

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE 2-FENILETANOL EM RESÍDUO
LÍQUIDO DE FECULARIA**

SIMONE MARIA MENEGATTI DE OLIVEIRA

CASCAVEL – PARANÁ – BRASIL

JULHO - 2010

SIMONE MARIA MENEGATTI DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE 2-FENILETANOL EM RESÍDUO
LÍQUIDO DE FECULARIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Agrícola, área de concentração em **Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental**.

Orientadora: Profa. Dra. Simone Damasceno
Gomes

**CASCADEL – PARANÁ – BRASIL
JULHO – 2010**

Ficha catalográfica

Elaborada pela Biblioteca Central do Campus de Cascavel - Unioeste

O51a Oliveira, Simone Maria Menegatti de
Avaliação da produção biotecnológica de 2-feniletanol em resíduo líquido de fecularia / Simone Maria Menegatti de Oliveira — Cascavel, PR: UNIOESTE, 2010.
68 f. ; 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Simone Damasco Gomes
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Agrícola, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas.
Bibliografia.

1. Aroma. 2. Cultivo aeróbio. 3. L-fenilalanina. I. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. II. Título.

CDD 21ed. 631

Bibliotecária: Jeanine da Silva Barros CRB-9/1362

SIMONE MARIA MENEGATTI DE OLIVEIRA

“Avaliação da produção biotecnológica de 2-feniletanol em resíduo líquido de fecularia”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Agrícola, área de concentração Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, para aprovação pela seguinte banca examinadora:

Orientadora: Profa. Dra. Simone Damasceno Gomes
 Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, UNIOESTE

 Profa. Dra. Ana Cláudia Barana
 Departamento de Engenharia de Alimentos, UEPG

 Profa. Dra. Luciane Sene
 Centro de Ciências Médica e Farmacêutica, UNIOESTE

 Profa. Dra. Silvia R. Machado Coelho
 Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, UNIOESTE

Cascavel, 07 de julho de 2010

BIOGRAFIA

Simone Maria Menegatti de Oliveira é formada em Farmácia Bioquímica e Industrial, pela Universidade Federal do Paraná no ano de 1989, com especialidade em Homeopatia pelo Instituto Constantine Hering, em 2001.

Atuou na área de Farmácia de Dispensação e de Manipulação, assim como na área de Indústria de Medicamentos na cidade de Cascavel. Trabalha atualmente como docente no curso de graduação em Farmácia, atuando em Estágio em Farmácia de Manipulação na Universidade Estadual do Oeste do Paraná, onde ingressou em 2003, e é mestranda no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, na área de concentração de Recursos Hídricos – Saneamento Ambiental, com a orientação da Professora Dra. Simone Damasceno Gomes.

*Tudo tem o seu tempo
determinado, e há tempo para
todo o propósito debaixo do céu.*

(Eclesiastes 3,1)

*A Deus, pelo seu poder e cuidado em
minha vida, ao meu esposo Wagner,
pelo carinho, apoio e companheirismo,
e aos meus pais Nelson e Idalina pelo
amor, vida e educação.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo cuidado, proteção e pelas oportunidades concedidas em minha vida.

Ao meu esposo Wagner, meu amor e meu companheiro, pelo apoio e incentivo a cada dia, pelo amor e dedicação comigo e com nossos filhos.

Aos meus pais Nelson e Idalina, por me ensinarem a valorizar o saber, por tudo que fizeram e continuam fazendo para que meus sonhos se realizem.

A toda minha família, pelo incentivo e força, especialmente à minha cunhada Vaniza, pelas orações, e à minha sobrinha Patrícia, por cuidar com tanto zelo do Mateus.

A minha orientadora Professora Dra. Simone Damasceno Gomes, exemplo de profissional, pela orientação, amizade, paciência, compreensão e por todo incentivo.

RESUMO

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE 2-FENILETANOL EM RESÍDUO LÍQUIDO DE FECULARIA

O 2-feniletanol é a fragrância mais utilizada na indústria de alimentos, cosmética e de perfumes. É produzido principalmente por processo químico, porém com muitas impurezas. O processo biotecnológico de produção é viável e está sendo estudado com vários microrganismos, entre eles, o *Geotrichum fragrans* (GF), *Saccharomyces cerevisiae* (SC) e *Kluyveromyces marxianus* (KM). O uso de resíduo líquido de fecularia como substrato neste processo torna-o menos dispendioso, além de reduzir a poluição ambiental causada pelo mesmo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de 2-feniletanol no cultivo de GF, SC e KM em resíduo líquido de fecularia, analisando o efeito de duas fontes de carbono na produção do aroma, além de aumentar a produção de 2-feniletanol até a maior eficácia de conversão fonte de carbono/2-feniletanol, variando as concentrações da fonte de carbono e de fenilalanina no resíduo líquido de fecularia. Para isso, os três microrganismos citados foram cultivados em 50 ml de resíduo líquido de fecularia, acrescidos de 50 g.L⁻¹ de glicose e 3 g.L⁻¹ de L-fenilalanina, em frascos erlenmeyers estéreis, em agitador a 150 rpm, 24 °C, por 120 h, para verificar o tempo de maior produção de 2-feniletanol e qual microrganismo maior produtor. Foi então verificada a produção de aroma com 50g.L⁻¹ de glicose e frutose, mantendo a mesma quantidade de L-fenilalanina. E finalmente, através de planejamento fatorial, foram testadas concentrações de glicose e L-fenilalanina, a fim de se obter maior produção e bioconversão de 2-feniletanol. O modelo experimental foi validado. Analisou-se o pH, a DQO, os açúcares redutores, a L-fenilalanina e o 2-feniletanol. No precipitado foi quantificada a biomassa indiretamente como sólidos suspensos voláteis. Os resultados obtidos demonstraram que SC foi o melhor produtor de 2-feniletanol em água residual de fecularia de mandioca, obtendo 0,74 g.L⁻¹, seguido pelo *K. marxianus*, com 0,19 g.L⁻¹ e por último pelo *G. fragrans*, com 0,08 g.L⁻¹. A glicose foi a melhor fonte de carbono para obtenção do 2-feniletanol para *S. cerevisiae* e *K. marxianus*. Não houve diferença significativa entre a produção de 2-feniletanol utilizando glicose ou frutose para o *G. fragrans*. A melhor conjugação dos níveis de glicose e L-fenilalanina para produção de 2-feniletanol foi de 20,0 e 5,5 g.L⁻¹ respectivamente, obtendo produção de 1,33 g.L⁻¹ do aroma na validação.

Palavras chave: aroma, cultivo aeróbio, L-fenilalanina.

ABSTRACT

AVALIATION OF BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF 2-PHENYLETHANOL ON CASSAVA WASTEWATER

2-phenylethanol is the most used fragrance in the food, cosmetics and fragrance industry. It is mainly produced by chemical process, but with many impurities. The biotechnological process of production is feasible and is being studied with various microorganisms, among them, *Geotrichum fragrans*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*. The use of cassava wastewater as substrate in this process makes it less expensive and reduce environmental pollution caused by it. The objective of this work was to evaluate the production of 2-phenylethanol in the cultivation of *Geotrichum fragrans*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* in cassava wastewater, analyzing the effect of two carbon sources on production of the aroma, besides increasing the production of 2-phenylethanol to the greater efficiency of conversion carbon source/2-phenylethanol, varying concentrations of carbon source and phenylalanine at cassava wastewater. For this, the three microorganisms mentioned were cultured in 50mL cassava wastewater plus 50g.L⁻¹ of glucose and 3g.L⁻¹ of L-phenylalanine in sterile Erlenmeyer flasks, on shaker at 150 rpm, 24 °C for 120 hours, to check the time of peak production of 2-phenylethanol and what microorganism largest producer. It was then checked the production of aroma with 50g.L⁻¹ of glucose and fructose, while maintaining the same amount of L-phenylalanine. And finally, by factorial design, were tested concentrations of glucose and L-phenylalanine, in order to obtain higher yield and bioconversion of 2-phenylethanol. The experimental model was validated. It was analyzed in the pH, COD, reducing sugars, L-phenylalanine and 2-phenylethanol. In the precipitate was quantified indirectly as biomass, the Volatile Suspended Solids. The results showed that *S. cerevisiae* was the best producer of 2-phenylethanol in the effluent of cassava starch, obtaining 0.74 g.L⁻¹, followed by *K. marxianus*, with 0.19 g.L⁻¹ and finally by *G. fragrans* with 0.08 g.L⁻¹. Glucose was the best carbon source for obtention of 2-phenylethanol for *S. cerevisiae* and *K. marxianus*. There was no significant difference between the production of 2-phenylethanol using glucose or fructose for *G. fragrans*. The best combination of glucose and L-phenylalanine for production of 2-phenylethanol, was 20,0 and 5.5 g.L⁻¹ respectively, obtaining production of 1.33 g.L⁻¹ of aroma in the validation.

Keywords: aroma, aerobic cultivation, L-phenylalanine.

SUMÁRIO

Ficha catalográfica.....	ii
Elaborada pela Biblioteca Central do Campus de Cascavel - Unioeste.....	ii
RESUMO	viii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo Geral.....	3
2.2 Objetivos Específicos.....	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 2-Feniletanol.....	4
3.2 Produção de Aromas por Microrganismos.....	5
3.3 Microrganismos Utilizados na Produção de Bioaromas.....	7
3.4 Aspectos Bioquímicos da Produção de 2-feniletanol por Microrganismos.....	8
3.5 Substratos na Produção de Aromas.....	10
3.5.1 Resíduo líquido da extração de fécula de mandioca.....	11
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
4.1 Microrganismos.....	14
4.2 Substrato.....	15
4.3 Preparo do Inóculo.....	15
4.4 Avaliação da Produção de 2-feniletanol.....	16
4.5 Métodos Analíticos.....	18
4.5.1 Determinação do 2-feniletanol.....	18
4.5.2 Determinação da L-fenilalanina.....	18
4.6 Análise Estatística.....	19
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
5.1 Caracterização do Substrato.....	21
5.2 Etapa 1 - Produção de 2-feniletanol pelos Microrganismos <i>G. fragrans</i> , <i>K. marxianus</i> e <i>S. cerevisiae</i> , em Função do Tempo.....	22
5.2.1 Produção de 2-feniletanol.....	22
5.2.2 Produção da biomassa, pH, consumo de açúcares redutores e remoção de DQO	24
5.3 Etapa 2 - Avaliação da Fonte de Carbono na Produção de 2-feniletanol.....	29
5.3.1 Produção de 2-feniletanol.....	30

5.4 Etapa 3 - Avaliação das Concentrações da Fonte de Carbono e L-fenilalanina.....	33
5.4.1 Delineamento composto central rotacional.....	36
5.5 Etapa 4 - Validação.....	42
<u>6 CONCLUSÕES.....</u>	<u>46</u>
<u>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</u>	<u>47</u>
<u>REFERÊNCIAS.....</u>	<u>48</u>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Níveis utilizados para o primeiro e segundo DCCR da etapa 3 do cultivo, na busca da melhoria de produção do FE em resíduo líquido de fecularia.....	20
Tabela 2 Composição da água residual obtida em uma fecularia.....	21
Tabela 3 Estatística descritiva da produção de 2-feniletanol em função do tempo.....	22
Tabela 4 Análise de variância para produção de pH, biomassa (g.L-1), remoção de DQO (%) e consumo de açúcares (%) para a etapa 1.....	24
Tabela 5 Parâmetros fermentativos de produtividade (Qp), rendimento em biomassa (Yx/s) e rendimento em produto (Yp/s) para os microrganismos G. fragrans, K. marxianus e S. cerevisiae.....	29
Tabela 6 Análise de variância para produção de FE (g.L-1), pH, biomassa (g.L-1) e remoção de DQO (%) para os microrganismos G. fragrans, K. marxianus e S. cerevisiae, na avaliação da fonte de carbono.....	30
Tabela 7 Dados originais e transformados de produção de FE (g.L-1), pelos microrganismos G. fragrans (GF), K. marxianus (KM) e S. cerevisiae (SC).....	30
Tabela 8 Valores médios de pH, biomassa e remoção de DQO, para G. fragrans, K. marxianus e S. cerevisiae, utilizando como fontes de carbono a glicose ou a frutose.....	31
Tabela 9 Estatística descritiva do consumo de açúcar redutor (%) pelos microrganismos G. fragrans (GF), K. marxianus (KM) e S. cerevisiae (SC), em meios com adição de glicose ou frutose.....	32
Tabela 10 Matriz do planejamento fatorial (2)2 com os níveis (codificados e reais) e respostas quanto à produção de 2-feniletanol (FE).....	33
Tabela 11 Caminho da máxima inclinação quanto à produção de 2-feniletanol (FE).....	35
Tabela 12 Matriz do primeiro planejamento DCCR com os fatores (codificados e reais) e respostas quanto a FE, pH, biomassa, consumo de açúcares redutores, remoção de DQO e bioconversão FE/glicose.....	36
Tabela 13 Matriz do segundo planejamento DCCR com os fatores (codificados e reais) e respostas quanto a FE, pH, biomassa, consumo de açúcares redutores e remoção de DQO.....	38
Tabela 14 Análise de variância para produção de 2-feniletanol do 2º DCCR.....	39
Tabela 15 Média de bioconversão FE/glicose, pH, biomassa, consumo de açúcares redutores e remoção de DQO no cultivo de validação do modelo.....	44
Tabela 16 Parâmetros fermentativos produtividade (Qp), rendimento em biomassa (Yx/s) e rendimento em produto (Yp/s) para S. cerevisiae.....	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 (a) Reação de Friedel-Craft para síntese de FE (BEDOUKIAN, 1986; BAUER; GARBE & SURBURG, 2001). (b) Redução do óxido de estireno para síntese de FE (BAUER; GARBE & SURBURG, 2001).....	5
Figura 2 Metabolismo da L-fenilalanina.....	9
Figura 3 Fluxograma do processamento de 1000 Kg de mandioca para obtenção de fécula.	12
Figura 4 Gráfico do comportamento da produção de FE e pH do meio, para <i>G. fragrans</i> (GF), <i>K. marxianus</i> (KM) e <i>S. cerevisiae</i> (SC), nos tempos de 0 a 120 h.....	25
Figura 5 Produção de biomassa e do consumo de açúcares redutores do meio, para <i>G. fragrans</i> (GF), <i>K. marxianus</i> (KM) e <i>S. cerevisiae</i> (SC), nos tempos de 0 a 120 h.....	26
Figura 6 Comportamento da produção de biomassa e da remoção de DQO do meio, para <i>G. fragrans</i> (GF), <i>K. marxianus</i> (KM) e <i>S. cerevisiae</i> (SC), nos tempos de 0 a 120 h.	28
Figura 7 Diagrama de Pareto dos efeitos dos níveis de glicose e PHE na produção de 2-feniletanol (g.L-1).....	33
Figura 8 Diagrama de Pareto para produção de 2-feniletanol (g.L-1).....	34
Figura 9 Gráfico de contorno com o perfil da produção de FE (g.L-1).....	35
Figura 10 (a) Gráfico de contorno do 1º DCCR com a produção de FE (g.L-1); (b) Gráfico de contorno do 1º DCCR com a bioconversão glicose/FE (g.g-1).....	37
Figura 11 (a) Gráfico de contorno do 2º DCCR com o perfil da produção de FE (g.L-1); (b) Gráfico de contorno do 2º DCCR com o perfil da bioconversão glicose/FE (g.g-1).....	40
Figura 12 Gráfico de superfície de resposta obtido com os dados de produção de FE (g.L-1) e de bioconversão FE/glicose (g.g-1).....	41
Figura 13 Índices de desejabilidade global em função dos níveis de glicose e PHE.....	42
Figura 14 Gráfico da produção de 2-feniletanol e do consumo de L-fenilalanina, em função do tempo, obtido na validação do modelo.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

DQO	- Demanda química de oxigênio
FE	- 2-Feniletanol
PHE	- L-Fenilalanina
SSV	- Sólidos suspensos voláteis
GF	- <i>Geotrichum fragrans</i>
KM	- <i>Kluyveromyces marxianus</i>
SC	- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GLI	- Glicose
HPLC	- Cromatografia líquida de alta eficiência
Q_p	- Produtividade em produto (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
Y_{x/s}	- Rendimento em biomassa (g.g ⁻¹)
Y_{p/s}	- Rendimento em produto (g.g ⁻¹)

1 INTRODUÇÃO

Caracterizado pela delicada fragrância de pétalas de rosas, o 2-feniletanol (FE) é o principal álcool comercial, depois do álcool etílico, e é o aroma mais utilizado nas indústrias de alimentos, cosmética e de perfumes (FABRE; BLANC & GOMA, 1998a; WELSH; MURRAY & WILLIAMS, 1989). É usado também para modificar certas composições de aromas de alimentos como fórmulas com frutas, doces, pudins e gomas de mascar (ETSCHMANN; SELL & SCHRADER, 2002).

