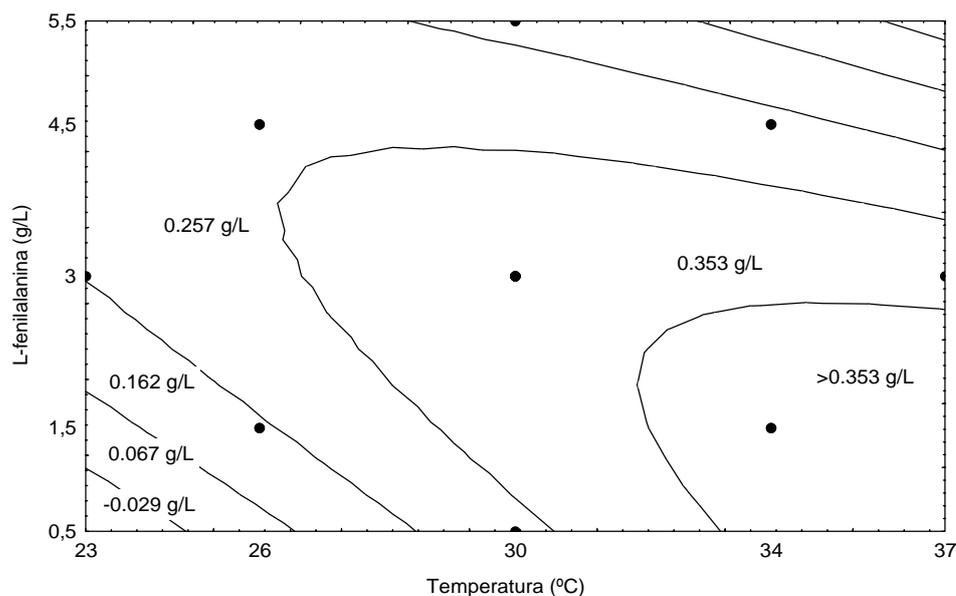
A FIGURA 8 mostra as curvas de superfície de resposta para a temperatura e a concentração de L-PHE. A análise da FIGURA 8 demonstra que as melhores condições são encontradas quando a temperatura é de  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  e a concentração de L-PHE for de  $3,0 \text{ gL}^{-1}$  ou menos.



**FIGURA 7:** Curvas de superfície de resposta do efeito do pH e da concentração de L-PHE na bioconversão.

Utilizando a quantidade de precursor em  $1,5 \text{ gL}^{-1}$ , a concentração de 2-FE no meio é diminuída, como pode ser visto nos dados experimentais (TABELA 6). Para verificar a influência da concentração de precursor, utilizou-se uma concentração de  $0,5 \text{ gL}^{-1}$ , como indicada pelo modelo. Porém, não houve um incremento na quantidade de 2-

FE durante o cultivo, inversamente, houve uma diminuição na produção de aroma comparando-se com o ponto central ( $0 = 3,0 \text{ gL}^{-1}$ ).



**FIGURA 8:** Curva de contorno do efeito da temperatura e da concentração de L-PHE na formação de 2-FE por *K.maxianus* em mosto de uva.

Para se obter uma boa taxa de conversão de L-PHE em 2-FE, deve-se utilizar o ponto médio, isto é,  $3,0 \text{ gL}^{-1}$  de L-PHE (TABELA 6).

#### 4.3.5- Influencia do pH na bioconversão

O pH é uma variável muito importante para o crescimento de microrganismos. O pH do meio pode ter um efeito na atividade enzimática durante o processo de fermentação microbiana e produção de aromas (Feron *et al.*, 1996). Desta

forma, o pH pode modificar a atividade das enzimas envolvidas nas reações ocorridas durante a bioconversão de L-PHE em 2-FE (Huang *et al.*, 2001).

O pH inicial do meio foi variado (TABELA 3) para se encontrar a faixa ótima para a produção de 2-FE no mosto de uva. As cepas de *K.marxianus* podem crescer numa ampla faixa de pH, porém o ótimo é o pH 5,0 (Rouwenhorst, 1987).

O pH desempenha um importante papel no crescimento de cepas de *Saccharomyces* sp., pH próximo a 4,7 pode aumentar o acúmulo de biomassa (Serra *et al.*, 2005). pH próximo à neutralidade também é favorável para a formação de biomassa por cepas de *K.marxianus*, como a via de Ehrlich é associada ao crescimento, uma grande concentração de biomassa aumenta a produtividade de 2-FE (Wittmann *et al.*, 2002).

Com o valor de pH inicial em torno de 8,5, o rendimento molar da bioconversão de L-PHE é de 0,77 após 16 h de cultivo utilizando *Pichia fermentans* L-5, porém com pH inicial abaixo de 8,5 o rendimento molar é diminuído (Huang *et al.*, 2001).

#### **4.3.6- Influência da temperatura sobre a produção de 2-FE**

O crescimento dos microrganismos pode ser induzido por diversos parâmetros, dentre estes a temperatura desempenha um papel fundamental. Em temperaturas mais altas, a taxa de crescimento específico sofre um aumento linear com o aumento da temperatura, até que se transforme num fator limitante para o crescimento celular (Lepe, 1997). Para a bioconversão de L-PHE em 2-FE a temperatura pode representar um fator importante quando se busca sua otimização.

Com os resultados do planejamento experimental, demonstra que se mantendo a temperatura no maior nível testado, a produção de 2-FE é aumentada. Desta forma, na temperatura do cultivo de 37 °C, há a maior produção de aroma. A temperatura de 35 °C foi considerada ideal para a bioconversão em experimentos com melaço de beterraba (Etschmann *et al.*, 2003) e a temperatura ótima para a bioconversão com *K.marxianus* CBS 600 é dada em torno de 33 °C (Etschmann *et al.*, 2004).

O máximo na produção de 2-FE por *Pichia fermentans* foi encontrado entre 30-35 °C, quando esta temperatura é aumentada para 40 °C, a produção diminui bruscamente (Huang *et al.*, 2001).

Durante experimentos de seleção de cepas de leveduras para a produção de 2-FE em melaço de beterraba, o aumento da temperatura de 35 °C para 41°C causa uma rápida diminuição na produção de 2-FE (Etschmann *et al.*, 2003). Em temperaturas abaixo de 30 °C, cerca de 10 % de 2-FE é sintetizado ao fim de 15 h, enquanto que acima de 30 °C este valor é de 20 %, porém há um efeito positivo adicional na variação da temperatura e o máximo na produção de 2-FE é dado a 33 °C (Etschmann *et al.*, 2004).

#### **4.3.7- Papel da concentração de L-PHE na bioconversão**

A presença do aminoácido L-fenilalanina no meio é essencial para se obter uma grande quantidade de 2-FE durante o cultivo, por isso, é considerada como o seu precursor natural. Somente com altas concentrações de L-fenilalanina é que a via de Ehrlich é ativada e altos rendimentos em 2-FE podem ser encontrados (Wittmann *et al.*, 2002).