Este aroma é produzido principalmente por processo químico. No entanto, devido à preferência do consumidor por aromas naturais, consideráveis tempo e esforço têm sido gastos para desenvolver um processo fermentativo para obter compostos aromáticos considerados naturais (WELSH; MURRAY & WILLIAMS, 1989) ou idênticos aos naturais. Para isso, são usados microrganismos, principalmente da classe dos fungos e leveduras, que apresentam bons resultados na produção deste aroma.

O microrganismo *Geotrichum fragrans*, isolado da água residual do processamento da mandioca, é produtor de aroma de frutas em decorrência da geração de compostos voláteis. Este aroma é detectado nas indústrias de processamento de mandioca (DAMASCENO *et al.*, 2003). O *Kluyveromyces marxianus* é um microrganismo apontado como grande produtor de 2-feniletanol (FE) a partir de variadas fontes de energia (ETSCHMANN, SELL & SCHRADER, 2003). O *Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura facilmente encontrada e já testada em estudos de produção de FE (STARK *et al.*, 2002).

Para que se tornem economicamente viáveis, vários bioprocessos têm sido desenvolvidos, utilizando resíduos como substratos, para a produção de diversas moléculas com alto valor agregado. O uso de resíduos agrícolas como substratos em bioprocessos, além da economia, ajuda a minimizar os problemas ambientais decorrentes do seu acúmulo na natureza (ALEXANDRINO *et al.*, 2007).

A mandioca é cultivada em todo o território nacional, concentrando-se na região sul as unidades processadoras de pequeno ou de grande porte, tanto de farinha quanto de fécula. Essa industrialização, ainda que agregue valor à matéria prima e, por isto, esteja em franco desenvolvimento, gera subprodutos ou resíduos que agridem o meio ambiente, com forte impacto ecológico (WOSIACKI & CEREDA, 2002).

O líquido residual do processamento da mandioca é gerado em grandes volumes, chegando a 5000 litros por tonelada de raiz processada. Além disto, apresenta altas concentrações do íon cianeto (CN⁻¹) e do ácido cianídrico (HCN), substâncias tóxicas por sua capacidade de bloquear o transporte de oxigênio no metabolismo de seres vivos (FIORETTO, 2001).

Sendo as indústrias de amido consideradas altamente poluidoras, a utilização do resíduo líquido da extração de fécula de mandioca como substrato para o cultivo de fungos e leveduras, na obtenção de compostos de aromas, pode ser uma proposta significativa para diminuir a poluição e agregar valor ao resíduo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a produção de 2-feniletanol no cultivo de *Geotrichum fragrans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus* em resíduo líquido de fecularia.

2.2 Objetivos Específicos

Selecionar o microrganismo maior produtor de 2-feniletanol e o tempo de cultivo para maior produção.

Avaliar o efeito de duas fontes adicionais de carbono na produção de 2-feniletanol pelos três microrganismos em estudo, em resíduo líquido de fecularia.

Utilizar o microrganismo maior produtor e a melhor fonte de carbono, para avaliar o efeito de diferentes concentrações da fonte de carbono e de L-fenilalanina, visando maior eficiência de conversão 2-feniletanol/fonte de carbono e maior produção de 2-feniletanol.

Realizar cinética de validação das condições ótimas de fonte de carbono e L-fenilalanina, obtidas na etapa anterior.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 2-Feniletanol

O 2-feniletanol (FE) é um álcool aromático com um odor semelhante ao de rosas. A fragrância de rosas é muito popular e desejada, fazendo que o FE seja o aromatizante mais usado em perfumes e cosméticos (FABRE; BLANC & GOMA, 1998b). É também usado para melhorar o sabor dos alimentos, como refrigerantes, biscoitos, chicletes, pudim, entre outras aplicações. Possui também efeito bactericida em *Escherichia coli*, cujo principal efeito é uma desagregação limitada da membrana celular e como efeito secundário ocorre a inibição da síntese do ácido desoxirribonucleico e de outras funções celulares da bactéria (SILVER & WENDT, 1967).

De maneira geral, as moléculas aromáticas podem ser classificadas devido à sua origem, em aromas naturais e aromas sintéticos. SCHRADER *et al.* (2004) afirmam que *flavors* naturais se referem a produtos derivados de bioprocessos iniciados por substratos naturais, os quais já foram identificados em plantas ou outras fontes naturais.

Aromatizantes são substâncias ou misturas de substâncias com propriedades odoríferas e ou sápidas, capazes de conferir ou intensificar o aroma e ou sabor dos alimentos (BRASIL, 2007). São necessários, pois alguns produtos perdem parte de seu sabor durante o processo de industrialização (CARVALHO, 2005). Os aromas também são usados para melhorar o sabor dos medicamentos (BALBANI; STELZER & MONTOVANI, 2006), sendo importantes para as indústrias de alimento, cosmética, farmacêutica e química.

Aromatizantes idênticos aos naturais é o termo que define mais corretamente o FE obtido biotecnologicamente. São substâncias quimicamente definidas, obtidas por síntese e aquelas isoladas por processos químicos a partir de matérias-primas de origem animal, vegetal ou microbiana que apresentam uma estrutura química idêntica às substâncias presentes nas referidas matérias-primas naturais (KUMAR; RAWLINGS & BEAMAN, 1993; BRASIL, 2007). Existe uma tendência atual na preferência dos consumidores na direção de fragrâncias naturais, motivando o desenvolvimento biotecnológico de aromas (PINOTTI *et al.*, 2006).

O FE ocorre naturalmente nos óleos essenciais de flores e plantas, como rosas, jasmim, narcisos e lírios, mas na maioria dos casos, as concentrações são muito baixas para justificar a extração (SENDOVSKI; NIR & FISHMAN, 2010). Por isso, o FE comercial é produzido principalmente usando métodos químicos, através da reação de Friedel-Craft

(Figura 1a), usando óxido de etileno com benzeno na presença de quantidades molares de cloreto de alumínio (BEDOUKIAN, 1986), também pela redução do óxido de estireno (Figura 1b) usando níquel como catalisador e pequenas quantidades de hidróxido de sódio, a baixas temperaturas, ou ainda como um subproduto da produção de óxido de propileno. Um subproduto de resíduos pesados é desidratado na presença de um ácido inorgânico forte, abaixo da pressão atmosférica e temperaturas entre 150 e 250°C, para produzir estireno e recuperar FE (ESCRIG, 1999).

Em todos os processos químicos, a purificação do produto é um grande problema. Estes métodos envolvem reagentes tóxicos e condições adversas, criando, assim, subprodutos que reduzem a qualidade final do FE (ETSCHMANN; SELL & SCHRADER, 2002). Conseqüentemente, a via biotecnológica pode fornecer FE com elevada pureza por ser executada em processo ambientalmente não agressivo.

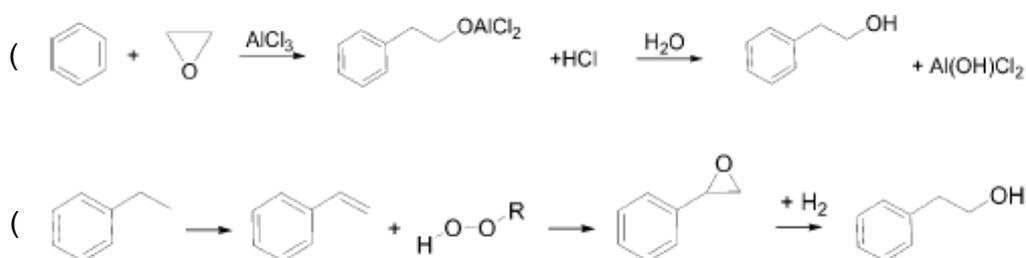


Figura 1 (a) Reação de Friedel-Craft para síntese de FE (BEDOUKIAN, 1986; BAUER; GARBE & SURBURG, 2001). (b) Redução do óxido de estireno para síntese de FE (BAUER; GARBE & SURBURG, 2001).

Fonte: ETSCHMANN, SELL & SCHRADER (2002).

3.2 Produção de Aromas por Microrganismos

Os primeiros relatos de microrganismos produtores de aromas datam da década de 70, quando TAHARA & MIZUTANI (1975) avaliaram a produção de aromas por *Sporobolomyces odorus*. Os compostos identificados foram: metanol, etanol, álcool isobutílico, n-butílico, isoamílico, n-amílico, benzílico, feniletílico, formaldeído, acetaldeído, benzaldeído, fenil-acetaldeído, acetona, metil-etil-cetona, formiato de etila, acetato de etila, di-n-butyl ftalato, γ -decalactona, ácido 4-hidroxi-cis-6-dodecanoico e γ -lactona. DRAWERT & BARTON (1978) relataram o processo de biossíntese de monoterpenos (citronelol, linalol e geraniol) a partir de glicose, pela levedura *Kluyveromyces lacti*.

JANSSENS *et al.* (1988) estudaram a produção de ésteres por *Geothricum penicillinatum*. Foram identificados os seguintes componentes: acetato de propila, crotoato de etila, propionato de isobutila, valerato de etila, butirato de isobutila, isohexanoato de etila, propionato de isopentila, hexanoato de etila e β -fenil-etil-acetato. A produção dos diferentes ésteres ocorreu em momentos diferentes do crescimento do microrganismo. A alta produtividade e especificidade dos ésteres produzidos dependeram do tipo de fonte de nitrogênio e da adição de precursores.

PASTORE *et al.* (1994), pelo isolamento de linhagens de leveduras obtidas de pólen de flor, frutas maduras e plantas, isolaram uma linhagem de *Geothricum* sp de mamão. Após dois dias de incubação, por meio de testes sensoriais, foi verificada a presença de aroma que se assemelha ao de maçã e morango. Os compostos encontrados em maior concentração foram identificados como: acetato de etila, 2-propanol, propionato de etila, butirato de etila, 2-metil-1-propanol, isovalerato de etila, 3-metil-1-butanol e hexanoato de etila.

BRAMORSKI (1997) estudou a produção de metabólitos voláteis durante o cultivo de *Rhizopus oryzae* em diferentes substratos sólidos agroindustriais como bagaço de mandioca, farinha de soja, bagaço de maçã e amaranto e identificaram os seguintes compostos: etanol, acetato de etila, acetaldeído, etilpropionato e 3-metil butanol, sendo o etanol o composto encontrado em maior concentração (80%) em todos os cultivos.

SOUZA NETO, PASTORE & MACEDO (2004) selecionaram microrganismos produtores do composto de aroma gama-decalactona, utilizando o óleo de mamona hidrolisado pela lipase de *Alcaligenes* sp, como precursor, em cultivo submerso. Duas linhagens identificadas como *Geothricum* sp e *Geothricum fragrans* foram selecionadas como produtoras do aroma.

COSTELLI *et al.* (2004) estudaram a produção do flavorizante acetoína pela bactéria *Bacillus polymyxa* utilizando glicose como fonte de carbono em condições aeróbicas.

UENOJO (2003) estudou a produção e caracterização de aromas de frutas por microrganismos pectinolíticos utilizando resíduos agroindustriais. Foram selecionados quatro microrganismos pectinolíticos, de acordo com a capacidade de produção de pectinases e de produção de aromas frutais. Os compostos foram separados e identificados por cromatografia gasosa e espectrometria de massa como acetona, acetato de etila, etanol, isobutanol, álcool isopentílico (álcool amílico), acetoína (2-butanona-3- hidroxi), ácido acético, ácido isobutírico, ácido butírico, ácido 2-metil butanoico, álcool benzílico e 2-feniletanol.

MAMEDE & PASTORE (2004) avaliaram a produção de compostos voláteis da fermentação de mosto de uva por leveduras isoladas da região da "Serra Gaúcha" (RS),

Kloeckera apiculata e *S. cerevisiae*. A *K. apiculata* produziu altas concentrações de acetato de etila e acetato de isoamila, ésteres de grande importância sensorial.

MAMEDE & PASTORE (2007) também avaliaram os mostos de uva Chardonnay e Pinot Noir fermentados pela *Pichia membranaefaciens*, detectando a presença de compostos voláteis como: etanol, acetato de etila, acetato de isoamila, acetaldeído, 1-propanol, isobutanol e álcool isoamílico que foram isolados e quantificados.

PEREIRA (2007) estudou a produção de metabólitos voláteis frutais, especialmente o acetato de amila, por KM em cultivo submerso em meio à base de melaço de soja. Os melhores resultados foram obtidos utilizando álcool isoamílico como precursor.

3.3 Microrganismos Utilizados na Produção de Bioaromas

Vários estudos com o gênero *Geotrichum* sp têm sido realizados na bioconversão de resíduos. BERGER *et al.* (1999) e GUICHARD & BONNARME (2005) pesquisaram o *Geotrichum candidum* na produção de compostos voláteis de enxofre, muito utilizados na fabricação de queijos curados.

UENOJO (2003) estudou a produção e caracterização de aromas de frutas por microrganismos pectinolíticos utilizando-se resíduos agroindustriais de materiais relacionados com café, como casca de café, folhas de cafeeiro, terra de cafezal, água de lavagem de café.

Quanto à produção de FE, há uma grande variedade de leveduras que reconhecidamente o produzem. SC (ETSCHMANN; SELL & SCHRADER, 2002; STARK *et al.*, 2002) e KM (WITTMANN; HANS & BLUEMKE, 2002; GARAVAGLIA *et al.*, 2007) são conhecidas pela grande produção de FE a partir da PHE.

A célula de *S. cerevisiae*, que utiliza glicose ou sacarose como fonte de energia, é um dos biocatalisadores mais versáteis e de baixo custo. A facilidade de manuseio, que não requer nenhum cuidado especial, o faz alvo de escolha quando se deseja conduzir reações de oxidação-redução (FANTIN *et al.*, 1994).

KM é um dos melhores produtores de FE descritos na literatura (WITTMANN; HANS & BLUEMKE, 2002). Além de sua aplicação em processos industriais, não é patogênico e apresenta alto rendimento (GARAVAGLIA, 2006). O KM é uma levedura que apresenta várias características fisiológicas importantes, cresce muito rapidamente, possui alta afinidade com vários açúcares, metaboliza a lactose, xilose, rafinose e sacarose, produz pequenas quantidades de etanol (ROUWENHORST, 1987) e é inócuo à saúde humana (WITTMANN; HANS & BLUEMKE, 2002). Se comparado com SC, o KM pode metabolizar

uma maior quantidade de substratos, principalmente oriundos de processos industriais e que apresentam baixo custo (ROUWENHORST, 1987)

O GF é uma levedura produtora de FE (DAMASCENO *et al.*, 2003) isolada dos resíduos da indústria da mandioca, o que indica que o mesmo é resistente a teores elevados de cianeto. Pesquisadores como UENOJO & PASTORE (2006) têm atuado na área de isolamento e seleção de microrganismos a partir de resíduos provenientes de agroindústrias para produção de aromas.

DAMASCENO *et al.* (2001) identificaram os compostos voláteis: 1-butanol, 3-metil 1-butanol (álcool isoamílico), 2- metil 1-butanol (álcool amílico ativo), 1-3 butanodiol e o feniletanol; etil acetato, etil propionato, 2-metil etil propionato e 2-metil propanoico, confirmando as informações de JANSSENS *et al.* (1992), de que o *Geotrichum* é um gênero produtor, principalmente, de compostos pertencentes à classe dos ésteres, álcoois e ácidos e produtor de aromas de frutas.

3.4 Aspectos Bioquímicos da Produção de 2-feniletanol por Microrganismos

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 (GARAVAGLIA, 2006). As leveduras produzem naturalmente FE (JANSSENS *et al.* 1988), no entanto, a produção do FE é aumentada, quando em cultivos de leveduras são adicionados L-fenilalanina (PHE), um isômero do aminoácido aromático fenilalanina (GARAVAGLIA, 2006).