A bioconversão é pouco eficiente e não excede 37 % quando o precursor foi adicionado na concentração maior que  $2 \text{ gL}^{-1}$  (Fabre *et al.*, 1998). Utilizando-se L-fenilalanina marcada com  $^{13}\text{C}$  no anel benzênico ( $\text{C}_6$ ), após 28 h de cultivo com *K.marxianus*, analisando-se a quantidade de 2-FE formada demonstra níveis de 99,8 % de frações de isótopos de massa ( $^{13}\text{C}_6$ ), apontando que a L-PHE é o precursor para a formação de 2-FE durante o cultivo (Wittmann *et al.*, 2002). O 2-FE formado é provavelmente derivado exclusivamente da L-PHE extracelular adicionada no meio de cultura, enquanto que a contribuição da glicose pode ser nula (Wittmann *et al.*, 2002).

Durante cultivo em agitador orbital com cepas de *K.marxianus*,  $0,83 \text{ gL}^{-1}$  de 2-FE foram encontradas utilizando-se  $3 \text{ gL}^{-1}$  de L-PHE, aumentando-se esta concentração, não houve um acréscimo na concentração de 2-FE produzida (Fabre *et al.*, 1998). Entretanto, uma alta concentração de L-PHE no meio origina um elevado rendimento na bioconversão,  $Y_{2\text{-FE/L-PHE}}$ , quando em condições puramente oxidativas (Stark *et al.*, 2003a).

O rendimento molar de 2-FE na bioconversão varia de acordo com os diferentes níveis de L-PHE presentes no meio (Huang *et al.*, 2000). Sendo assim, somente quando a L-PHE está presente no meio é que o rendimento em aroma é elevado. A produção de 2-FE vai aumentando proporcionalmente com a concentração de L-PHE inicial do meio. Porém, com o acúmulo de biomassa e conseqüente formação de 2-FE, é estabelecido um equilíbrio na bioconversão e o acréscimo na concentração de L-PHE não causa efeito sobre o rendimento em aroma.

Huang *et al.* (2000) afirmam que a porcentagem de consumo de L-PHE diminui quando a concentração inicial do precursor no meio é aumentada. Porém, a quantidade total de L-PHE nunca é completamente convertida em 2-FE (Stark *et al.*,

2003a). Utilizando-se 0,1 % de L-PHE a produção de 2-FE foi de  $0,45 \text{ gL}^{-1}$ , 22,5 vezes maior que a na concentração de 0,025 %, e ainda, 0,1 % de L-PHE origina um aumento significativo na formação de 2-FE (Huang *et al.*, 2000).

#### **4.4- Experimentos em biorreatores**

Durante os experimentos em frascos com 50 mL de mosto de uva sob agitação, houve um rendimento máximo de 2-FE a partir da L-PHE de  $0,33 \text{ gg}^{-1}$  e uma concentração de  $0,51 \text{ gL}^{-1}$  de aroma foi obtida em 84 h de cultivo. Desta forma, foram determinadas as condições ótimas para a bioconversão utilizando-se mosto de uva, chegando aos parâmetros de pH 7,0, temperatura de  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $3 \text{ gL}^{-1}$  de L-PHE.

A partir da definição das condições ótimas para a bioconversão, foram utilizados biorreatores com 2L de capacidade, como explicado no capítulo 3, Materiais e Métodos, testando-se diferentes condições de aeração e agitação. A aeração pode aumentar a produção de 2-feniletanol e outros álcoois superiores durante a fermentação do mosto de uva (Bidan, 1975).

##### **4.4.1- Produção de aroma em biorreatores**

Comparando-se com os experimentos em frascos sob agitação, independente do regime de aeração e agitação, a produção máxima de 2-FE ocorreu antes de 84 h de cultivo (dado obtido em agitador orbital). A levedura *K.marxianus* apresenta-se no início do cultivo com uma pequena produção de aroma, a qual vai aumentando

gradativamente com o passar do tempo. Com relação à taxa de produção de 2-FE, dois máximos podem ser observados (Wittmann *et al.*, 2002).

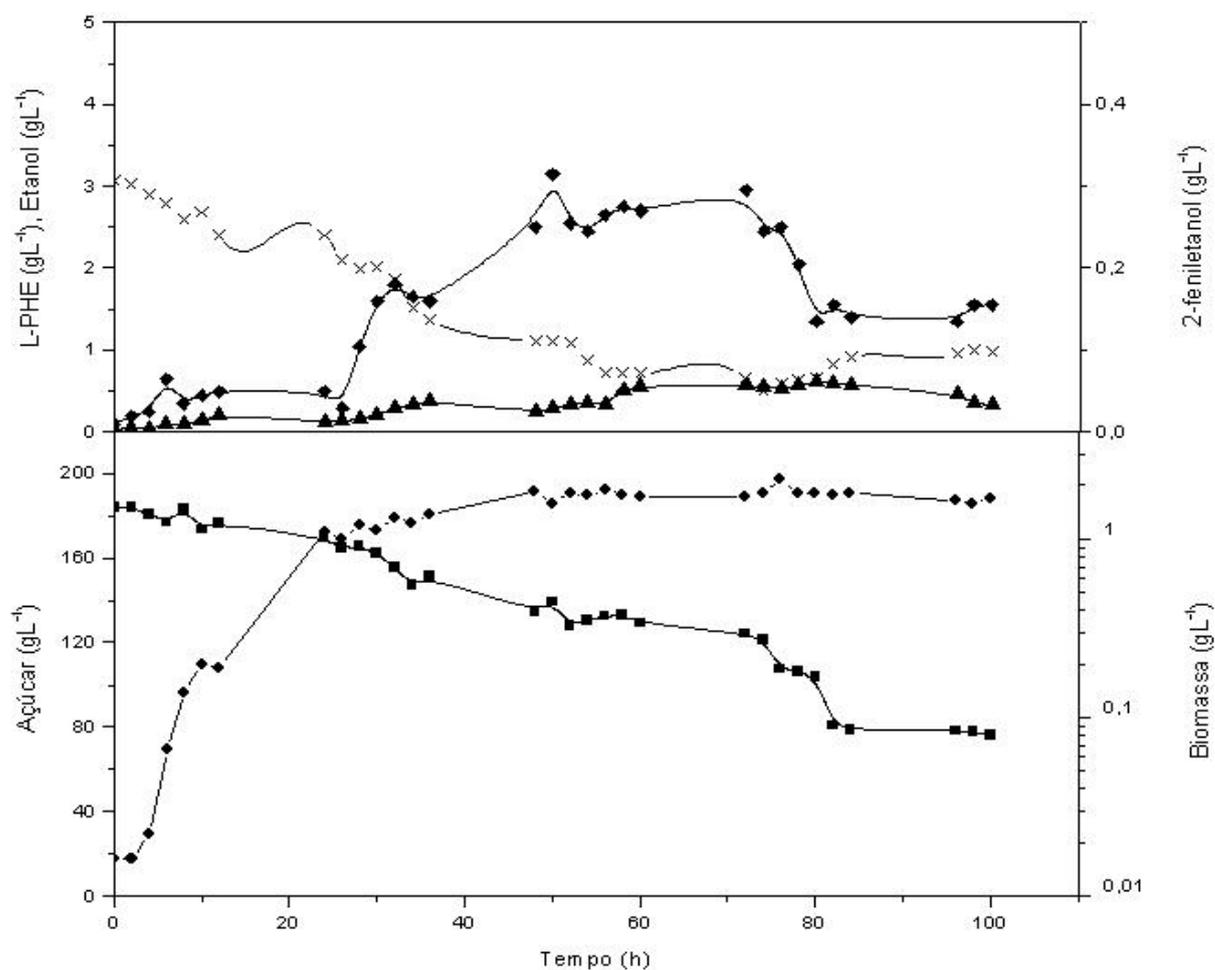
A fase de produção máxima de 2-FE é encontrada quando o crescimento da levedura é reduzido, ou seja, quando se encontra na fase estacionária de crescimento. Neste mesmo período de crescimento ocorre uma maior taxa de consumo de L-PHE. Durante a fase inicial do cultivo, a taxa de consumo de L-PHE é reduzida, levando a uma pequena formação de 2-FE. A taxa máxima de produção de 2-FE ocorre após 9h de cultivo, porém após 14 h diminui, com a depleção da glicose, é observado um aumento na taxa de produção de 2-FE, formando uma segunda fase de produção máxima em 2-FE após 28 h de cultivo (Wittmann *et al.*, 2002).

Em cultivos aerados, uma alta taxa específica de consumo de oxigênio ( $q_{O_2}$ ) e, um baixo rendimento em biomassa ( $Y_{X/S}$ ), induz ao aumento na concentração exógena de 2-FE a uma taxa de diluição constante (Stark *et al.*, 2003a). Além disso, concentrações maiores que  $4 \text{ gL}^{-1}$  de L-PHE no biorreator são necessárias para obter-se  $Y_{2\text{-FE}/\text{L-PHE}}$  maior que  $0,9 \text{ molmol}^{-1}$  (Stark *et al.*, 2002). Num processo convencional de cultivo em biorreatores, foram produzidas  $10,97 \text{ gL}^{-1}$  de biomassa e  $0,97 \text{ gL}^{-1}$  de 2-FE, o qual corresponde a um rendimento ( $Y_{2\text{-FE}/\text{L-PHE}}$ ) de 0,44 (Etschmann *et al.*, 2005).

#### **4.4.2- Produção de 2-FE em condições fermentativas**

Foi utilizado o regime de batelada sem alimentação e com uma agitação (rotor central de pás quadradas) de 250 rpm. Durante as primeiras 20 h de cultivo, a levedura apresenta um crescimento exponencial, porém devido à presença de fontes de nitrogênio facilmente assimilável, há uma constante e diminuta produção de 2-FE. A

FIGURA 9 mostra a produção de 2-FE e outros metabólitos durante o cultivo em biorreator agitado (250 rpm).



**FIGURA 9:** Produção de 2-FE a partir de L-PHE em biorreator da sem aeração, somente com agitação (250 rpm). Biomassa (●), Açúcares redutores (■), 2-feniletanol (◆), Etanol (▲) e L-fenilalanina (×).

Porém, após 24 h de cultivo, a concentração de 2-FE sofre um forte incremento até atingir a produção máxima em 50 h, mantendo-se constante até as 72 h, logo após diminui até a concentração de  $0,19 \text{ gL}^{-1}$  no final do cultivo (100 h). A

diminuição da concentração de 2-FE pode ser devido ao efeito inibitório combinado do etanol e 2-FE, como já afirmado anteriormente. Porém vale ressaltar, que a partir de 80 h de cultivo, a quantidade de células sofre uma diminuição, e conseqüentemente, há um decréscimo no rendimento da bioconversão. Isto porque a produção de 2-FE é relacionada ao crescimento e pode ser descrita pela equação de Ludeking-Piret (Stark *et al.*, 2003).

A quantidade máxima de 2-FE produzida foi de 0,32 gL<sup>-1</sup>, e na bioconversão houve um rendimento de 0,30 gg<sup>-1</sup> ( $Y_{2-FE/L-PHE}$ ). Em condições enológicas de fermentação de mostos, leveduras *S.cerevisiae* var. *uvarum* (cepas criotolerantes) foram capazes de produzir até 0,29 gL<sup>-1</sup> (Bertolini *et al.*, 1996).

Com relação ao consumo de L-PHE, no início do cultivo até 24 h, a utilização de precursor foi insignificante. A partir de 24 h, há um consumo brusco de L-fenilalanina, até 80 h de cultivo, após a concentração de precursor se mantém constante, chegando a 0,99 gL<sup>-1</sup> em 100 h de fermentação. De toda L-PHE suplementada no início do cultivo, a levedura foi capaz de metabolizar 68 % da concentração total de precursor.

Durante todo o cultivo, uma pequena quantidade de etanol foi produzida, chegando ao máximo de 0,515 gL<sup>-1</sup>. *K. maxianus* é uma cepa que possui efeito Crabtree negativo (Rouwenhorst, 1987), ou seja, possui uma alta capacidade respiratória. Alguns autores afirmam que esta cepa não é capaz de formar etanol. Leveduras do gênero *Kluyveromyces* são leveduras respiratórias aeróbias, enquanto que *S. cerevisiae* é uma levedura fermentativa aeróbia (González-Siso *et al.*, 2000). Desta forma, somente condições particulares de cultivo determinam as preferências metabólicas da levedura, e a decorrente produção de etanol (González-Siso *et al.*, 2000).

#### 4.4.3- Produção de 2-FE sob regime de aeração

Estes ensaios foram realizados para avaliar o efeito da aeração e agitação na bioconversão de L-PHE em 2-FE, comparando-se com os dados obtidos durante os experimentos com fermentação. Foram realizados dois diferentes cultivos, o primeiro, com uma aeração de 1vvm e agitação de 250 rpm, e um segundo, com uma aeração de 2 vvm e agitação de 500 rpm. Todos os cultivos foram realizados em duplicata, e as condições de cultivo como descritas anteriormente no capítulo 3, Materiais e Métodos.