Segundo ETSCHMANN, SELL & SCHRADER (2002), o FE pode ser sintetizado em leveduras a partir do PHE por descarboxilação a feniletilamina (Figura 2), seguido por desaminação oxidativa para fenilacetaldeído e redução para álcool. No entanto, não há indícios de que essa reação é de alguma importância. A via comumente aceita da PHE para FE é por transaminação do aminoácido para fenilpiruvato, descarboxilação para fenilacetaldeído e redução a FE, descrita pela primeira vez por F. Ehrlich e, conseqüentemente, recebendo seu nome (EHRlich, 1907). Também pode ser formado FE sem a PHE, através da via do chiquimato. A eritrose-4-fosfato e fosfoenolpiruvato oriundos da glicólise e da via das pentoses-fosfato, respectivamente, são condensados com corismato e prefenato como intermediários levando a fenilpiruvato, o mesmo obtido na via de Erlich por descarboxilação da PHE.

ETSCHMANN, SELL & SCHRADER (2002) estudaram a produção biotecnológica do FE e concluíram que até aquele momento, o domínio da alimentação pela via de Ehrlich, tendo o PHE como precursor continua a ser a melhor opção. Essa possibilidade, no entanto, não resolve o problema da toxicidade do FE para as membranas celulares. Enquanto não forem descobertos microrganismos FE-tolerantes, busca-se uma técnica eficiente e industrialmente aplicável, de preferência um bioprocessamento integrado para retirar o FE.

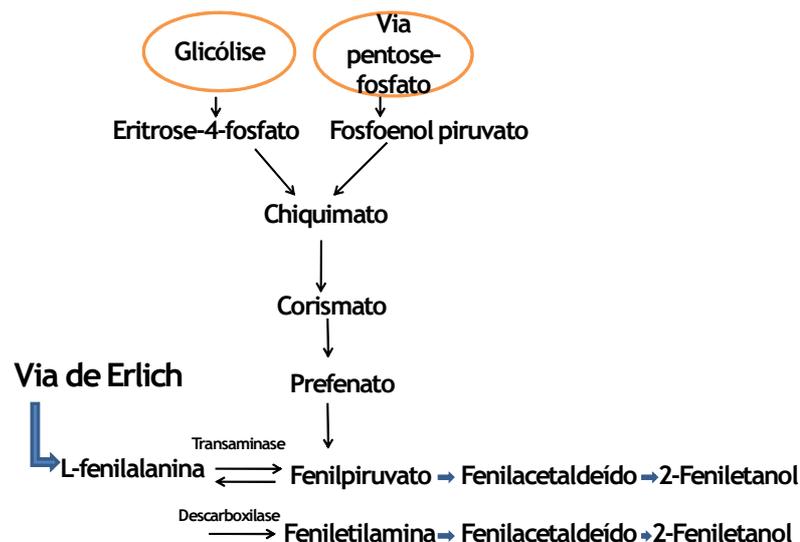


Figura 2 Metabolismo da L-fenilalanina.

Fonte: ETSCHMANN, SELL & SCHRADER (2002).

GARAVAGLIA (2006) obteve os melhores rendimentos de FE com 3 g.L⁻¹ de precursor, utilizando o *K.marxianus*; além disto, segundo FABRE, BLANC & GOMA (1998b), se utilizar 2 g.L⁻¹ de L-PHE, em torno de 50% do precursor é rapidamente consumido em 24 h. No entanto, aumentando até 5 g.L⁻¹, não há um aumento significativo na produção de FE.

SERP, VON STOCKAR & MARISON (2003) demonstraram que na bioconversão de PHE a FE por *S. cerevisiae*, concentrações de FE maiores que 2,9 g.L⁻¹ têm um impacto negativo sobre a capacidade oxidativa da levedura. Sem um controle sobre a produção de etanol, e conseqüentemente, sobre a taxa de alimentação, o etanol rapidamente se acumula no meio de cultura, resultando em completa inibição do crescimento celular antes do FE atingir a concentração máxima de 3,8 g.L⁻¹, obtida na ausência de produção de etanol. Os autores conseguiram aumentar a produtividade da levedura fazendo a remoção do FE por meio de uma matriz polimérica de polietileno contendo solvente orgânico. ETSCHMANN & SCHRADER (2006) também fizeram a remoção do FE em um cultivo de KM, a fim de aumentar a produção do FE.

STARK *et al.* (2002) estudaram os aspectos inibitórios da bioconversão da PHE em FE pelo *S. cerevisiae*. Concluíram que, entre outros fatores, o etanol possui grande efeito inibitório sobre esta bioconversão.

A produção de FE também depende da aeração a que se submete o cultivo. GARAVAGLIA *et al.* (2007) verificaram que as condições de aeração de 1 vvm (2,5 L.min⁻¹) e 250 rpm foram melhores para o cultivo do que 2 vvm e 500 rpm. Aquela condição apresentou os melhores resultados para a produção de FE por *K. marxianus* em mosto de uva, pois os pesquisadores obtiveram 11,2 g.L⁻¹ de biomassa, obtendo 0,77g.L⁻¹ de FE.

HUANG, LEE & CHOU (2001) verificaram que o crescimento e a produção de FE pela *Pichia fermentans* melhoraram com o aumento da velocidade de agitação, apresentando os melhores valores a 250 rpm, e obtendo 524,4 mg.L⁻¹. DAMASCENO *et al.* (2003) usaram agitação de 150rpm a 24°C para produzir compostos de aroma pelo *G. fragrans*.

3.5 Substratos na Produção de Aromas

DAMASCENO *et al.* (2001) trabalharam com o *G. fragrans*, fazendo a complementação da manipueira com glicose e frutose como fontes de carbono e enriquecendo-a com extrato de levedura.

PINOTTI *et al.* (2006) utilizaram fontes de carbono como melaço de cana adicionado de peptona e água de milho adicionada de peptona, em que a adição dos aminoácidos isolados alanina, leucina e valina aumentaram significativamente a produção de aroma pelo *Geotrichum candidum*. Alguns compostos voláteis não foram encontrados nos meios que não foram suplementados com os aminoácidos.

REZENDE *et al.* (2003) fez um estudo do consumo de acetonitrila por *G. fragrans* em meio contendo 0.1% K₂HPO₄, 0.02% MgSO₄.7H₂O e 0.01% NaCl e de 0.5 até 2 M de acetonitrila, detectando a presença do sistema enzimático para a degradação da acetonitrila.

GARAVAGLIA (2006) utilizou mosto de uva complementado com PHE 3 g.L⁻¹ em um biorreator. Testou a produção de FE por *K. marxianus* e *S. cerevisiae*, sendo o primeiro melhor produtor, obtendo 0,77g.L⁻¹ de FE.

DAIGLE *et al.* (1999) estudaram a produção de aromas por *Geotrichum candidum* em resíduos de panificação (pães brancos e integrais), encontrando concentrações de etil ésteres, após 48-72 h de fermentação. Obtiveram cerca de 160 mg.Kg⁻¹ de etilpropionato, 60 mg.Kg⁻¹ de etilacetato, 65 mg.Kg⁻¹ de etilisobutirato, 25 mg.Kg⁻¹ de etilburitato.

MEDEIROS *et al.* (2000) fizeram um estudo de otimização da produção de compostos de aroma por KM, usando fermentação no estado sólido em bagaço de mandioca, obtendo os valores máximos de compostos voláteis em 48 h de fermentação.

A utilização de bioprecusores para a obtenção de determinados produtos de leveduras é um recurso que pode ser utilizado, como foi observado por GARAVAGLIA (2006), quando utilizou PHE (PHE) para a obtenção de FE, utilizando mosto de uva como substrato e a levedura *K. marxianus*.

3.5.1 Resíduo líquido da extração de fécula de mandioca

O Brasil ocupa a segunda posição na produção mundial de mandioca (12,7% do total), contribuindo com 27,5 milhões de toneladas por ano (IBGE, 2010). A mandioca tem papel importante na alimentação humana e animal, como matéria-prima para inúmeros produtos industriais e na geração de emprego e de renda (SOUZA & FIALHO, 2010).

O Estado do Paraná ocupa o terceiro lugar na produção nacional da raiz, apresentando a maior produtividade agrícola e o maior parque industrial, contribuindo com uma média anual de 65% da produção brasileira de fécula (GROXKO, 2010).

A produção brasileira de fécula no ano de 1990 era de 170 mil toneladas passando para 667 mil em 2002. Nos anos de 2003 e 2004, houve queda na produção devido à escassez de matéria prima, porém nos anos seguintes a produção voltou a crescer, alcançando 565,11 mil toneladas no ano de 2008 (ABAM, 2010).

No processo de industrialização da mandioca são gerados diversos resíduos, tais como casca, farelo e resíduos líquidos. Os resíduos líquidos podem ser divididos em duas categorias: as águas de lavagem das raízes e a água proveniente da prensagem da massa da mandioca ralada, denominada água de prensagem ou manipueira (OLIVEIRA; REIS & NOZAKI, 1999). Na fabricação da fécula, a este montante deve ser computada a água agregada ao processo, o que ocasiona um volume maior de efluente industrial mais diluído. COLIN *et al.* (2006) citam que uma indústria que processa o equivalente a 4 t de raiz diárias para produção de fécula pode gerar aproximadamente 4,4 m³ de água residuária, o que resulta em uma relação de 1,1 m³ de resíduo gerado para cada 1 t de mandioca processada.

O processo de extração de amido, independente da matéria-prima utilizada, consiste das etapas de lavagem, desintegração para liberação dos grânulos de amido, separação das fibras e material solúvel e secagem. Os líquidos gerados no processo são compostos pela água de constituição da matéria prima e também água residual do processo (LEONEL, 2001).

A Figura 3 apresenta o fluxograma do processo industrial para o processamento de 1000 kg de mandioca para obtenção de fécula, com as quantidades de entradas e saídas de insumo, matéria prima, produto e subprodutos.

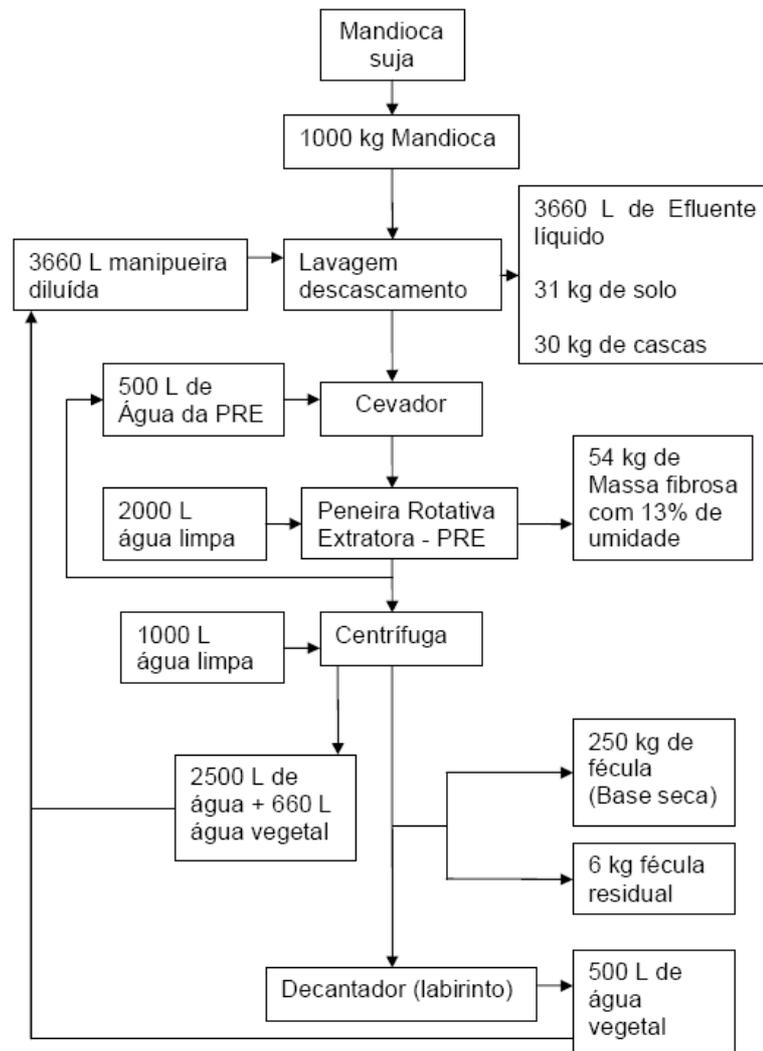


Figura 3 Fluxograma do processamento de 1000 Kg de mandioca para obtenção de fécula.

Fonte: KUCZMANN (2007).

PRADO (2000) considera que a água vegetal, resultante do processo de extração do amido de mandioca, é responsável por 90% da carga poluidora do efluente das fecularias.

Segundo FIORETTO (2001), os líquidos resultantes do processamento da mandioca para produção de farinha e fécula podem atingir vazões de 5000 litros de água por tonelada de raiz processada. O efluente gerado apresenta ainda concentrações do íon cianeto (CN^{-1}) e do ácido cianídrico (HCN), substâncias tóxicas por sua capacidade de bloquear o

transporte de oxigênio no metabolismo de seres vivos. Por essa razão, as indústrias de amido são consideradas altamente poluidoras.

A manipueira é tóxica devido à presença da linamarina, um glicosídeo cianogênico que é hidrolisado enzimaticamente a cianeto (CEREDA, 1994), com Demanda Química de Oxigênio (DQO) que pode chegar a $100 \text{ gO}_2\text{L}^{-1}$ (RIBAS & CEREDA, 2004) e, portanto, imprópria para consumo humano, animal e despejos em cursos d'água (GODOY & SANTOS, 2010). SOLOMONSON (1981) já relatavam a extrema toxicidade do cianeto às formas de vida aeróbicas, pela inativação da respiração, devido à inibição da citocromo C oxidase, inibindo o transporte eletrônico. No entanto, o resíduo líquido do processamento da mandioca possui carboidratos, açúcares redutores, nitrogênio, fósforo, potássio e cálcio (LEONEL & CEREDA, 1995), substâncias que viabilizam o crescimento de microrganismos em processos biotecnológicos.

O resíduo líquido da extração de fécula de mandioca tem sido bastante estudado em processos biotecnológicos para obtenção de produtos úteis. NITSCHKE, FERRAZ & PASTORE (2004) demonstraram a produção de biosurfactantes por microrganismos, inclusive com melhores resultados do que o soro de leite e o melaço. LEONEL & CEREDA (1995) utilizaram a manipueira para a obtenção do ácido cítrico, como forma de reduzir os custos de produção. DAMASCENO *et al.* (2003) também obtiveram, a partir da manipueira, a produção de aromas. DAMASCENO *et al.* (2001) trabalharam com a manipueira complementada com de glicose ou frutose e autolisado de levedura, utilizando *G. fragrans*, para a produção de compostos de aromas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismos

Foram utilizados três microrganismos, o *G. fragrans* isolado dos resíduos de uma fecularia, o *S. cerevisiae* obtido do laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE e o *K. marxianus*, cepa adquirida sob nº CCT 2834 e ATCC 36907 da Fundação André Tosello.

O isolamento do *G. fragrans* foi feito após a coleta de material incrustado nas paredes do tanque lavador/descascador de uma fecularia, localizada na região oeste do Paraná, semeado assepticamente em meio YMA (*Yeast Malt Agar*) contendo extrato de levedura 3 g.L⁻¹, extrato de malte 3 g.L⁻¹, peptona 5 g.L⁻¹, glicose 10 g.L⁻¹ e 20 g.L⁻¹ de Ágar e 100 mg.L⁻¹ de ferricianeto de potássio. Após o isolamento, foi conservado em tubo inclinado contendo meio YMA e armazenado em refrigerador até o momento de seu uso (DAMASCENO, 1999).

A confirmação do *G. fragrans* foi feita por sua resistência à presença ao ferricianeto de potássio adicionado ao meio e pelas colônias se apresentarem brancas, felpudas e com odor característico de abacaxi ou carambola.

Após a aquisição do *K. marxianus* na forma liofilizada, procedeu-se à reidratação do microrganismo com 0,5 mL de água destilada e estéril. O conteúdo da ampola foi então transferido para tubo de ensaio, contendo 5,0 mL de meio de cultura YMA líquido e incubado a 30 °C por 24 h. Em seguida, o microrganismo foi transferido do caldo para tubo contendo YMA Agar.

O *S. cerevisiae* foi transferido do meio fornecido pelo laboratório de Microbiologia de Alimentos da UNIOESTE, para meio YMA em tubo inclinado.

O *K. marxianus* e o *S. cerevisiae* foram adaptados ao resíduo líquido de fecularia, o que não foi necessário para o *G. fragrans*, por já estar adaptado a este meio. Foram inoculados em meio líquido YM (*Yeast Malt*) contendo 10, 30 e 60% do resíduo. A cada inoculação, o microrganismo era mantido 24 h a 30 °C. Finalizou-se a adaptação inoculando os microrganismos em YMA sólido, contendo 100% do resíduo líquido de fecularia no lugar da água do meio, incubando-os nas mesmas condições e depois foram mantidos em geladeira.

4.2 Substrato

O substrato utilizado nos ensaios foi o resíduo líquido de fecularia de mandioca, coletado em indústria localizada no município de Toledo (PR). A coleta foi realizada na saída do processo, antes da entrada no sistema de tratamento de efluentes. Depois de efetuada a coleta, o efluente foi imediatamente transportado até o laboratório de Saneamento da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, *campus* de Cascavel, sendo o transporte realizado em no máximo 60 minutos. O resíduo líquido de fecularia foi filtrado em tecido de algodão e armazenado a -5 °C.

O resíduo foi caracterizado quanto aos parâmetros: pH, Sólidos Suspensos Totais e Voláteis, Demanda Química de Oxigênio (DQO), Nitrogênio Total Kjeldhal e Nitrogênio Amoniacal, de acordo com os métodos do APH/AWWA/WPCF (1992); o teor de açúcares redutores foi determinado de acordo com SOMOGY (1945).

O pH do substrato não foi corrigido, pois se manteve em torno de 5,0, mesmo depois da esterilização em autoclave, o que, segundo ROUWENHORST (1987), é adequado.

4.3 Preparo do Inóculo

O preparo do inóculo foi dividido em duas fases. Para a obtenção do pré-inóculo, 50 mL de resíduo líquido de fecularia foi esterilizado a 1 atm durante 15 min, em frasco Erlenmeyer de 250 mL, e, depois de resfriado, inoculado com uma alçada de cada cultura pura e incubado sob agitação a 150 rpm e 28 °C por 24 horas. A suspensão de células obtida foi usada para inocular outro frasco Erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL de resíduo líquido de fecularia esterilizado, na proporção de 10% (v/v) e incubado em agitador por 24 h, nas mesmas condições de temperatura e rotação. Para a fase de obtenção do inóculo, foi utilizado frasco Erlenmeyer de 1000 mL com 200 mL de resíduo líquido de fecularia esterilizado, inoculado com o pré-inóculo na proporção de 10% (v/v) e incubado nas mesmas condições do pré-inóculo.

A padronização do inóculo foi feita por densidade óptica (FIORETTO, 1987), ajustando-se a absorbância do inóculo em espectrofotômetro a 600 nm de comprimento de onda. Foi feito uso de uma curva padrão, correlacionando absorbância *versus* a concentração celular, para cada microrganismo. A concentração celular foi determinada em placas, no caso do *G. fragrans*, e por contagem em câmara de Neubauer, para *K. marxianus* e *S. cerevisiae* (MEDEIROS, 2000). Também foi obtido o peso seco

correspondente do inóculo, retirando alíquotas de 10 mL em triplicata e secando em estufa a 105°C por 24 h.

A partir da curva obtida, padronizou-se a quantidade de células a ser introduzida como inóculo, entre 1×10^7 a $9,9 \times 10^8$ células.mL⁻¹.

Em todos os experimentos o inóculo foi de 10% (v/v), calculado sobre o volume total do substrato.

4.4 Avaliação da Produção de 2-feniletanol

Os cultivos foram realizados em aerobiose, em sistema de batelada, em frascos Erlenmeyer com capacidade para 250 mL, contendo 50 mL de meio (LATRASSE *et al.*, 1987), em agitador regulado a 150 rpm, a 24±1°C (DAMASCENO, 1999).

Na avaliação da produção de FE, dividiu-se o trabalho em quatro etapas.

Etapa 1 – Produção de 2-feniletanol pelos microrganismos *G. fragrans*, *K. marxianus* e *S. cerevisiae*, em função do tempo

Este experimento foi executado para verificação do tempo necessário para a maior produção de FE por microrganismo. O resíduo líquido de fecularia foi complementado com 50 g.L⁻¹ de glicose, resultando em concentração de açúcares redutores de 50,78 g.L⁻¹, adicionado 3 g.L⁻¹ de L-fenilalanina (PHE) (GARAVAGLIA, 2006), inoculado com cada microrganismo e distribuído em 45 frascos Erlenmeyer, os quais foram incubados por um período de 120 h.

Amostras (em triplicata) correspondentes ao volume total dos frascos foram coletadas a cada 24 h.

Os inóculos usados nesta fase foram de $3,28 \times 10^7$, $2,52 \times 10^7$ e $9,5 \times 10^7$ cél.mL⁻¹ para *G. fragrans*, *K. marxianus* e *S. cerevisiae*, respectivamente.

Etapa 2 – Avaliação da fonte de carbono na produção de 2-feniletanol

Realizada para verificar o efeito das fontes de carbono glicose ou frutose na obtenção do FE. Consistiu da complementação do resíduo líquido de fecularia com glicose ou frutose a 50,0 g.L⁻¹ (DAMASCENO, 1999; MARQUES, 1998), mantendo-se a suplementação com 3,0 g.L⁻¹ de PHE (GARAVAGLIA, 2006; FABRE; BLANC & GOMA, 1998b). Os meios foram inoculados com os microrganismos e distribuídos em um total de 24 frascos Erlenmeyer (amostras em quadruplicata) e incubados por 72 h, que foi o melhor tempo obtido na Etapa 1.

Os inóculos usados nesta fase foram de $2,84 \times 10^7$, $1,74 \times 10^8$ e $7,56 \times 10^8$ cél.mL⁻¹ para *G. fragrans*, *K. marxianus* e *S. Cerevisiae*, respectivamente.

Etapa 3 – Avaliação das concentrações da fonte de carbono e L-fenilalanina

Esta etapa foi executada somente com o *S. cerevisiae*, microrganismo maior produtor de FE obtido das etapas anteriores, no tempo de 72 h e nas mesmas condições de cultivo das etapas anteriores. Foi realizada a seguinte sequência:

3a) Foi feita uma modelagem inicial com planejamento fatorial, variando os níveis de glicose e do aminoácido PHE. Foram testados os seguintes pontos: 0, 25 e 50 g.L⁻¹ de glicose e 0, 1,5 e 3,0 g.L⁻¹ de PHE, com 3 repetições no ponto central.

3b) Com base nos dados de produção de FE obtidos, foi feito o caminho de máxima inclinação, usando os pontos: 30, 40, 50 e 60 g.L⁻¹ de glicose e 3,0, 4,5, 5,1, 6,6 g.L⁻¹ de PHE, em duplicata.

3c) O tratamento que mais produziu FE foi colocado como ponto central de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), no qual foram avaliados os pontos: 36, 40, 50, 60, 64 g.L⁻¹ de glicose e 3,0, 3,6, 5,1, 6,6 e 7,2 g.L⁻¹ de PHE, com 3 repetições no ponto central.

3d) Novamente, o tratamento que mais produziu FE foi colocado como ponto central de um novo DCCR, no qual foram avaliados os pontos: 20,0, 31,6, 60,0, 88,4 e 100,0 g.L⁻¹ de glicose e 1,0, 1,9, 4,0, 6,1 e 7,0 g.L⁻¹ de PHE, com 3 repetições no ponto central.

Estas etapas foram realizadas avaliando-se graficamente a produção de FE e a bioconversão FE/glicose. Quando os resultados das amostras demonstraram que a eficiência de bioconversão começou a diminuir e que não houve grande aumento da concentração de FE, foi aplicada a técnica da desejabilidade (DERRINGER & SUICH, 1980; CALADO & MONTGOMERY, 2003), em que se obtiveram gráficos de superfície de resposta e de desejabilidade, indicando as concentrações de glicose e PHE mais indicadas para se obter maior produção e bioconversão em FE.

Etapa 4 – Validação

Para a validação dos resultados obtidos experimentalmente, a melhor condição de glicose e PHE obtida na etapa 3 para a produção de FE, escolhida paralelamente com a melhor condição de conversão FE/glicose (mol/mol), foi repetida para obtenção de uma cinética da formação do FE ao longo do tempo, nas mesmas condições de cultivo das etapas anteriores, com coleta de amostras a cada 12 h.

4.5 Métodos Analíticos

As amostras foram centrifugadas a 2200 rpm por 20 min. No sobrenadante, analisou-se: pH, DQO, açúcares redutores, PHE e FE. No precipitado, foi quantificada a biomassa indiretamente como Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) (APH/AWWA/WPCF, 1992).

4.5.1 Determinação do 2-feniletanol

Os compostos voláteis foram extraídos com diclorometano (JANSSENS *et al.*, 1988; MARQUES, 1998), segundo o seguinte procedimento: 5 mL do sobrenadante dos meios de cultura saturados com NaCl foram colocados em funil de separação e os voláteis extraídos com 15 mL de diclorometano. Cada amostra foi lavada 3 vezes com 5 mL de diclorometano. As fases orgânicas foram secas com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), acondicionadas em frascos fechados e armazenados em freezer a $-5\text{ }^\circ\text{C}$, até a análise cromatográfica.

A determinação de FE foi feita em cromatógrafo gasoso (CG) Shimadzu GC 2010, equipado com detector de ionização de chama (FID), utilizando-se coluna capilar de sílica fundida Nukol, 30m x 0,25mm x 0,25 μm de espessura de filme. Utilizou-se o hidrogênio como gás de arraste, a um fluxo de 5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; a temperatura do injetor de 250 $^\circ\text{C}$ e temperatura do detector de 300 $^\circ\text{C}$. A temperatura inicial da coluna foi de 60 $^\circ\text{C}$ por 3 min, aumentando gradativamente 8 $^\circ\text{C}$ por minuto até 180 $^\circ\text{C}$, onde permaneceu por 5 min. O volume injetado foi de 1 μL em sistema da injeção *split* na razão de 1/15.

Foi realizada co-injeção da amostra com padrão autêntico do FE, marca Sigma Aldrich, padrão cromatográfico, a qual se constituiu numa técnica de identificação.

A análise e quantificação do 2-feniletanol foi feita calculando-se as áreas dos picos do composto, para determinação da concentração do mesmo no meio de cultura, baseando-se em concentrações padrões de FE em diclorometano.

4.5.2 Determinação da L-fenilalanina

Foi realizada por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), coluna de fase reversa C18 (4,6nm x 250nm, ODS-100S, Shimadzu, Japan), equipado com detector UV/VIS SPD-10 A (Shimadzu, Japão), no comprimento de onda de 250nm. A fase móvel foi composta por uma solução de metanol e água (20/80, v/v) num fluxo de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A solução da fase móvel foi filtrada previamente com membranas de 0,45 μm (Sartorius, USA).

As amostras foram injetadas (alça de injeção de 20 µL) diretamente no injetor, acoplado-se na seringa filtros descartáveis de 0,22 µm e 13 mm de diâmetro (Milipore, USA). A concentração de PHE foi calculada em g.L⁻¹, fazendo-se uso de uma curva padrão de calibração, usando as concentrações de PHE em água de 0,5, 2,0, 4,0, 6,0 g.L⁻¹.

4.6 Análise Estatística

Etapas 1 e 2:

Na etapa 1, foi utilizado um delineamento em blocos casualizados, sendo considerado bloco o tempo (24, 48, 72, 96 e 120 h) e fator o microrganismo (*G. fragrans*, *K. marxianus* e *S. cerevisiae*), totalizando 15 tratamentos. Foram feitas 3 repetições.

Na etapa 2, foi utilizado delineamento fatorial com dois fatores, sendo o primeiro, o tipo de microrganismo, com 3 níveis (*G. fragrans*, *K. marxianus* e *S. cerevisiae*) e o segundo, a fonte de carbono, com 2 níveis (glicose e frutose), totalizando 6 tratamentos, com 4 repetições para cada tratamento.

Foi realizada a análise de variância e comparações dos resultados obtidos pelo método de Tukey, a 5% de significância, com o auxílio do programa Sisvar 5.1.

Quando os dados não apresentavam normalidade, a transformação *Box-cox* foi utilizada (Equação 1). Esta transformação utiliza a seguinte fórmula, em que y^λ é a variável estudada e o valor de λ varia entre (-1, 1):

$$y^\lambda = \frac{(y^\lambda - 1)}{\lambda} \quad (1)$$

Etapa 3:

Foi utilizada a metodologia de superfície de resposta com a finalidade de se obterem melhores rendimentos de FE, somados a uma melhor bioconversão FE/glicose. Esta metodologia tem duas etapas distintas: a modelagem e o deslocamento. A modelagem é feita ajustando-se modelos simples, lineares ou quadráticos a respostas obtidas com planejamentos fatoriais. O deslocamento se dá ao longo do caminho de máxima inclinação do modelo.

3a) Com o intuito de verificar a influência dos fatores (variáveis independentes) glicose (GLI) e fenilalanina (PHE) na produção de FE, foi elaborado um planejamento fatorial (2²) com 3 repetições no ponto central, totalizando 7 ensaios experimentais. Os níveis das variáveis independentes utilizadas, em ordem crescente (-1,0,+1), foram 0, 25 e

50 g.L⁻¹ para a glicose e 0, 1,5 e 3,0 para PHE. Como variável de resposta (dependente) foi avaliada a produção de FE (g.L⁻¹).

3b) Para melhorar as condições obtidas com a modelagem inicial efetuada pelo planejamento fatorial (2²), foi realizado o caminho da máxima inclinação.

3c e 3d) O ponto que mais produziu FE no caminho da máxima inclinação foi usado como ponto central do primeiro delineamento composto central rotacional (DCCR) (3c), tipo estrela ($\alpha = (2^n)^{1/4}$), que compreende um fatorial (2²) com os níveis (-1 e +1), os pontos axiais (-1,414 e +1,414) e três repetições no ponto central (0), resultando em 11 ensaios. O ponto central fornece uma média para estimar o erro experimental e a falta de ajuste e os pontos axiais foram adicionados para estimar a curvatura do modelo (BARROS NETO; SARMINO & BRUNS, 2007).

Para o segundo DCCR (3d), foi usado como ponto central valores próximos do ponto que mais produziu FE no primeiro DCCR.

O DCCR e os níveis das variáveis, cujos valores foram ampliados em função dos resultados obtidos com o planejamento inicial, estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 Níveis utilizados para o primeiro e segundo DCCR da etapa 3 do cultivo, na busca da melhoria de produção do FE em resíduo líquido de fecularia

Etapa	Variáveis independentes	Níveis				
		- α	-1	0	+1	+ α
3c	Glicose (g.L ⁻¹)	36	40	50	60	64
	PHE (g.L ⁻¹)	3,0	4,5	5,1	6,6	7,2
3d	Glicose (g.L ⁻¹)	20	31,6	60	88,4	100
	PHE (g.L ⁻¹)	1,0	1,88	4,0	6,12	7,0

Nota: $\alpha = (2^n)^{1/4} = 1,414$.

O *software* STATISTICA versão 7.1 (Statsoft™) foi utilizado para a determinação dos efeitos das variáveis independentes, o cálculo dos coeficientes de regressão, a análise de variância (ANOVA) e a obtenção dos gráficos de superfícies de resposta e de contorno, ao nível de 5% de significância.

Etapa 4:

A validação experimental dos modelos propostos para produção de FE e bioconversão glicose/FE foi realizada em triplicata, nas melhores condições de glicose e PHE estabelecidas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do Substrato

A caracterização do resíduo líquido de fecularia utilizada no experimento está descrita na Tabela 2.

Tabela 2 Composição da água residual obtida em uma fecularia

Variável	Concentração
pH	5,1
g.L⁻¹	
Açúcares redutores	0,57
Sólidos Suspensos Totais	3,54
Sólidos Suspensos Voláteis	3,14
mg.L⁻¹	
DQO	16.088
Nitrogênio total Kjeldhal	158,23
Nitrogênio amoniacal	14,40

Os açúcares redutores presentes na manipueira compreendem a glicose, frutose e maltose (DAMASCENO *et al.* 2003). O teor de açúcares redutores encontrado foi baixo, característico de resíduo líquido de fecularia, diferente do encontrado por DAMASCENO *et al.* (2003), que apresentou 38,0 g.L⁻¹ na manipueira proveniente de uma farinha, naturalmente mais rica destes carboidratos.