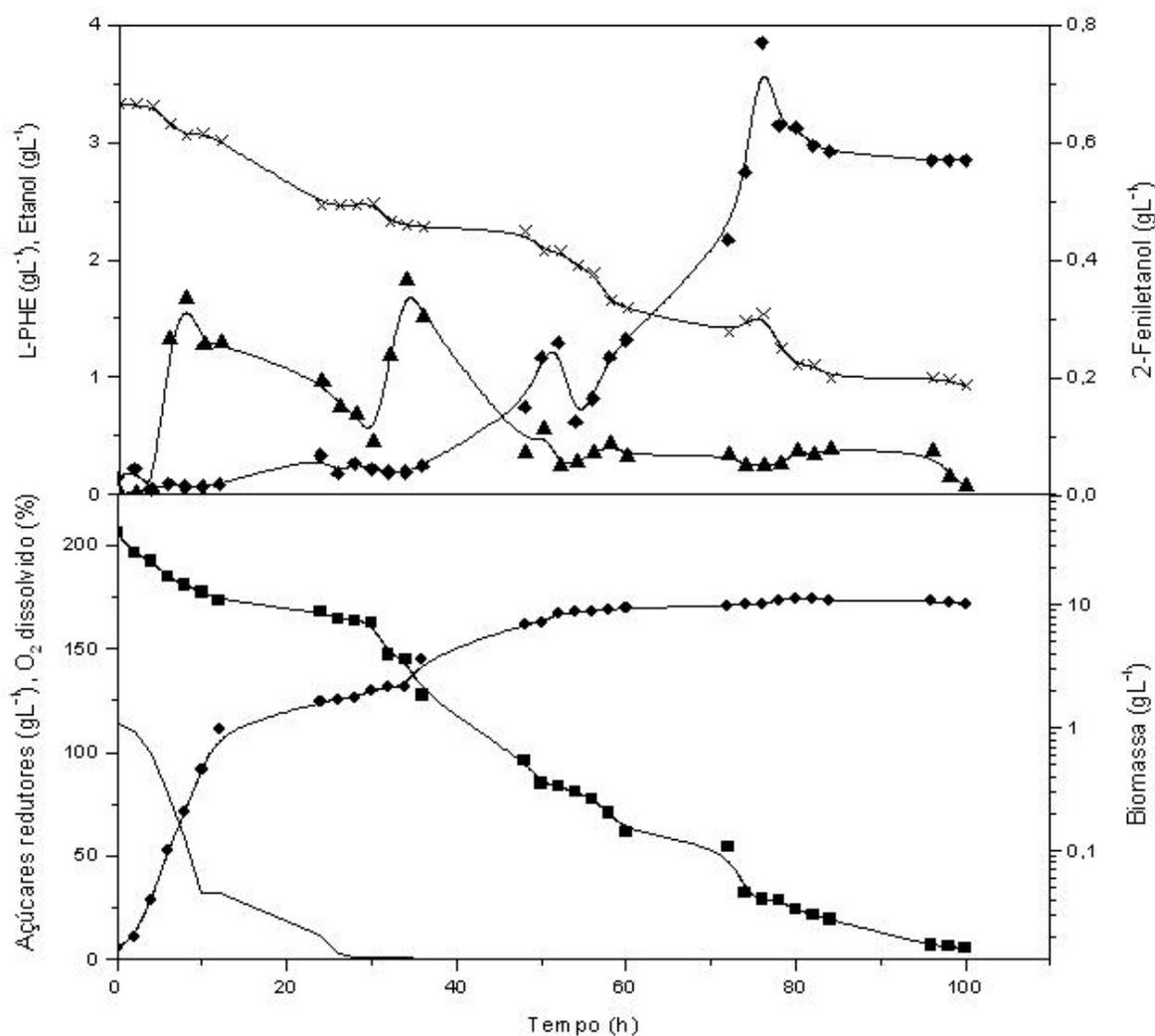
##### 4.4.3.1- Experimento com 1 vvm e 250 rpm

Dentre todos os sistemas de aeração e agitação testados, esta condição (1 vvm e 250 rpm) apresentou os melhores resultados para a produção de 2-FE por *K. marxianus* em mosto de uva. Durante o cultivo, houve um grande acúmulo de biomassa, apresentando um máximo de  $11,2 \text{ gL}^{-1}$ , quando comparado com os experimentos de fermentação. A FIGURA 10 apresenta a cinética de crescimento e produção de metabólitos em cultivo aerado com 1vvm e 250 rpm de agitação.

Um aumento na concentração de biomassa durante o cultivo, pode influenciar fortemente a quantidade 2-FE produzida, visto que, a bioconversão a partir da L-PHE é uma rota associada ao crescimento da levedura. Nas condições de 500 rpm, 1 vvm e  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , a alta formação de 2-FE foi realmente encontrada durante a fase de crescimento celular (Wittmann *et al.*, 2002). Com a redução no rendimento de biomassa a partir da glicose ( $Y_{X/S}$ ), ocorre uma redução na concentração de 2-FE (Stark *et al.*, 2002).

A produção de 2-FE foi aumentada a partir de 40 h de cultivo, onde foi encontrada uma fase de acumulação de aroma. Antes de 40 h, a produção de 2-FE vai aumentando gradativamente com o crescimento celular da levedura (FIGURA 10).

Durante as primeiras 20 h de cultivo, a concentração de 2-FE aumenta com a concentração de biomassa, levando a um rendimento ( $Y_{2-FE/X}$ ) constante de  $0,29 \text{ gg}^{-1}$  (Serp *et al.*, 2003). Logo após é verificada uma queda na produção de 2-FE, porém esta volta a aumentar após 60 h de cultivo.



**FIGURA 10:** Produção de 2-FE e formação de biomassa por *K.marxianus* CBS 6556 em mosto de uva e em biorreatores com 1vvm de aeração e 250 rpm de agitação. Biomassa (●), Açúcares redutores (■), 2-feniletanol (◆), Etanol (▲), L-fenilalanina (×) e oxigênio dissolvido (—).

Desta forma, ocorre uma segunda fase de produção de 2-FE. A concentração de 2-FE vai aumentando, chegando a  $0,77 \text{ gL}^{-1}$  em 76 h de cultivo, depois diminui até  $0,57 \text{ gL}^{-1}$ , mantendo-se constante até o final do cultivo. A levedura *K.marxianus* possui duas fases de produção de 2-FE em cultivos com 1 vvm de aeração e 500 rpm de agitação (Wittmann *et al.*, 2002).

O rendimento máximo em 2-FE ( $Y_{2\text{-FE/L-PHE}}$ ) foi de  $0,62 \text{ gg}^{-1}$ , o qual é mantido até o final do cultivo. Desta forma, pode-se identificar um aumento de 51 % no rendimento, quando comparados com os resultados obtidos com experimentos de fermentação ( $Y_{2\text{-FE/L-PHE}} = 0,30 \text{ gg}^{-1}$ ). Ambas fases de produção máxima de 2-FE aconteceram durante os períodos de maior degradação de L-PHE através da via de Ehrlich.

A concentração de L-PHE foi diminuindo gradativamente com o passar do tempo. Durante as primeiras 20 h de cultivo, o consumo de L-PHE foi muito pequeno, porém sofreu um forte incremento a partir de 40 h de cultivo. Todavia, a concentração total do precursor não foi consumida, restando  $0,92 \text{ gL}^{-1}$  de L-PHE ao final do cultivo (100 h). Somente 74 % de L-PHE foi consumida durante a bioconversão.

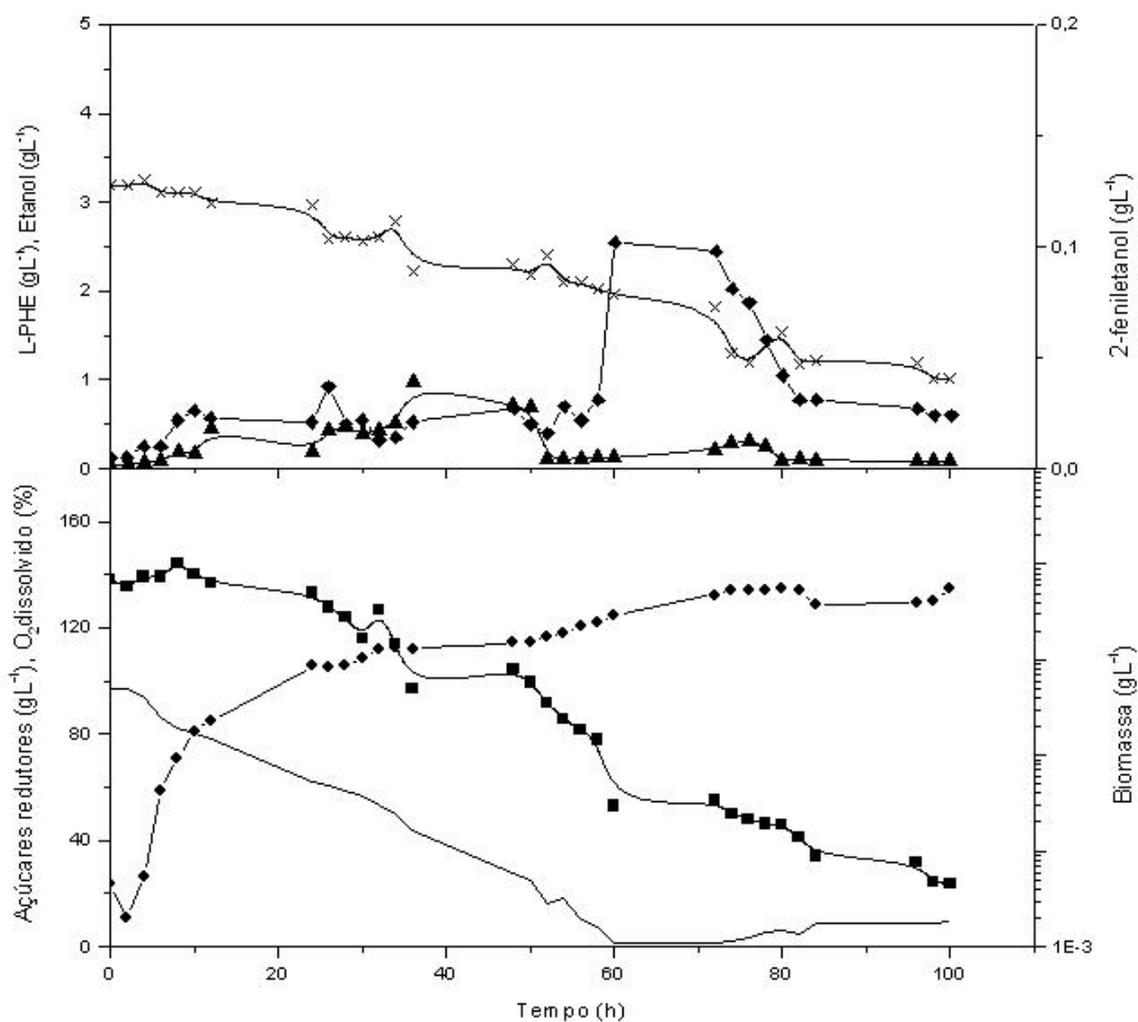
Durante o cultivo, a concentração de etanol produzida foi muito variável, porém ao final obteve-se uma concentração de  $0,069 \text{ gL}^{-1}$  de etanol. No início do cultivo ocorre uma fase de produção crescente de etanol pela levedura, chegando até a concentração de  $1,29 \text{ gL}^{-1}$ , mas a partir de 24 h há uma queda na sua produção. Logo após, em 36 h, encontra-se a produção máxima de etanol,  $1,51 \text{ gL}^{-1}$ . A partir de 56 h de cultivo, a produção de etanol é diminuída, mantendo-se constante até final do cultivo.

Durante o cultivo, foi medida a concentração de oxigênio dissolvida no meio, através da utilização de um eletrodo polarizado. No início do cultivo, a concentração de O<sub>2</sub> era de saturação em meio e foi diminuindo gradativamente com o aumento da concentração de biomassa, chegando a zero após 78 h de cultivo. A diminuição da quantidade de O<sub>2</sub> dissolvida no meio é devido ao crescente aumento na concentração de biomassa, visto que as células vão utilizando o O<sub>2</sub> no processo de respiração celular. Desta forma, foi calculado o k<sub>1a</sub> para os experimentos com aeração, obtendo-se um valor de 1,99 h<sup>-1</sup>, utilizando-se o método dinâmico.

#### **4.4.3.2- Experimento com 2 vvm e 500 rpm**

A FIGURA 11 apresenta a cinética de crescimento e produção de metabólitos no cultivo com 2vvm de aeração e 500 rpm de agitação. Analisando-se a FIGURA 11, observa-se que o aumento na aeração e agitação, não desempenha um fator importante para o aumento na produção de 2-FE. Como nas outras condições de aeração e agitação testadas, no início do cultivo, há uma menor taxa de formação de 2-FE.

Somente a partir de 60 h é que a concentração de 2-FE aumenta, chegando ao máximo de 0,102 gL<sup>-1</sup>, porém logo após, sofre uma diminuição e mantém-se em 0,027 gL<sup>-1</sup> até o final do cultivo (100 h). O aumento na aeração para 2 vvm não propicia um aumento na produção de 2-FE, ao contrário, foram um aspecto negativo para a bioconversão, pois a quantidade total de 2-FE produzido é muito inferior às quantidades obtidas durante o cultivo nas condições de 1vvm e 250 rpm. Além disso, houve um menor acúmulo de biomassa durante o cultivo, o que pode representar um obstáculo para aumentar o rendimento em aroma a partir da bioconversão da L-PHE.



**FIGURA 11:** Produção de 2-FE e formação de biomassa por *K.marxianus* CBS 6556 em mosto de uva e em biorreatores com 2vvm de aeração e 500 rpm de agitação. Biomassa (●), Açúcares redutores (■), 2-feniletanol (◆), Etanol (▲), L-fenilalanina (×) e oxigênio dissolvido (—).

Durante o cultivo, a quantidade de L-PHE consumida foi diminuindo gradativamente com o passar do tempo, mas a partir de 82 h, manteve-se constante, restando no biorreator, ainda  $1 \text{ gL}^{-1}$  de L-PHE após 100 h. Uma pequena quantidade de

etanol foi formada durante todo o experimento, chegando a o máximo de  $0,97 \text{ gL}^{-1}$  em 36 h de cultivo, acumulando-se  $0,09 \text{ gL}^{-1}$  ao final do cultivo.

A produção de biomassa não ultrapassou a quantidade de  $5,69 \text{ gL}^{-1}$ , um valor menor dos resultados obtidos com 1 vvm e 250 rpm. Como a rota de Ehrlich esta associada ao crescimento, uma pequena formação de biomassa pode desempenhar um fator limitante para a obtenção de altos rendimentos na bioconversão. A utilização de oxigênio durante o cultivo, foi aumentando com a maior formação de biomassa durante o cultivo. No início, a quantidade de oxigênio dissolvido era de saturação, a qual foi diminuindo gradativamente até chegar a 2 % em 74 h. Logo após, há um novo aumento na quantidade de oxigênio dissolvido, decorrente do crescimento da levedura ser menor, ou seja, durante a fase estacionária.