Quanto à DQO (Tabela 2), verifica-se que a amostra apresentou valores superiores aos obtidos por FEIDEN & CEREDA (2003), COLIN *et al.* (2006), KUCZMAN *et al.* (2007), PINTO & CABELLO (2007), os quais obtiveram os valores de 11484, 5100, 15720 e 14300 mg.L⁻¹, respectivamente. Segundo BARANA & CEREDA (2001), as características da raiz podem interferir nas características do resíduo líquido dela extraída, sendo diversos os fatores que podem afetar a composição da mandioca, entre eles a época, o tipo de solo, a temperatura, a altitude, a umidade e a variedade cultivada.

5.2 Etapa 1 - Produção de 2-feniletanol pelos Microrganismos *G. fragrans*, *K. marxianus* e *S. cerevisiae*, em Função do Tempo

5.2.1 Produção de 2-feniletanol

Ao submeter os dados de produção de FE ao teste de normalidade, foram obtidos p-valores inferiores a 0,05, a partir do teste de Shapiro-Wilk, resultando na inexistência de normalidade. Estes dados foram submetidos apenas à avaliação do coeficiente de variação, 1° e 2° quartil e mediana, conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 Estatística descritiva da produção de 2-feniletanol em função do tempo

Micro-organismo	Tempo	Médias de produção de FE (g.L ⁻¹)				
		FE (g.L ⁻¹)	Coef. variação	1° quartil	Mediana	3° quartil
<i>G. fragrans</i>	24	0,08	49,32	0,005	0,006	0,012
	48	0,06	12,74	0,006	0,006	0,007
	72	0,07	11,72	0,006	0,007	0,007
	96	0,06	14,47	0,005	0,006	0,007
	120	0,08	15,26	0,006	0,008	0,009
<i>K. marxianus</i>	24	0,07	16,64	0,006	0,007	0,008
	48	0,15	20,43	0,013	0,014	0,019
	72	0,15	35,00	0,012	0,013	0,022
	96	0,16	34,36	0,012	0,013	0,022
	120	0,19	19,24	0,016	0,018	0,023
<i>S. cerevisiae</i>	24	0,26	32,17	0,017	0,026	0,034
	48	0,73	23,70	0,058	0,070	0,092
	72	0,74	11,76	0,068	0,071	0,084
	96	0,49	15,91	0,044	0,045	0,058
	120	0,61	3,09	0,059	0,062	0,062

Verifica-se na Tabela 3 a existência de coeficientes de variação superiores a 10% em quase todas as amostras, com exceção da amostra do *S. cerevisiae* em 120 h, demonstrando a heterogeneidade dos dados.

Na avaliação do 1° quartil, pode-se observar que os menores valores de produção de FE ocorreram para o *G. fragrans*, representando que 25% dos dados deste tratamento apresentaram valores abaixo de 0,006 g.L⁻¹ para todos os tempos estudados. Os valores apresentados para a mediana também foram próximos ao 1° quartil do *G. fragrans*, sendo que o valor mais elevado foi em 120 h, correspondendo a 0,008 g.L⁻¹. Observaram-se maiores valores no 3° quartil do *G. fragrans*, onde, no tempo de 24 h, atingiu 0,012 g.L⁻¹ e apresentou o maior coeficiente de variação: 49,32. Os demais coeficientes de variação do *G. fragrans* são considerados de média homogeneidade, conforme GOMES (2000).

O *K. marxianus* apresentou valores maiores de produção de FE que o *G. fragrans*, porém menores que os obtidos pelo *S. cerevisiae*. Os coeficientes de variação indicaram heterogeneidade das amostras e 25% dos dados deste tratamento apresentaram valores abaixo de $0,016 \text{ g.L}^{-1}$ para todos os tempos estudados. Os valores da mediana foram muito próximos, a partir das 48 h, em que se manteve em intervalo entre $0,013$ a $0,018 \text{ g.L}^{-1}$.

O *S. cerevisiae* obteve os maiores valores de produção de FE. Os coeficientes de variação para 24 e 48 h foram os maiores para o *S. cerevisiae*, com valores de 32,17 e 23,70. Nos tempos de 72 e 96 h, os coeficientes foram de 11,73 e 15,91, considerados de média homogeneidade; no tempo de 120 h foi homogêneo, apresentando coeficiente de variação de 3,09.

Os três microrganismos produziram FE, sendo que o *S. cerevisiae* se destacou com a maior produção, seguida pelo *K. marxianus* e, por último, pelo *G. fragrans* (Tabela 3). Os resultados de produção de FE por *G. fragrans* no tempo mantiveram uma média entre $0,06$ e $0,08 \text{ g.L}^{-1}$. O *K. marxianus* e o *S. cerevisiae* aumentaram a produção até 48 h e, a partir deste tempo, não houve mais aumento significativo no teor de FE produzido.

A produção máxima de FE foi de $0,74 \text{ g.L}^{-1}$, obtida pelo *S. cerevisiae*, em 72 h. O *K. marxianus* produziu $0,19 \text{ g.L}^{-1}$ em 120 h, enquanto o *G. fragrans* produziu $0,08 \text{ g.L}^{-1}$ em 24 h. DAMASCENO *et al.* (2001) obtiveram quantidades de FE inferiores às obtidas neste trabalho, utilizando *G. fragrans* em manipuladora suplementada com extrato de levedura e os açúcares glicose ou frutose (50 g.L^{-1}). Os autores obtiveram teores médios de FE próximos de 21 mg.L^{-1} de FE.

HUANG, LEE & CHOU (2000) investigaram o efeito de vários níveis de sacarose, extrato de levedura e fenilalanina na produção do FE por *Pichia fermentans* L-5. A maior produção de FE, $453,1 \text{ mg.L}^{-1}$ foi obtida no meio contendo 18% de sacarose, 0,25% de extrato de levedura e 0,1% de fenilalanina, após 16 h de cultivo. HUANG, LEE & CHOU (2001) produziram $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de FE utilizando a *P. fermentans* L-5 em um meio contendo 5% de glicose e 0,25% de extrato de levedura, após 16 h de cultivo.

Em relação à produção do *K. marxianus*, GARAVAGLIA *et al.* (2007) obtiveram concentrações maiores de FE, chegando a $0,77 \text{ g.L}^{-1}$, em pH 7,0, temperatura de $37 \text{ }^\circ\text{C}$, e concentração de 3,0 g de PHE. Nestas condições os autores observaram bioconversão de PHE em FE de $0,62 \text{ g.g}^{-1}$.

Valores superiores aos obtidos neste trabalho foram obtidos pelos autores a seguir.

ETSCHMANN, SELL & SCHRADER (2004) testaram 13 diferentes constituintes de meios, variando a temperatura para aumentar a bioconversão de PHE em FE com *K. marxianus*. Após testarem 98 experimentos, chegaram à concentração de $5,6 \text{ g.L}^{-1}$ de FE, que equivaleu a um aumento de 87% de produção, comparado ao obtido em meio não otimizado. Obtiveram, ainda, $3,88 \text{ g.L}^{-1}$ de FE em 24 h e $4,40 \text{ g.L}^{-1}$, após 39 h, utilizando

meio otimizado contendo melaço de cana, 9,0 g.L⁻¹ de PHE, além de várias vitaminas adicionadas.

STARK *et al.* (2003) produziram 2,35 g.L⁻¹ de FE com 30 g.L⁻¹ de glicose e 6 g.L⁻¹ de PHE, utilizando o *S. cerevisiae*, em processo contínuo.

MEI, MIN & LÜ (2009) produziram 6,17 g.L⁻¹ de FE com *S. cerevisiae*, usando 14 g.L⁻¹ de PHE, sendo que 3,15 g.L⁻¹ do FE produzido permaneceram na fase aquosa e 3,02 g.L⁻¹ foram absorvidos pela resina em estudo, técnica usada para evitar a inibição da produção de FE causada pela presença de grandes quantidades do produto.

ETSCHMANN & SCHRADER (2006) obtiveram, em reator de processo bifásico, 26,5 g.L⁻¹ de FE com *K. marxianus* e STARK *et al.* (2002) obtiveram, em processo contínuo, 24,0 g.L⁻¹ com *S. cerevisiae*, em 93 h de cultivo. Estas altas concentrações de FE se devem, provavelmente, à manutenção de grandes quantidades de fontes energéticas e vitamínicas, pois utilizaram meio contendo melaço de cana com fontes de potássio e fósforo e 50 g.L⁻¹ de PHE, mantendo alimentação constante de glicose na concentração de 60 g.L⁻¹.

5.2.2 Produção da biomassa, pH, consumo de açúcares redutores e remoção de DQO

Na Tabela 4 estão os resultados da análise de variância para produção de pH, biomassa (g.L⁻¹), remoção de DQO (%) e consumo de açúcares (%), referentes à etapa 1.

Tabela 4 Análise de variância para produção de pH, biomassa (g.L⁻¹), remoção de DQO (%) e consumo de açúcares (%) para a etapa 1

Causa de variação	GL	Média dos Quadrados			
		pH	Biomassa (g.L ⁻¹)	Consumo de açúcares (%)	Remoção de DQO (%)
Microrganismo	2	0,0019* ^{dt}	24,2336*	149459816.42* ^{dt}	1856,1335*
Tempo (bloco)	4	0,0004 ^{dt}	10,6550	55368227.92 ^{dt}	1194,1773
Micro-org.*Tempo	8	0,0001* ^{dt}	0,1919 ^{ns}	10350230.55* ^{dt}	124,2115*
Resíduo	30	0,00001 ^{dt}	1,0859	194347.88 ^{dt}	34,2200
Total	44	0,0070 ^{dt}	125,2021	609024825.46 ^{dt}	10509,2690
Parâmetros Estatísticos					
Coefficiente de variação		3,51 ^{dt}	15,63	6,96 ^{dt}	12,79
Média geral do ensaio		0,11 ^{dt} (3,91) ^{vr}	6,67	6333,84 ^{dt} (75,36) ^{vr}	45,75
Desvio padrão		0,01259 ^{dt}	1,628	3720 ^{dt}	15,45
F microrganismo		121,214 ^{dt}	22,315	769,032 ^{dt}	54,241
F micro-org.*Tempo		6,804 ^{dt}	0,177	53,256 ^{dt}	3,630

Notas: * = Médias significativas ao nível de 5% de probabilidade; ns = Médias não significativas; dt = Dados transformados; vr = Valor real.

Não foram analisados os dados da variável tempo isoladamente, pois ele está sendo tratado como bloco. Nesta tabela de análise de variância (ANOVA), observa-se que o fator

microrganismo apresentou efeito significativo sobre todos os parâmetros avaliados. A interação dos fatores microrganismo e tempo foi significativa para quase todos os parâmetros, com exceção da biomassa.

Na Figura 4 é apresentado o comportamento da produção de FE e do pH do meio, para *G. fragrans*, *K. marxianus* e *S. cerevisiae*, nos tempos de 0 a 120 h.

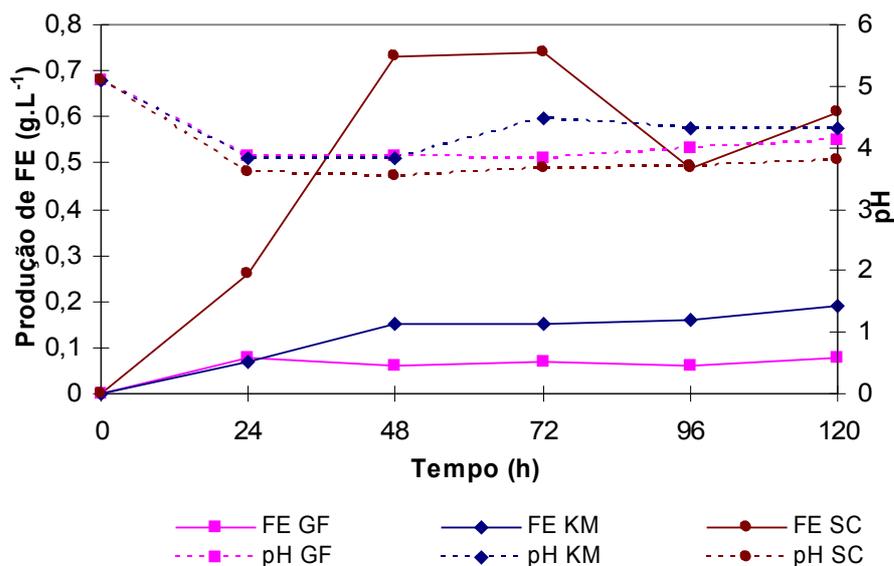


Figura 4 Gráfico do comportamento da produção de FE e pH do meio, para *G. fragrans* (GF), *K. marxianus* (KM) e *S. cerevisiae* (SC), nos tempos de 0 a 120 h.

Para obtenção da normalidade, os dados referentes ao pH foram submetidos à transformação *Box-cox*, utilizando $\lambda = -1,59$. A variação de pH foi acompanhada nas amostras, sendo que a maior média de pH foi obtida no cultivo do *K. marxianus* (4,13), enquanto o *S. cerevisiae* apresentou a menor (3,90).

Observou-se que o menor pH obtido foi nos meios de cultivo do *S. cerevisiae*, no qual houve maior produção de FE. A maior queda de pH do meio ocorreu nas primeiras 24 h, permanecendo baixo até 48 h, coincidindo com a maior produção de FE. O pH aumentou no restante do tempo de cultivo. HUANG, LEE & CHOU (2000) explicam que esta queda do pH se deve à formação de ácidos orgânicos pelo microrganismo. MEI, MIN & LÜ (2009) estudaram a variável pH na produção de FE e relataram que uma elevação no pH de 5,2 para 6,8 no cultivo de *S. cerevisiae* resultou em um aumento na concentração de FE. No entanto, pHs maiores diminuíram a produção de FE. Levando-se em consideração este estudo, se o pH inicial fosse corrigido para um valor próximo a 6,8, talvez fosse possível obter rendimentos maiores de FE.

A análise estatística da biomassa demonstrou que a interação entre o microrganismo e o tempo não foi significativa (Tabela 4), portanto somente o fator microrganismo pôde ser analisado pelo método de Tukey. O *S. cerevisiae* foi quem mais produziu biomassa ($9,04 \text{ g.L}^{-1}$) e também teve maior produção de FE, diferindo estatisticamente da biomassa do *G. fragrans* e do *K. marxianus*. Um aumento na concentração de biomassa pode influenciar fortemente a quantidade de FE produzida, pois a conversão a partir da PHE é uma rota associada ao crescimento da levedura (GARAVAGLIA, 2006).

A Figura 5 apresenta o comportamento da produção de biomassa e do consumo de açúcares redutores do meio, para *G. fragrans*, *K. marxianus* e *S. cerevisiae*, nos tempos de 0 a 120 h.

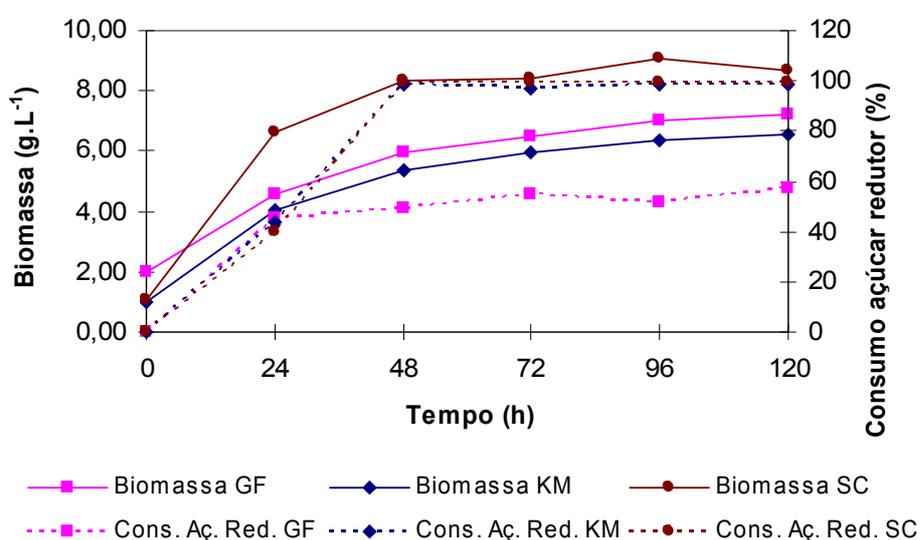


Figura 5 Produção de biomassa e do consumo de açúcares redutores do meio, para *G. fragrans* (GF), *K. marxianus* (KM) e *S. cerevisiae* (SC), nos tempos de 0 a 120 h.

Observou-se crescimento exponencial nas primeiras 48 h (Figura 5). Após este tempo, a biomassa praticamente não aumentou, o que coincide com a produção do FE (Figura 4), demonstrando que a maior produção do FE encontra-se na fase exponencial de crescimento microbiano, o que já era conhecido por VOLLBRECHT & RADLER (1973).