Desta forma, foi calculado o  $k_{\text{ia}}$  para estes experimentos, obtendo-se o valor de  $6,04 \text{ h}^{-1}$ .

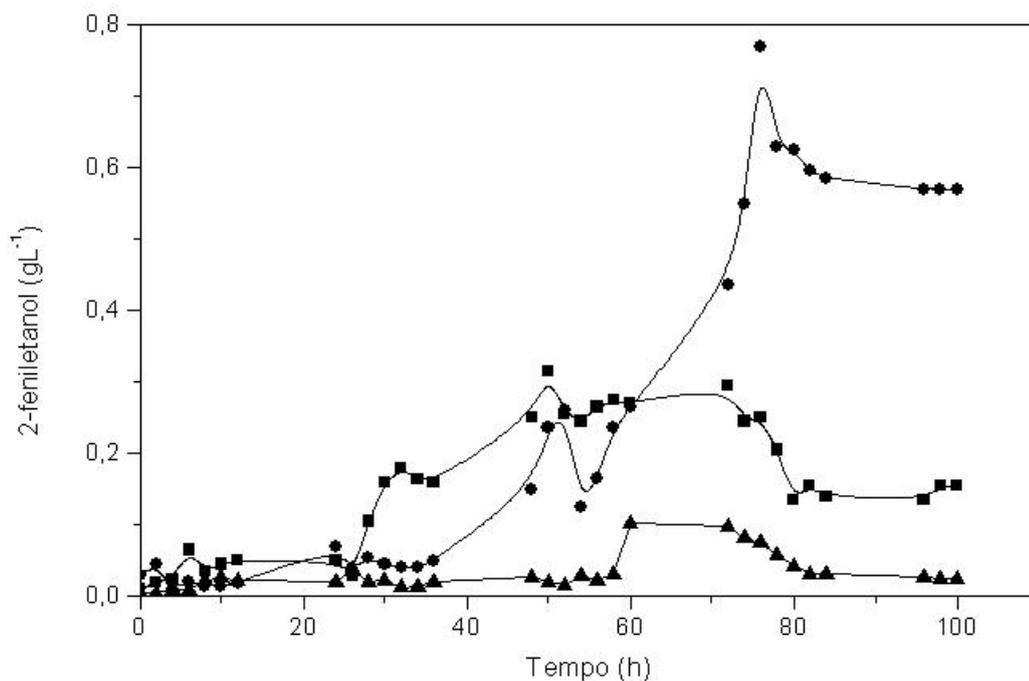
#### **4.4.4- Produção de 2-FE em diferentes condições de aeração e agitação**

Como já mencionado anteriormente, as condições de 1 vvm e 250 rpm, foram as melhores para a obtenção de bons rendimentos para a bioconversão de L-PHE em 2-FE por *K.marxianus* utilizando-se mosto de uva. A FIGURA 12 mostra as diferentes quantidades de 2-FE produzidas nas diferentes condições de aeração e agitação.

Como mostrado na FIGURA 12, a concentração máxima de 2-FE produzida, foi de  $0,77 \text{ gL}^{-1}$ , com um rendimento máximo de  $0,62 \text{ gg}^{-1}$ . Estes resultados demonstram um grande incremento no rendimento em 2-FE quando comparados com os

resultados obtidos nos experimentos com 50 mL de mosto, sem aeração, apenas agitação (agitador orbital). Sendo assim, houve um acréscimo de 46,8 % no rendimento em 2-FE ( $Y_{2\text{-FE}/\text{L-PHE}}$ ). Com a aeração no biorreator, o crescimento celular e posterior acumulação de biomassa, são aumentados, proporcionando uma maior atividade da rota de Ehrlich e, conseqüentemente, elevado rendimento na bioconversão.

Num processo convencional (1,1 L de meio contendo meloço de beterraba, aeração de 1 vvm e 35 °C) foi encontrados 10,7 gL<sup>-1</sup> de biomassa, 0,97 gL<sup>-1</sup> de 2-FE e um rendimento molar ( $Y_{2\text{-FE}/\text{L-PHE}}$ ) de 0,44 (Etschmann *et al.*, 2005).



**FIGURA 12:** Produção de 2-FE nos diferentes sistemas de aeração e agitação testados.

1 vvm e 250 rpm (●), 250 rpm (■) e 2 vvm e 500 rpm (▲).

Utilizando-se leveduras *S. cerevisiae* e 10 gL<sup>-1</sup> de L-PHE, a concentração máxima de 2,9 gL<sup>-1</sup> de 2-FE foi encontrada, com uma produtividade total de 0,14 gh<sup>-1</sup> (Serp *et al.*, 2003). Em cultivos com *S.cerevisiae*, a concentração máxima de 2-FE encontrada foi de 2,6 gL<sup>-1</sup>, 3,8 gL<sup>-1</sup> foi obtida num processo de otimização para uma batelada alimentada, mas a concentração de 2-FE foi aumentada para 12,6 gL<sup>-1</sup> quando o produto foi extraído com ácido oléico (cultivo com uma fase orgânica e outra fase aquosa) (Stark *et al.*, 2003b).

Em culturas de *K. marxianus* a uma aeração de 1 vvm, 500 rpm de agitação e a 40 °C obteve-se um rendimento máximo de 0,65 mol de 2-FE/mol de L-fenilalanina, porém, o coeficiente foi abaixo do ótimo teórico de 1 mol mol<sup>-1</sup> (Wittmann *et al.*, 2002). Desta forma, foi encontrado um rendimento em 2-FE de 0,62 g g<sup>-1</sup>, muito próximo do coeficiente encontrado nas mesmas condições de aeração, ou seja, 1 vvm. Em culturas de *S. cerevisiae* Giv 2009, que é uma cepa industrial utilizada na produção de 2-FE, um rendimento máximo de 0,91 mol mol<sup>-1</sup> foi encontrado (Stark *et al.*, 2002).

O aumento na taxa de aeração no biorreator proporcionou um aumento no rendimento da bioconversão. Porém quando a aeração foi aumentada para 2 vvm, não houve um acréscimo na produção de 2-FE, demonstrando que a aeração no biorreator pode representar um efeito negativo na bioconversão, quando em altas taxas. Contudo, o aumento na aeração para 1 vvm, demonstrou ser altamente benéfico para a bioconversão. Ou seja, das condições testadas, uma aeração de 1vvm e agitação de 250 rpm, com  $k_{ia}$  próximo de 2 h<sup>-1</sup>, foram ideais para se obter um bom rendimento de 2-FE a partir de L-PHE.

## 5- CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O mosto de uva representou ser um ótimo meio para a produção de 2-FE através da rota de Ehrlich. Pois comparando os resultados obtidos com o meio semisintético modificado, nota-se que houve um substancial aumento na concentração de 2-FE obtida com o mosto de uva sem otimização das condições de cultivo. Além disso, a cepa *K. marxianus* CBS 6556 apresentou-se como uma levedura produtora de 2-FE com bons rendimentos. Dentre as cepas testadas, *K. marxianus* CBS 6556 demonstrou ser a melhor produtora.