MEI, MIN & LÜ (2009) observaram que a biomassa cresceu rapidamente nas primeiras 16 h e depois cresceu mais lentamente até 24 h. A concentração total de FE e de biomassa atingiu o nível máximo de $6,17$ e $12,09 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente, em 24 h.

GARAVAGLIA *et al.* (2007) observaram que, na produção de FE por *K. marxianus* em mosto de uva, houve acúmulo de biomassa, apresentando um máximo de $11,2 \text{ g.L}^{-1}$. Este resultado foi obtido nas condições de aeração de 1 vvm ($2,5 \text{ L.min}^{-1}$) e 250 rpm.

STARK *et al.* (2002) obtiveram 24,0 g.L⁻¹ de FE com *S. cerevisiae*, em 93 h de cultivo, produzindo 70 g.L⁻¹ de biomassa.

Um coeficiente de rendimento é usado para definir a quantidade de produto obtida para determinado substrato. Neste experimento, o coeficiente de rendimento biomassa/glicose em 24 h, foi de 0,16, 0,14 e 0,22 g.g⁻¹, respectivamente para *G. fragrans*, *K. marxianus* e *S. cerevisiae*. O coeficiente do *S. cerevisiae* foi 26,6%, menor do que o encontrado por STARK *et al.* (2003), em processo contínuo, que, usando *S. cerevisiae* com 30 g.L⁻¹ de glicose e 6 g.L⁻¹ de PHE, obteve um coeficiente de 0,3 g.g⁻¹. O *S. cerevisiae* deste processo foi menos eficiente no uso da glicose para formar mais células da levedura, o que pode ter sido acarretado pelas condições do meio não serem ideais ou, ainda, pela cepa da levedura estudada não ser boa produtora de biomassa.

Os coeficientes de rendimento FE/biomassa médios, obtidos no presente estudo, foram de 0,02, 0,04 e 0,11 g.g⁻¹, respectivamente, para *G. fragrans*, *K. marxianus* e *S. cerevisiae*. O *S. cerevisiae* apresentou baixa produção de FE por célula, se comparada à obtida por STARK *et al.* (2003) que, com 30 g.L⁻¹ de glicose e 6 g.L⁻¹ de PHE em cultura contínua, obtiveram coeficiente de 0,35 g.g⁻¹ para o *S. cerevisiae*. ETSCHMANN & SCHRADER (2006) obtiveram 0,3 g.g⁻¹ para *S. cerevisiae* e 0,74 g.g⁻¹ para *K. marxianus* em processo de duas fases: aquosa e orgânica.

Para obtenção da normalidade, os dados referentes ao consumo de açúcares redutores foram submetidos à transformação *Box-cox*, utilizando $\lambda = 2,00$. O consumo de açúcares ocorreu principalmente na fase log de crescimento dos microrganismos, ou seja, até as 48 h iniciais (Figura 5). Após este tempo, não houve diferença significativa entre as amostras, o que também coincide com a produção do FE, a qual não aumentou significativamente, após o mesmo período. Os microrganismos *K. marxianus* e *S. cerevisiae* consumiram praticamente todo o açúcar acrescentado ao meio nas primeiras 48 h, ou seja, 98,24 e 99,03%, respectivamente. O *G. fragrans* consumiu somente 51,59% em média do açúcar redutor disponível. ETSCHMANN & SCHRADER (2006), em reator de processo bifásico alimentado continuamente com solução de glicose, perfazendo 30 g.L⁻¹, observaram utilização mais rápida do açúcar pelo *S. cerevisiae*, com consumo de 91,7% em 17 h de cultivo.

A Figura 6 apresenta o comportamento da produção de biomassa e da remoção de DQO do meio, para *G. fragrans*, *K. marxianus* e *S. cerevisiae*, nos tempos de 0 a 120 h.

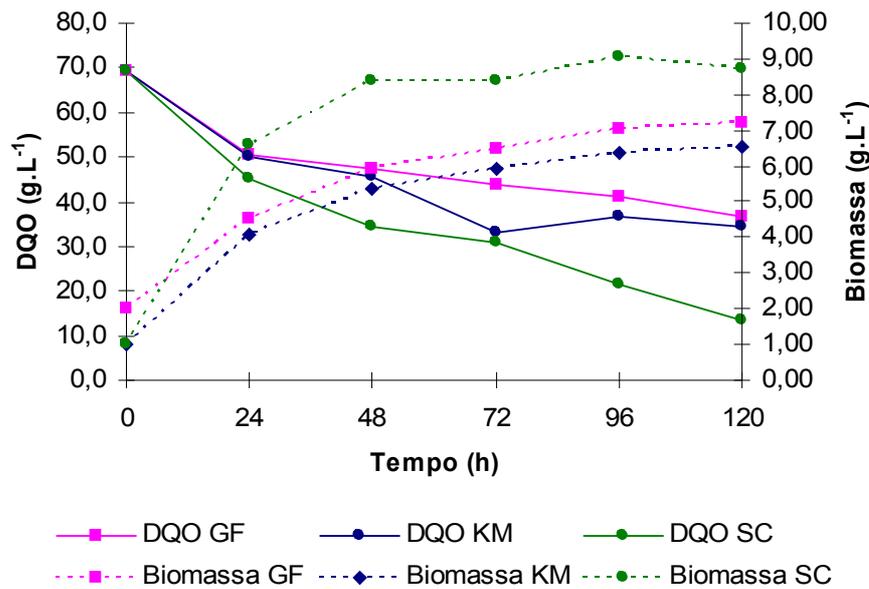


Figura 6 Comportamento da produção de biomassa e da remoção de DQO do meio, para *G. fragrans* (GF), *K. marxianus* (KM) e *S. cerevisiae* (SC), nos tempos de 0 a 120 h.

A remoção de DQO é um efeito desejável durante a produção de FE, pois reduz o potencial poluidor do resíduo líquido utilizado. A DQO inicial do meio foi de 69,4 g O₂.L⁻¹. O microrganismo mais eficiente na remoção da DQO foi o *K. marxianus*, seguido pelo *S. cerevisiae* e pelo *G. fragrans*, com os valores de 13,6, 34,6 e 36,6 g O₂.L⁻¹, respectivamente. O *G. fragrans* e o *S. cerevisiae* estabilizaram estatisticamente a remoção de DQO, a partir de 72 h, enquanto o *K. marxianus* teve aumento da remoção até o final das 120 h (Figura 6).

O *S. cerevisiae* teve o maior aumento de biomassa, 9,07 g.L⁻¹, mas baixa remoção de DQO do meio. O *G. fragrans* atingiu valores médios de biomassa, 7,23 g.L⁻¹, porém teve a menor remoção de DQO. O *K. marxianus*, no entanto, teve o menor crescimento de biomassa, 6,54 g.L⁻¹, porém foi o microrganismo mais eficiente na remoção de DQO.

As remoções de DQO obtidas podem ser consideradas importantes, se comparadas a sistemas de reatores, próprios para remoção de DQO, como o utilizado por BARANA & CEREDA (2000), em que obtiveram remoções de DQO de 88,89 e 54,95%, ao utilizarem cargas de resíduos de 2,25 e 8,48 g.L⁻¹.d⁻¹.

Na Tabela 5 são apresentados os resultados dos parâmetros fermentativos de Produtividade (Q_p), rendimento em biomassa (Y_{x/s}) e rendimento em produto (Y_{p/s}) para os microrganismos *G. Fragrans*, *K. marxianus* e *S. cerevisiae*.

Tabela 5 Parâmetros fermentativos de produtividade (Q_p), rendimento em biomassa ($Y_{x/s}$) e rendimento em produto ($Y_{p/s}$) para os microrganismos *G. fragrans*, *K. marxianus* e *S. cerevisiae*

Tempo	Q_p ($g.L^{-1}.h^{-1}$)			$Y_{x/s}$ ($g.g^{-1}$)			$Y_{p/s}$ ($g.g^{-1}$)		
	GF	KM	SC	GF	KM	SC	GF	KM	SC
24	0,0032	0,0029	0,0108	0,1987	0,1855	0,3295	0,0033	0,0032	0,0118
48	0,0013	0,0032	0,0153	0,2375	0,1082	0,1671	0,0025	0,0031	0,0148
72	0,0010	0,0021	0,0103	0,2334	0,1216	0,1672	0,0025	0,0032	0,0152
96	0,0007	0,0016	0,0051	0,2713	0,1279	0,1808	0,0025	0,0031	0,0099
120	0,0007	0,0016	0,0051	0,2501	0,1308	0,1732	0,0027	0,0038	0,0122

Observa-se que a produtividade do *S. cerevisiae* foi bem superior aos demais, sendo cerca de 70% maior nas primeiras 24 h. O *S. cerevisiae* e *K. marxianus* apresentaram os melhores índices de produtividade em 48 h, enquanto que no *G. fragrans* foi em 24 h. Todos diminuíram ao longo do tempo.

O rendimento em biomassa do *G. fragrans* se diferenciou por aumentar ao longo do tempo, enquanto os demais diminuíram. Tal fato indica que, provavelmente, o *G. fragrans* utilizou mais o substrato para crescimento celular, produzindo menos metabólitos. O *S. cerevisiae* e *K. marxianus* apresentaram o melhor rendimento em biomassa nas primeiras 24 h, diminuindo na sequência. O *G. fragrans* obteve as médias mais altas de rendimento em biomassa, seguido pelo *S. cerevisiae* e por último pelo *K. marxianus*.

O maior rendimento em produto foi encontrado no cultivo do *S. cerevisiae*, atingindo valores cerca de 80% maiores em 72 h e diminuindo depois deste tempo. O *G. fragrans* e o *S. cerevisiae* mantiveram o rendimento em produto, aproximadamente estável, ao longo do tempo, tendo valores levemente superiores em 24 e 120 h, respectivamente para *G. fragrans* e *K. marxianus*.

5.3 Etapa 2 - Avaliação da Fonte de Carbono na Produção de 2-feniletanol

Para a realização da etapa 2, o cultivo foi realizado em 72 h, com base nos resultados obtidos na etapa 1, em que ocorreu a maior produção de FE para o *S. cerevisiae*. Para os demais microrganismos não houve variação significativa ao longo do tempo.

Na Tabela 6 são apresentados os resultados da análise de variância para a produção de FE ($g.L^{-1}$), pH, biomassa ($g.L^{-1}$) e remoção de DQO (%) para os microrganismos *G. fragrans*, *K. marxianus* e *S. cerevisiae*, na etapa 2.

Tabela 6 Análise de variância para produção de FE (g.L⁻¹), pH, biomassa (g.L⁻¹) e remoção de DQO (%) para os microrganismos *G. fragrans*, *K. marxianus* e *S. cerevisiae*, na avaliação da fonte de carbono

Causa de variação	GL	QM			
		Produção de FE (g.L ⁻¹)	pH	Biomassa (g.L ⁻¹)	Remoção de DQO (%)
Microrganismo	2	507,4595* ^{dt}	0,1425*	2,1562*	3644,8887*
Fonte de carbono	1	29,8925* ^{dt}	0,0828*	0,6240*	125,0810 ^{ns}
Micro-org.*Fonte C	2	19,2982 ^{ns dt}	0,0173 ^{ns}	0,0178 ^{ns}	76,4046 ^{ns}
Resíduo	18	98,4647 ^{dt}	0,0061	0,0337	28,9274
Total	23	1181,8728 ^{dt}	0,5136	5,5795	8088,3627
Parâmetros Estatísticos					
Coefficiente de variação		21,95 ^{dt}	1,99	3,72	11,85
Média geral do ensaio		10,6564 ^{dt}	3,9412	4,9337	45,3962
		(0,26) ^{vr}			
Desvio padrão		7,17 ^{dt}	0,15	0,49	18,75
F microrganismo		102,716	23,109	63,902	126,001
F Fonte de carbono		7,274	13,430	18,494	4,324
F micro-org.*Tempo		4,055	2,815	0,528	2,641

Notas: * = Médias significativas ao nível de 5% de probabilidade; ns = Médias não significativas; dt = Dados transformados; vr = Valor real.

Observou-se na ANOVA (Tabela 6) que os fatores microrganismo e fonte de carbono apresentaram efeito significativo sobre todos os parâmetros avaliados, com exceção da remoção de DQO para a fonte de carbono. A interação entre o microrganismo e a fonte de carbono não foi significativa estatisticamente para nenhum dos parâmetros avaliados.

5.3.1 Produção de 2-feniletanol

Na Tabela 7 são apresentados os dados originais e transformados da produção de FE, pois para a obtenção da normalidade, os dados foram submetidos à transformação *Box-cox* utilizando $\lambda = -1,00$, para análise de variância.

Tabela 7 Dados originais e transformados de produção de FE (g.L⁻¹), pelos microrganismos *G. fragrans* (GF), *K. marxianus* (KM) e *S. cerevisiae* (SC)

Fonte de carbono	Médias de produção de FE(g.L ⁻¹)					
	Originais			Transformados		
	GF	KM	SC	GF	KM	SC
Glicose	0,05	0,16	0,71	19,59 ^{Aa}	6,75 ^{Ab}	2,28 ^{Ac}
Frutose	0,05	0,08	0,49	18,74 ^{Aa}	12,10 ^{Bb}	4,48 ^{Ac}

Notas: Médias seguidas pela mesma letra (maiúscula na coluna e minúscula na linha dentro de cada característica), não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

O *S. cerevisiae* foi o maior produtor do aroma, seguido pelo *K. marxianus* e em último lugar pelo *G. fragrans* (Tabela 7), independentemente da fonte de carbono. No entanto, com a glicose houve maior produção do aroma para os três microrganismos, o que

está de acordo com DAMASCENO (1999), que observou que o *G. fragrans* produziu mais FE utilizando a glicose. No entanto, o *G. fragrans* e o *S. cerevisiae* não apresentaram diferença significativa de produção de FE, utilizando a glicose ou a frutose.

As maiores médias de produção de FE foram de 0,71 g.L⁻¹, 0,16 g.L⁻¹ e de 0,05 g.L⁻¹, obtidas pelo *S. cerevisiae*, *K. marxianus* e *G. fragrans*, respectivamente (Tabela 7).

HUANG, LEE & CHOU (2000) investigaram o efeito de fontes de carbono, vários níveis de sacarose (0 a 30%), extrato de levedura (0 a 1,25%) e fenilalanina (0 a 0,2%) na produção do FE por *Pichia fermentans* L-5 e concluíram que o glicerol e a sacarose foram as fontes de carbono que forneceram maiores quantidades de FE. Quantidades maiores de fenilalanina (0,1%) resultaram em um maior aumento do FE. Portanto, a maior produção de FE foi obtida no meio contendo 18% de sacarose, 0,25% de extrato de levedura e 0,1% de fenilalanina.

Na Tabela 8 são apresentados os valores médios de pH, biomassa e remoção de DQO, para *G. fragrans*, *K. marxianus* e *S. cerevisiae*, utilizando como fontes de carbono a glicose ou a frutose.

Tabela 8 Valores médios de pH, biomassa e remoção de DQO, para *G. fragrans*, *K. marxianus* e *S. cerevisiae*, utilizando como fontes de carbono a glicose ou a frutose

Micro-organismo	pH		Biomassa (g.L ⁻¹)		Remoção de DQO (%)	
	Glicose	Frutose	Glicose	Frutose	Glicose	Frutose
<i>G. fragrans</i>	3,93 ^{Ba}	4,10 ^{Bb}	5,54 ^{Ca}	5,30 ^{Cb}	31,25 ^{Aa}	19,66 ^{Aa}
<i>K. marxianus</i>	3,94 ^{Ba}	4,10 ^{Bb}	4,60 ^{Aa}	4,18 ^{Ab}	68,98 ^{Ca}	66,84 ^{Ca}
<i>S. cerevisiae</i>	3,78 ^{Aa}	3,80 ^{Aa}	5,14 ^{Ba}	4,84 ^{Bb}	42,80 ^{Ba}	42,83 ^{Ba}

Notas: Médias seguidas pela mesma letra (maiúscula na coluna e minúscula na linha dentro de cada característica), não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

A variação de pH foi significativa entre os microrganismos (Tabela 8), em que o *S. cerevisiae* obteve as médias mais baixas, tanto no cultivo da glicose como da frutose, seguido pelo *K. marxianus* e, por último, pelo *G. fragrans*. A média de pH foi mais baixa nos cultivos com a glicose, com todos os microrganismos testados. Como a maior produção de FE foi obtida com a glicose, provavelmente houve maior liberação de ácidos orgânicos, como ocorreu na primeira etapa deste trabalho.