A utilização da metodologia de superfície de resposta foi considerada como um bom método para a otimização da bioconversão de 2-FE a partir da L-PHE. Mediante esta metodologia, pode-se buscar as melhores condições de cultivo para a obtenção de altos rendimentos na bioconversão. Desta forma, a otimização da produção de 2-FE foi encontrada nas condições de pH 7,0, temperatura de 37 °C e concentração de L-PHE de 3,0 gL<sup>-1</sup>.

Os melhores rendimentos na bioconversão foram encontrados no cultivo em batelada sem alimentação com 1 vvm de aeração e 250 rpm de agitação. Porém em todos os experimentos, o efeito inibitório do 2-FE pode ser considerado como uma causa para a diminuição no rendimento da bioconversão. Por isso, um processo de

extração de 2-FE durante o cultivo deve ser testado, o que poderia aumentar enormemente o rendimento na produção de 2-FE. Além disso, diferentes estratégias de alimentação no biorreator poderiam incrementar o rendimento na bioconversão, minimizando o efeito inibitório do etanol e do próprio 2-FE no metabolismo da levedura.

## 6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, B.G.; BERGER, R.G. Higher fungi for generating aroma components through novel biotechnologies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.42, p.2344-2348, 1994.

ADAMS, T.B. The FEMA GRAS assessment of phenethyl alcohol, aldehyde, acid, and related acetals and esters used as flavor ingredients. **Food and Chemical Toxicology**, v.43, p.1179-1206, 2005.

AKITA, O. et al. Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* producing a large quantity of  $\beta$ -phenethyl alcohol and  $\beta$ -phenethyl acetate. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v.69, n.2, p.125-128, 1990.

BARROS, B.N.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos**. 2.ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1995. 299p.

BAYONOVE, C. Aromas. In: FLANZY, C (Ed.). **Enologia, Fundamentos Científicos y Tecnológicos**. Madrid: Mundi-Prensa: AMV Ediciones, 2000. p. 245-300.

BERTOLINI, L. et al. Higher alcohol production by cryotolerant *Saccharomyces* strains. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v.47, n.3, p.343-345, 1996.

BIDAN, P. Relation entre la teneur des vins en alcools supérieurs et la teneur des moûts en substances azotées en particulier en acides aminés. **Bulletin de L'OIV**, v.536, p. 842-867, 1975.

BOX, H.H. **Statistics for Experiments. An Introduction to Design Data Analysis and Model Building**. New York: J.Wiley, 1978. 395p.

CABRERA, M.J. et al. Formation of ethanol, higher alcohols, esters, and terpenes by five yeast strains in musts from Pedro Ximénes grapes in various degrees of ripeness. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v.39, n.4, p.283-287, 1988.

CROWELL, E.A.; GUYMON, J.F. Influence de l'aération et des matières en suspension sur la teneur en alcools supérieurs, acétoïne et diacétyl pendant la fermentation. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v.14, p.214-222, 1963.

CRUZ, S.H.; CILLI, E.M.; ERNANDES, J.R. Structural complexity of the nitrogen source and influence on yeast growth and fermentation. **Journal of The Institute of Brewing**, v.108, n.1, p.54-61, 2002.

ETSCHMANN, M.M.W. et al. Biotechnology production of 2-phenylethanol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.59, p.1-8, 2002.

ETSCHMANN, M.M.W.; SELL, D.; SCHRADER, J. Screening of yeasts for the production of the aroma compound 2-phenylethanol in a molasses-based medium. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v.25, p.531-536, 2003.

ETSCHMANN, M.M.W.; SELL, D.; SCHRADER, J. Medium optimization for the production of the aroma compound 2-phenylethanol using a genetic algorithm. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v.29, p.187-193, 2004.

ETSCHMANN, M.M.W.; SELL, D.; SCHRADER, J. Production of 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate from L-phenylalanine by coupling whole-cell biocatalysis with organophilic pervaporation. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.92, n.5, p.623-634, 2005.

FABRE, C.E. et al. Identification of volatile flavour compounds obtained in culture of *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v.17, n.11, p.1207-1212, 1995.

FABRE, C.E.; BLANC, P.J.; GOMA, G. Screening of yeasts producing 2-phenylethylalcohol. **Biotechnology Techniques**, v.11, n.7, p.523-525, 1997.

FABRE, C.E.; BLANC, P.J.; GOMA, G. Production of 2-phenylethyl alcohol by *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology Progress**, New York, v.14, p.270-264, 1998.

FABRE, C.E.; CONDORET, J-S.; MARTY, A. Extractive fermentation of aroma with supercritical CO<sub>2</sub>. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.70, n.4, p.392-400, 1999.

FERON, G.; BONNARME, P.; DURAND, A. Prospects for the microbial production of food flavours. **Trends in Food Science & Technology**, v.7, p. 285-293, 1996.

FUKUDA, K. et al. Molecular breeding of a sake yeast with a mutated *ARO4* gene which causes both resistance to *o*-fluoro-DL-phenylalanine and increased production of  $\beta$ -phenethyl alcohol. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v.73, n.5, p.366-369, 1992.

GATFIELD, I.L. Enzymatic generation of flavour and aroma components. In: KING, R.D. (Ed.); CHEETHAM, P.S.J. **Food Biotechnology**. 2v. London: Elsevier, 1988. p.59-82.

GIL, J.V. et al. Aroma compounds in wine as influenced by apiculate yeasts. **Journal of Food Science**, v.61, n.6, p.1247-1249, 1996.

GIUDICI, P.; ROMANO, P.; ZAMBONELLI, C. A biometric study of higher alcohol production in *Saccharomyces cerevisiae*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.36, p. 61-64, 1990.

GONZÁLEZ-SISO, M.I. et al. Respirofermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis*: insights and perspectives. **Enzyme and Microbial Technology**, v.26, 699-705, 2000)

HERNÁNDEZ-ORTE, P.; CACHO, J.F.; FERREIRA, V. Relationship between varietal amino acid profile of grapes and wine aromatic composition. Experiments with model solutions and chemometric study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.50, p.2891-2899, 2002.

HERNÁNDEZ-ORTE, P. et al. Effect of the addition of ammonium and amino acids to musts of Airén variety on aromatic composition and sensory properties of the obtained wine. **Food Chemistry**, London, v.89, p.163-174, 2005.

HUANG, C.J.; LEE, S.L.; CHOU, C.C. Production and molar yield of 2-phenylethanol by *Pichia fermentans* L-5 affected by some medium components. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.90, n.2, p.142-147, 2000

HUANG, C.J.; LEE, S.L.; CHOU, C.C. Production of 2-phenylethanol, a flavor ingredient, by *Pichia fermentans* L-5 under various culture conditions. **Food Research International**, v.34, p.277-283, 2001.

JANSSENS, L. et al. Production of flavours by microorganisms. **Process Biochemistry**, v.27, p.195-215, 1992.

KIRM, I. et al. Preparation of 2-phenylethanol by catalytic selective hydrogenation of styrene oxide using palladium catalyts. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v.239, p.215-221, 2005.

KRINGS, U.; BERGER, R.G. Biotechnological production of flavours and fragrances. **Applied of Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.49, p.1-8, 1998.