O *G. fragrans* produziu maior quantidade de biomassa, seguido pelo *S. cerevisiae* e pelo *G. fragrans* (Tabela 8). No entanto, esta grande produção de biomassa não significou aumento de produção de FE, como ocorreu na primeira etapa, quando o *S. cerevisiae* foi o que mais produziu biomassa e também FE. Quanto à fonte de carbono, os cultivos feitos com glicose obtiveram valores de biomassa superiores aos cultivos com frutose, para os três microrganismos estudados, evidenciando uma melhor adaptação com a glicose.

Na análise de variância da remoção de DQO, somente o fator microrganismo foi significativo (Tabela 6). O microrganismo mais eficiente na remoção da DQO continuou sendo o *K. marxianus*, seguido do *S. cerevisiae* e por último do *G. fragrans*, não importando se o açúcar acrescentado era a glicose ou a frutose (Tabela 8). Estas médias foram menores que as encontradas na etapa 1 do experimento.

Ao submeter os dados de consumo de açúcar ao teste de normalidade, foram obtidos p-valores inferiores a 0,05 a partir do teste de Shapiro-Wilk, resultando na inexistência de normalidade. Estes dados foram submetidos apenas à avaliação do coeficiente de variação, 1° e 2° quartil e mediana, conforme apresentado na Tabela 9.

Tabela 9 Estatística descritiva do consumo de açúcar redutor (%) pelos microrganismos *G. fragrans* (GF), *K. marxianus* (KM) e *S. cerevisiae* (SC), em meios com adição de glicose ou frutose

Micro-organismo	Fonte de carbono	Médias de consumo de açúcar redutor (%)				
		Cons. Aç. Red. (%)	Coef. variação	1° quartil	Mediana	3° quartil
GF	Glicose	34,86	2,54	33,19	35,47	35,91
	Frutose	38,50	34,96	32,25	40,16	43,07
KM	Glicose	99,51	0,04	99,46	99,52	99,52
	Frutose	99,51	0,06	99,45	99,53	99,54
SC	Glicose	99,15	0,09	99,06	99,17	99,21
	Frutose	96,99	1,20	95,76	97,33	97,87

Na avaliação do consumo de açúcares redutores, o *K. marxianus* e o *S. cerevisiae* consumiram praticamente todo o açúcar acrescentado ao meio, enquanto o *G. fragrans* somente consumiu 36,67%, em média (Tabela 9), semelhante ao ocorrido na etapa 1 do experimento. O fato de ser frutose ou glicose não fez diferença no consumo de açúcares.

Verifica-se na Tabela 9 a existência de coeficientes de variação menores que 10% nas amostras do *K. marxianus* e do *S. cerevisiae*, o que demonstra homogeneidade dos dados, porém o coeficiente de variação encontrado nos dados do *G. fragrans* com adição de frutose foi considerado alto: 34,96.

Na avaliação do 1° quartil, pode-se observar que os menores valores de consumo de açúcar redutor ocorreram para o *G. fragrans*, representando que 25% dos dados deste tratamento apresentaram valores abaixo de 33,19 g.L⁻¹. Os valores da mediana observados para o *G. fragrans* com adição de glicose ao meio foi bem próximo ao valor do 1° quartil, porém verificaram-se valores bem mais altos na mediana do *G. fragrans* com adição de frutose, fornecendo um coeficiente de variação de 34,96.

O *K. marxianus* e o *S. cerevisiae* obtiveram os maiores valores de consumo de açúcar, sendo que os dados foram bem homogêneos, havendo pouca variação entre o 1° quartil, mediana e 3° quartil.

5.4 Etapa 3 - Avaliação das Concentrações da Fonte de Carbono e L-fenilalanina

Planejamento inicial: fatorial (2)² e caminho da máxima inclinação

A matriz experimental para o planejamento fatorial (2)² está ilustrada na Tabela 10, com os níveis de cada fator e a produção de FE, no decorrer dos 9 ensaios, executados aleatoriamente.

Tabela 10 Matriz do planejamento fatorial (2)² com os níveis (codificados e reais) e respostas quanto à produção de 2-feniletanol (FE)

Ensaio	Fatores		Variável resposta
	Glicose (g.L ⁻¹)	PHE (g.L ⁻¹)	Produção de FE (g.L ⁻¹)
1	+1 (50)	-1 (0)	0,04
2	-1 (0)	-1 (0)	0,01
3	+1 (50)	+1 (3)	0,64
4	-1 (0)	+1 (3)	0,10
5	0 (25)	0 (1,5)	0,22
8	0 (25)	0 (1,5)	0,21
9	0 (25)	0 (1,5)	0,28

A estimativa dos efeitos da Glicose (g.L⁻¹) e da PHE (g.L⁻¹), em relação à produção de FE (g.L⁻¹), é ilustrada no diagrama da Figura 7.

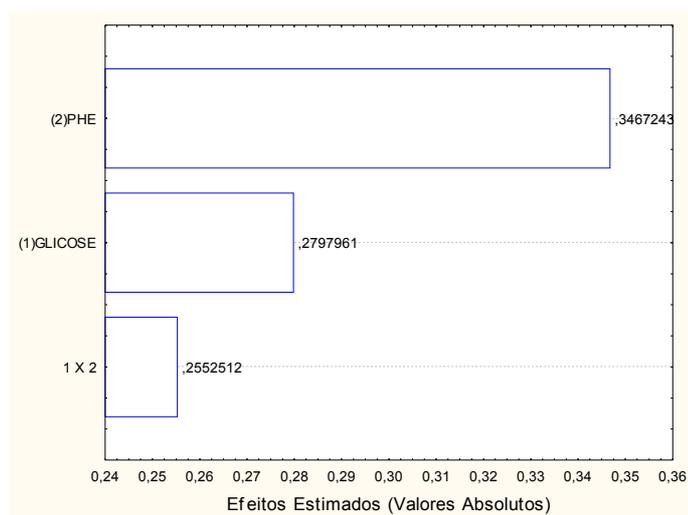


Figura 7 Diagrama de Pareto dos efeitos dos níveis de glicose e PHE na produção de 2-feniletanol (g.L⁻¹).

Observa-se na Figura 7 que o coeficiente das variáveis glicose e PHE apresentou valor positivo, significando que a produção de FE foi favorecida com os maiores valores de

glicose e PHE aplicados, ou seja, os valores positivos destes coeficientes significam que a produção de FE no sistema em estudo, tende a aumentar com o aumento dos mesmos. A interação entre os dois fatores também foi significativa.

Com os resultados experimentais obtidos (Tabela 9), ajustaram-se os dados para obtenção de um modelo de regressão linear, no processo de produção de FE, com os parâmetros avaliados. O modelo linear, ilustrado na Equação 2, apresentou $R^2 = 0,979$, significando que 97,9% da produção de FE é explicada pelo modelo. Na obtenção da Equação 2 foram considerados apenas os fatores significativos, ou seja, aqueles com $p\text{-valor} < 0,05$.

$$FE = 0,21 + 0,14 \text{ GLI} + 0,17 \text{ PHE} + 0,13 \text{ GLI} * \text{PHE} \quad (2)$$

No estudo da distribuição normal “t”, os valores de t_{Calc} são ilustrados no Diagrama de Pareto (Figura 8). Os valores de t_{Calc} , que estão além da linha tracejada ($p\text{-valor} = 0,05$), são considerados significativos para um intervalo de confiança de 95%.

A análise de variância foi necessária para avaliar o ajuste do modelo aos dados obtidos experimentalmente. Verificou-se, pela ANOVA, que o modelo linear pode ser usado para ilustrar o comportamento do processo ao nível de 95% de confiança, visto que o valor do F calculado, de 87,66, foi maior do que o F tabelado ($3;3;0,05$) = 9,28.

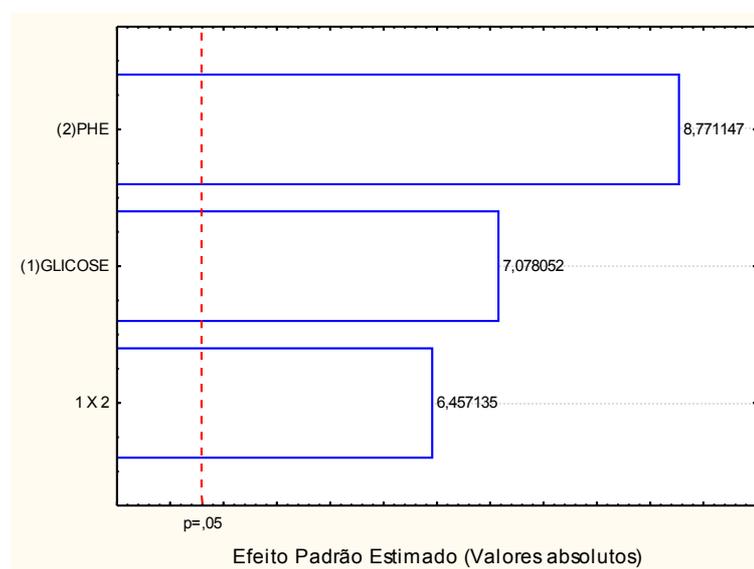


Figura 8 Diagrama de Pareto para produção de 2-feniletanol (g.L^{-1}).

Na Figura 9 visualiza-se o comportamento da produção de FE, através do gráfico de contorno.

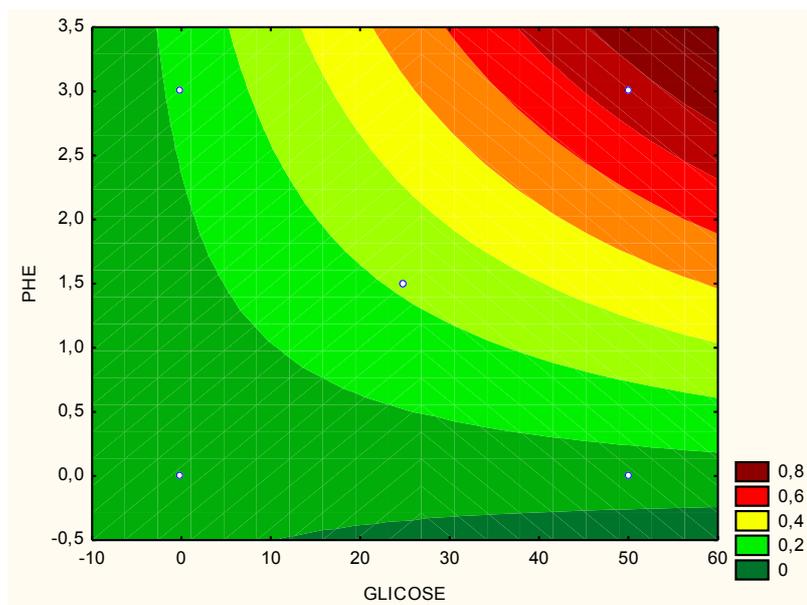


Figura 9 Gráfico de contorno com o perfil da produção de FE (g.L⁻¹).

Na Figura 9 observa-se que o melhor valor de produção de FE, 0,64 g.L⁻¹, foi obtido com glicose 50 g.L⁻¹ e PHE 3,0 g.L⁻¹. O tratamento com manipueira sem complementação quase não produziu FE. O tratamento com PHE e sem glicose produziu mais FE do que o tratamento com glicose e sem PHE, demonstrando a importância da presença do precursor na obtenção do FE. Este fato foi observado também por STARK *et al.* (2003) que, com valores baixos de PHE, obtiveram concentrações baixas de FE e, com valores altos do precursor, chegaram a obter uma conversão FE/PHE de 0,93 mol.mol⁻¹.

DAMASCENO *et al.* (2001) observaram que, quando cultivado em manipueira sem a complementação de carbono, o *G. fragrans* exalou o mesmo aroma frutal, porém em menor intensidade, o que justifica o aumento de carbono para produzir compostos de aroma em maiores concentrações.

Visando agilizar a identificação do ponto mais próximo da maior produção de FE, foi feito o Caminho da Máxima Inclinação (Tabela 11).

Tabela 11 Caminho da máxima inclinação quanto à produção de 2-feniletanol (FE)

Ensaio	Fatores		Variável resposta
	Glicose (g.L ⁻¹)	PHE (g.L ⁻¹)	Produção de FE (g.L ⁻¹)
1	30	3,0	0,35
2	40	4,5	0,33
3	50	5,1	1,20
4	60	6,6	0,71

A maior produção de FE obtida com o caminho de máxima inclinação foi 1,20 g.L⁻¹ de FE, utilizando 50 g.L⁻¹ de glicose e 5,1 g.L⁻¹ de PHE. Este foi o ponto central do DCCR feito a seguir, em que a faixa da glicose foi de 36 a 64 g.L⁻¹ e a faixa de PHE, de 3,0 a 7,2 g.L⁻¹, ambas aumentadas, visto que tiveram efeitos positivos sobre o aumento do FE no planejamento inicial.

5.4.1 Delineamento composto central rotacional

A matriz experimental para o primeiro delineamento composto central rotacional (DCCR) é apresentada na Tabela 12, com os níveis de cada fator e as variáveis respostas obtidas quanto à produção de FE, pH, biomassa, consumo de açúcares redutores e remoção de DQO, no decorrer dos 11 ensaios executados aleatoriamente.

Tabela 12 Matriz do primeiro planejamento DCCR com os fatores (codificados e reais) e respostas quanto a FE, pH, biomassa, consumo de açúcares redutores, remoção de DQO e bioconversão FE/glicose

Ensaio	Fatores				Variáveis resposta			
	GLI (g.L ⁻¹)	PHE (g.L ⁻¹)	FE (g.L ⁻¹)	pH	Biomassa (g.L ⁻¹)	Cons. Aç. Red. (%)	Rem. DQO (%)	Bioconv. FE/glicose (g.g ⁻¹)
1	1 (60)	-1 (3,6)	2,33	3,33	4,63	92,50	44,32	0,042
2	-1 (40)	-1 (3,6)	0,77	3,73	4,92	99,33	54,07	0,019
3	1 (60)	1 (6,6)	0,70	3,36	4,37	94,14	33,12	0,012
4	-1 (40)	1 (6,6)	1,03	3,65	4,71	99,24	45,06	0,026
5	-1,414 (36)	0 (5,1)	0,95	3,90	4,80	99,51	59,20	0,026
6	+1,414 (64)	0 (5,1)	1,35	3,32	4,32	88,18	47,52	0,024
7	0 (50)	-1,414 (3,0)	0,69	3,34	4,84	97,94	45,57	0,014
8	0 (50)	+1,414(7,2)	0,96	3,50	4,75	97,90	35,30	0,019
9	0 (50)	0 (5,1)	1,19	3,45	4,55	98,77	41,36	0,024
10	0 (50)	0 (5,1)	1,20	3,41	4,46	98,68	40,59	0,024
11	0 (50)	0 (5,1)	1,17	3,43	4,46	98,56	43,85	0,023

Com os resultados experimentais obtidos na produção de FE (Tabela 12), obteve-se um modelo de regressão quadrático, no processo de produção de FE, com os parâmetros avaliados. O modelo quadrático, ilustrado na Equação 2, apresentou R² = 0,744, significando que 74,4% da produção de FE são explicados pelo modelo. Na obtenção da Equação 3 foram considerados apenas os fatores com p-valor<0,05:

$$FE = 1,18 + 0,23 \text{ GLI} + 0,04 \text{ GLI}^2 - 0,12 \text{ PHE} - 0,12 \text{ PHE}^2 - 0,47 \text{ GLI} \cdot \text{PHE} \quad (3)$$

Observa-se na Equação 3 que o coeficiente da variável glicose apresentou valor positivo, significando que a produção de FE foi favorecida com os maiores valores de

glicose. No entanto, o coeficiente da variável PHE apresentou valor negativo, o que significa que a produção de FE no sistema em estudo, tende a aumentar com a diminuição de PHE.

Verificou-se, pela ANOVA, que o modelo quadrático pode ser usado para ilustrar o comportamento do processo, ao nível de 95% de confiança, visto que o valor do F calculado, de 8,61, foi maior do que o F tabelado $(5;5;0,05) = 5,05$.

Na Figura 10 visualiza-se o comportamento da produção de FE e da bioconversão FE/glicose, através dos gráficos de contorno.