LEE, W.C. et al. Optimizing conditions for enzymatic clarification of banana juice using response surface methodology (RSM). **Journal of Food Engineering**, v.73, n.1, p.16-23, 2006.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Principios de Bioquímica**. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 1995. 839p.

LEPE, J.A.S. **Levaduras Vínicas Funcionalidad y Uso en Bodega**. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 1997. 269p.

LEPE, J.A.S. e LEAL, B.I. **Microbiología Enológica, Fundamentos de Vinificación**. 2.ed. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 1992. 547p.

LOMASCOLO, A. et al. *Basidiomycetes* as new biotechnological tools to generate natural aromatic flavours for the food industry. **Trends in Biotechnology**, v.17, p.282-289, 1999.

LOMASCOLO, A. et al. Evaluation of the potential of *Aspergillus niger* species for the bioconversion of L-phenylalanine into 2-phenylethanol. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.17, p.99-102, 2001.

MADAMBA, P.S. The response surface methodology: An application to optimize dehydration operations of selected agricultural crops. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.37, n.7, p.584-592, 2002.

MEDEIROS, A.B.P. et al. Aroma compounds produced by *Kluyveromyces marxianus* in solid state fermentation on a packed column bioreactor. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.17, p.767-771, 2001.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, n.3, p.426-427, 1959.

OLIVEIRA, C. et al. Carotenoid compounds in grapes and their relationship to plant water status. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.51, p.5967-5971, 2003.

OREGLIA, F. **Enología Teórico-Práctica**. 3.ed. Buenos Aires: Ediciones Instituto Salesiano de Artes Gráficas, 1978. 731p.

OUGH, C.S.; BELL, A.A. Effect of nitrogen fertilization of grapevines on amino acid metabolism and higher-alcohol formation during grape juice fermentation. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v.31, n.2, p.122-123, 1980.

PEYNAUD, E. **Knowing and Making Wine**. New York: J.Wiley, 1984. 391p.

PICONE, J.M. et al. Rhythmic emission of floral volatiles from *Rosa damascene Semperflorens* cv. 'Quatre Saisons'. **Planta**, v.219, p.468-478, 2004.

RABENHORST, J. Biotechnology production of natural aroma chemicals by fermentation process. In: REHM, H. J.; REED, G. (Eds.). **Biotechnology**. 2. ed. Weinheim: J.Wiley, 2000. p.331-349. v.8b.

RECH, R. et al. Utilization of protein-hydrolyzed cheese whey for production of  $\beta$ -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.23, p.91 – 96, 1999.

RIBÉREAU-GAYON, J.; PEYNAUD, E. **Traité d'Oenologie**. 2v. Paris: Librerie Plytechnique Ch. Béranger, 1960. 650p.

RIBÉREAU-GAYON, P. et al. **Tratado de Enología**. Buenos Aires: Ediciones Mundi-Prensa, 2003. 537p. 2v.

ROCHA, S.M. et al. Volatile composition of Baga red wine. Assessment of the identification of the World-be impact odourants. **Analytica Chimica Acta**, v.513, p.257-262, 2004.

ROUWENHORST, R. **Production and localization of inulinases in *Kluyveromyces marxianus* yeasts**. 1987. 149 f. Tese (Doutorado) Department of Microbiology and Enzymology-Delft University of Technology, Netherlands, 1987.

SALMON, J.M.; BARRE, P. Improvement of nitrogen assimilation and fermentation kinetics under enological conditions by depression of alternative nitrogen-assimilatory pathways in an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Applied Environmental Microbiology**, v.64, n.10, p.3831-3837, 1998.

SAVINA, J.P.; KOHLER, D.;BRUNERIE, P. Method for extracting 2-phenylethanol. **United States Patent**, New York, n.5.965.780, 1999.

SCHRADER, J. et al. Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavour compounds – current industrial process and future prospects. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v.26, p.463-472, 2004.

SERP, D.; VON STOCKAR, U.; MARISON, I.W. Enhancement of 2-phenylethanol productivity by *Saccharomyces cerevisiae* in two-phase fed-batch fermentations using solvent immobilization. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.82, n.1, p.103-110, 2003.

SERRA, A.; STREHAIANO, P.; TAILLANDIER, P. Influence of temperature and pH on *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* growth; impact of a wine yeast interspecific hybridization on these parameters. **International Journal of Food Microbiology**, v.104, p.257-265, 2005.

SIN, H.N. et al. Optimization of hot water extraction for sapodilla juice using response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v.74, n.3, p.352-359, 2006.

STARK, D. et al. Extractive bioconversion of 2-phenylethanol from L-phenylalanine by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Progress**, New York, v.18, p.514-523, 2002.

STARK, D. et al. Inhibition aspects of the bioconversion of L-phenylalanine to 2-phenylethanol by *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.32, p.212-223, 2003a.

STARK, D. et al. Novel type of In Situ extraction: use of solvent containing microcapsules for the bioconversion of 2-phenylethanol from L-phenylalanine by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.83, n.4, p.376-385, 2003b.

STEINHART, H.; STEPHAN, A.; BÜCKING, M. Advances in flavor research. **Journal of High Resolution Chromatographic**, v.23, n.7/8, p.489-496, 2000.

TANYILDIZI, M.S.; DURSUN, O.Z.; ELIBOL, M. Optimization of  $\alpha$ -amylase production by *Bacillus* sp. using response surface methodology. **Process Biochemistry**, v.40, p.2291-2296, 2005.

TORREA, D. et al. Production of volatile compounds in the fermentation of Chardonnay musts inoculated with two strains of *Saccharomyces cerevisiae* with different nitrogen demands. **Food Control**, v.14, p.565-571, 2003.

VANDAMME, E.J.; SOETAERT, W. Bioflavours and fragrances via fermentation and biocatalysis. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v.77, p.1323-1332, 2002.

VOGT, E. et al. **El Vino, obtención, elaboración y análisis**. 2.ed. Zaragoza: Editorial Acribia S.A., 1986. 294p.

WALKER, T. et al. Analysis of wine components in Cynthiana and Syrah Wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.51, p.1543-1547, 2003.

WATANABE, S. et al. Biogenesis of 2-phenylethanol in rose flowers: Incorporation of [ $^2\text{H}_8$ ] L-phenylalanine into 2-phenylethanol and its  $\beta$ -D-Glucopyranoside during the

flower opening of *Rosa* 'Hoh-Jun' and *Rosa damascena* Mill. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.66, n.5, p.943-947, 2002.

WEBB, A.D. Wine Flavor: Volatile aroma components of wines. In: SCHULTZ ,H.W. (Ed.); DAY, E.A.; LIBBEY, L.M. **Symposium on Foods: The Chemistry and Physiology of Flavors**. Westport, Connecticut: The AVI Publishing Company INC, 1967. p.203-227.

WITTMANN, C.; HANS, M.; BLUEMKE, W. Metabolic physiology of aroma-producing *Kluyveromyces marxianus*. **Yeast**, Chichester, v.19, p.1351-1363, 2002.

ZAMBONELLI, C. **Microbiologia e Biotecnologia dei Vini**. Bologna: Edizioni Agricole. 1999. 300p.