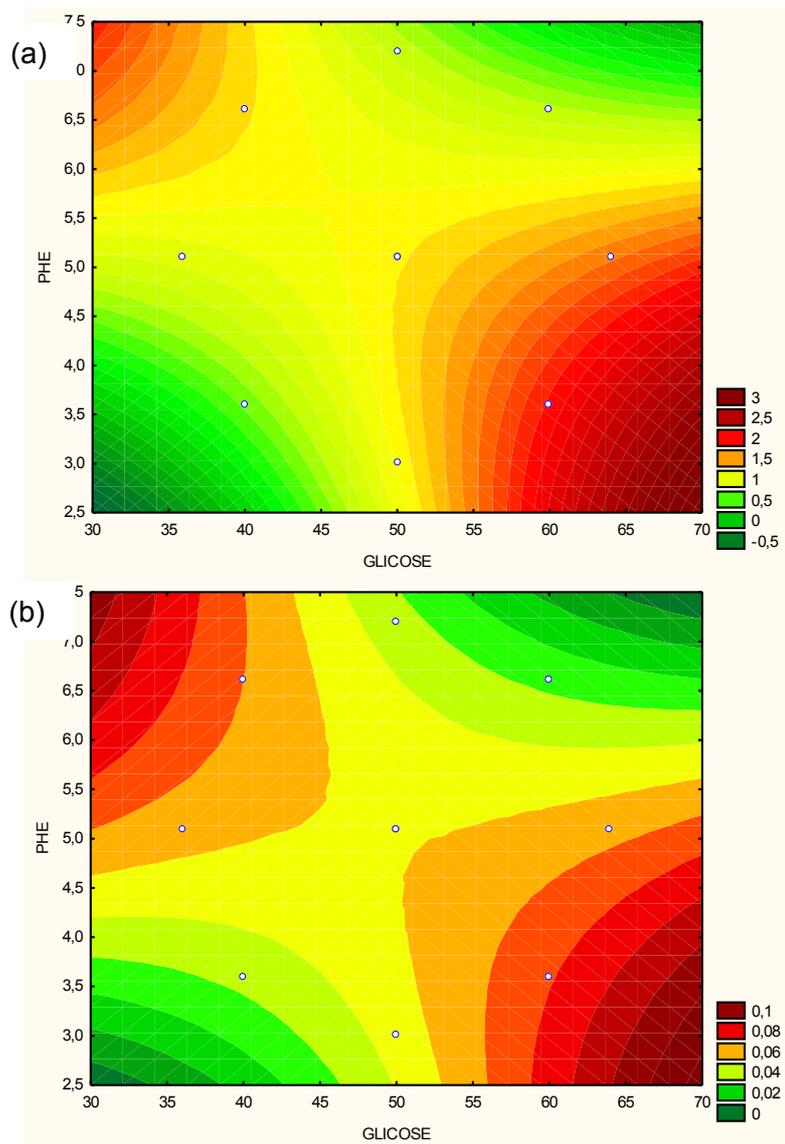


Figura 10 (a) Gráfico de contorno do 1º DCCR com a produção de FE (g.L^{-1}); (b) Gráfico de contorno do 1º DCCR com a bioconversão glicose/FE (g.g^{-1}).

Na Figura 10a observa-se que o melhor valor de produção de FE, $2,33 \text{ g.L}^{-1}$ foi obtido com glicose 60 g.L^{-1} e PHE $3,6 \text{ g.L}^{-1}$. Esta figura também mostra que há duas tendências para a obtenção de maior produtividade de FE: uma que utiliza valores altos de glicose e

baixos de PHE e a outra que utiliza valores baixos de glicose e altos de PHE. Optou-se pela primeira por apresentar valores de FE mais altos neste cultivo. O fato de o gráfico apresentar estas duas tendências pode ser explicado pela bioquímica das leveduras, que apresenta dois mecanismos de formação de FE. O primeiro é pela via de Erlich, a qual utiliza a PHE como matéria prima para formação do FE, o que deve justificar a produtividade com baixos valores de glicose e altos de PHE. O segundo é a via do fenilpiruvato, em que o FE pode ser produzido pela via do chiquimato, sem a participação da PHE (ETSCHMANN, SELL & SCHRADER, 2002).

A bioconversão FE/glicose apresentou gráfico de contorno (Figura 10b) semelhante ao da produção de FE, com a maior taxa de bioconversão FE/glicose de $0,042 \text{ g.g}^{-1}$, encontrada no ponto de 60 g.L^{-1} de glicose e $3,6 \text{ g.L}^{-1}$ de PHE. Este resultado demonstra que há uma tendência em aumentar a eficácia de conversão no mesmo sentido do aumento da produção de FE, porém percebe-se também um aumento da tendência de alta taxa de bioconversão no sentido de baixa concentração de glicose e alta concentração de PHE, bem mais evidente do que no gráfico de produção de FE.

Como o primeiro DCCR não chegou às melhores condições de obtenção do FE, passou-se para o segundo, em que os pontos das amostras foram calculados com uma distância maior entre eles, para evitar que todos os pontos ficassem num platô e não se verificasse a curvatura de declínio de produção de FE.

A matriz experimental, para o segundo delineamento composto central rotacional, é ilustrada na Tabela 13, com os níveis de cada fator e as variáveis respostas obtidas, quanto à produção de FE, pH, biomassa, consumo de açúcares redutores e remoção de DQO, no decorrer dos 11 ensaios executados aleatoriamente.

Tabela 13 Matriz do segundo planejamento DCCR com os fatores (codificados e reais) e respostas quanto a FE, pH, biomassa, consumo de açúcares redutores e remoção de DQO

Ensaio	Fatores				Variáveis resposta			
	GLI (g.L^{-1})	PHE (g.L^{-1})	FE (g.L^{-1})	pH	Biomassa a (g.L^{-1})	Cons.aç.red (%)	Rem. DQO (%)	Bioconv. FE/glicose (g.g^{-1})
1	-1 (31,6)	-1 (1,9)	1,38	4,45	6,14	98,75	79,93	0,043
2	1 (88,4)	-1 (1,9)	1,93	3,28	4,71	77,10	72,45	0,028
3	-1 (31,6)	1 (6,1)	1,99	3,93	5,59	98,66	50,51	0,063
4	1 (88,4)	1 (6,1)	2,41	3,44	5,38	92,30	47,57	0,029
5	-1,414 (20)	0 (4)	1,41	4,00	5,79	98,15	68,55	0,070
6	+1,414 (100)	0 (4)	1,95	3,30	4,68	77,24	50,06	0,025
7	0 (60)	-1,414 (1)	0,27	4,16	2,73	94,32	38,15	0,005
8	0 (60)	+1,414(7)	2,22	3,51	5,61	99,11	33,86	0,037
9	0 (60)	0 (4)	2,37	3,60	4,82	99,01	55,60	0,039
10	0 (60)	0 (4)	2,28	3,43	4,96	98,34	52,85	0,038
11	0 (60)	0 (4)	1,97	3,40	5,40	98,69	54,99	0,033

Com os resultados experimentais obtidos de produção de FE (Tabela 13), obteve-se um modelo de regressão linear, com os fatores avaliados. O modelo linear, ilustrado na Equação 4, apresentou $R^2 = 0,776$, significando que 77,6% da produção de FE são explicados pelo modelo.

$$FE = 2,21 + 0,48 PHE \quad (4)$$

Na obtenção da Equação 4 foram considerados apenas os fatores com p -valor < 0,05. Observa-se, nesta equação, que somente o coeficiente da variável PHE foi significativo e apresentou valor positivo, significando que a produção de FE foi favorecida com os maiores valores de PHE. A variável glicose apresenta pouca ou nenhuma influência sobre a produção do aroma.

Verificou-se, pela ANOVA (Tabela 14), que o modelo linear pode ser usado para ilustrar o comportamento do processo, ao nível de 95% de confiança, visto que o valor do F calculado, de 10,27, foi maior do que o F tabelado (5;5;0,05) = 5,05.

Tabela 14 Análise de variância para produção de 2-feniletanol do 2º DCCR

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{cal} (95%)	F _{tab} (95%)	F _{cal} /F _{tab}
Regressão (modelo)	3,122	5	3,122	10,27	5,05	2,03
Resíduos	0,867	5	0,867	-	-	-
Falta de ajuste	0,777	3	0,259	5,75	19,16	0,30
Erro puro	0,090	2	0,045	-	-	-
Total	0,876	10	-	-	-	-

Observa-se, na Tabela 14, que a razão do F calculado pelo F tabelado para a regressão apresentou valor estatisticamente significativo para a equação, fato evidenciado pelo valor superior a 1. Não foi observada significância na falta de ajuste para o modelo, pois a razão F_{cal}/F_{tab} para falta de ajuste foi inferior a 1 (BARROS NETO; SARMINO & BRUNS, 2007).

Na Figura 11, visualiza-se o comportamento da produção de FE, através do gráfico de contorno, e o gráfico obtido com os dados de bioconversão FE/glicose ($g \cdot g^{-1}$).

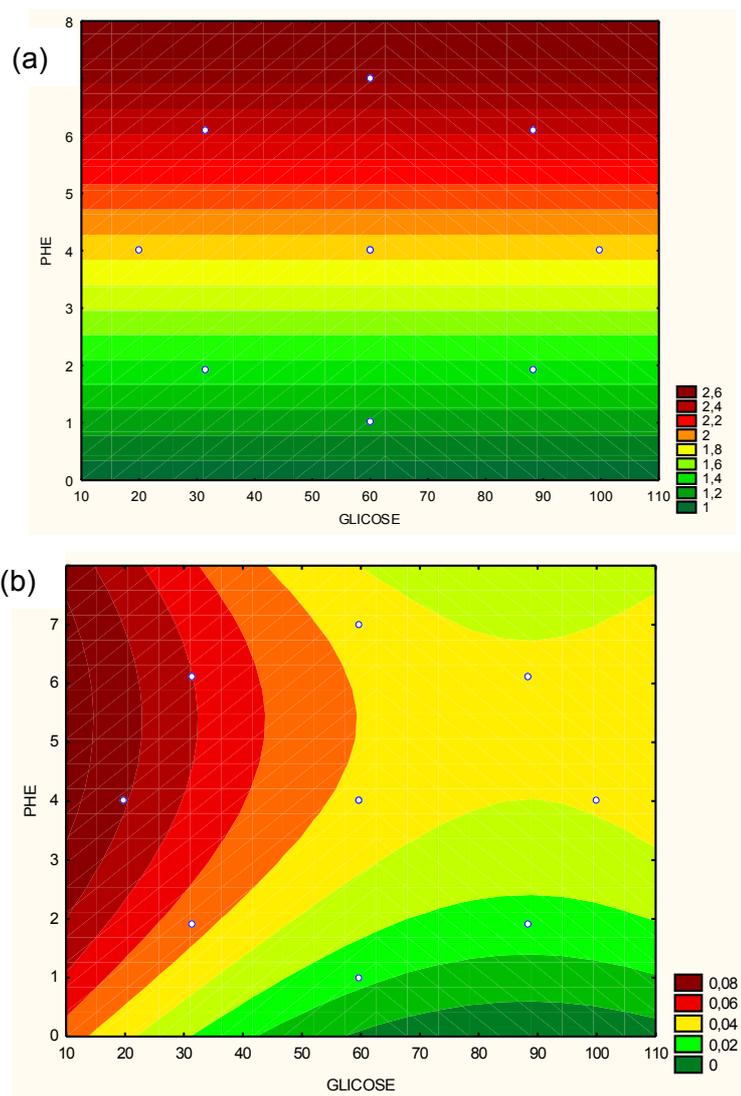


Figura 11 (a) Gráfico de contorno do 2^o DCCR com o perfil da produção de FE (g.L⁻¹); (b) Gráfico de contorno do 2^o DCCR com o perfil da bioconversão glicose/FE (g.g⁻¹).

Na Figura 11a observa-se que o melhor valor de produção de FE, 2,42 g.L⁻¹, foi obtido com glicose 88,4 g.L⁻¹ e PHE 6,1 g.L⁻¹. Este valor é bem próximo da média de produção de FE obtida no ponto central deste DCCR, que foi de 2,20 g.L⁻¹ com os valores de 60 e 3,6 g.L⁻¹ de glicose e PHE, respectivamente. Como somente o fator PHE linear foi significativo, observa-se no gráfico uma tendência de aumento da produção de FE com valores mais altos de PHE. O gráfico mostra ainda, que o aumento do PHE vai acarretar um aumento da produção de FE, enquanto que o aumento da quantidade de glicose não vai ter influência alguma sobre a produção de FE. HUANG, LEE & CHOU (2001) utilizaram *Pichia fermentans* em 18% de sacarose, 0,25% de levedo de cerveja e 0,1% de PHE, e também observaram que, quando havia maior consumo da PHE, também havia maior produção de

FE. STARK *et al.* (2003) utilizaram *S. cerevisiae* e obtiveram as mais altas taxas de produção de FE ($0,34 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) com uma concentração de L-PHE de $5,8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

ETSCHMANN, SELL & SCHRADER (2004) obtiveram $3,28 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de FE, em meio contendo $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de melaço acrescido de vitaminas e minerais, usando o *S. cerevisiae*.

Neste cultivo, a bioconversão FE/glicose apresentou gráfico de contorno (Figura 11b) diferente da produção de FE, demonstrando que o rendimento de bioconversão, taxa valorizada na indústria, onde se quer a máxima produção sem desperdício de matéria-prima, não aumentou com a mesma tendência da produção de FE. O gráfico demonstrou que, se houver aumento de PHE e diminuição da glicose, haverá aumento da taxa de bioconversão. Portanto, ambos demonstram que a produção e a bioconversão aumentariam com o aumento de PHE. A melhor taxa obtida de bioconversão FE/glicose foi de $0,070 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$, com a amostra que continha $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de glicose e $4,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de PHE.

Utilizando a metodologia da superfície de resposta e aplicando-se a técnica da desejabilidade (DERRINGER & SUICH, 1980; CALADO & MONTGOMERY, 2003), para os dados de produção de FE com os de Bioconversão FE/glicose, obteve-se o gráfico de superfície de resposta em sobreposição apresentado na Figura 11.

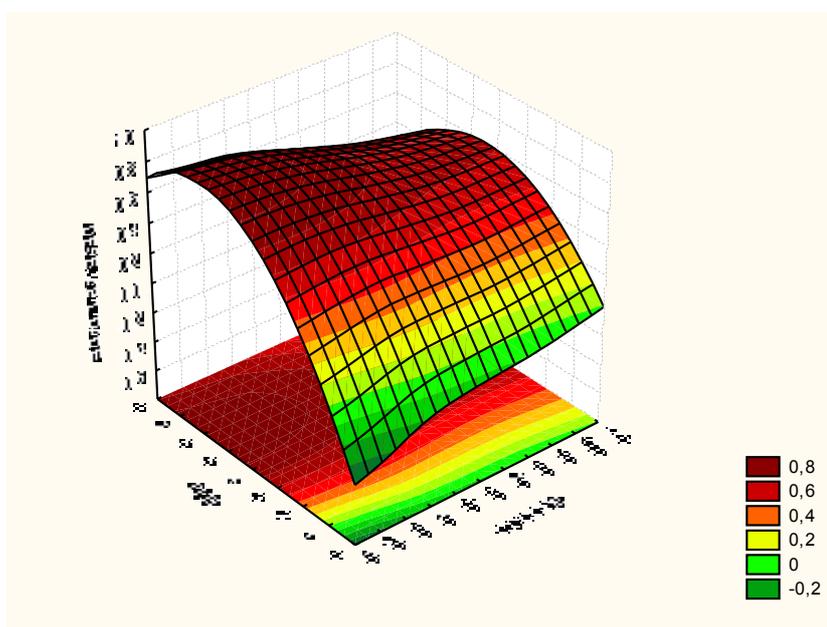


Figura 12 Gráfico de superfície de resposta obtido com os dados de produção de FE ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) e de bioconversão FE/glicose ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$).

Estes valores em sobreposição geraram um gráfico de desejabilidade (Figura 12), onde foram seleccionados os pontos de glicose ($20,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) e de PHE ($5,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) para obtenção dos melhores valores de produção de FE e de bioconversão FE/glicose, apresentando uma desejabilidade global de 84,4% das respostas desejadas.

Os índices de desejabilidade global, em função dos níveis de glicose e PHE obtidos na Figura 13, indicam que o valor de FE a ser obtido é de $1,79 \text{ g.L}^{-1}$ e o valor da bioconversão FE/glicose, de $0,78$.

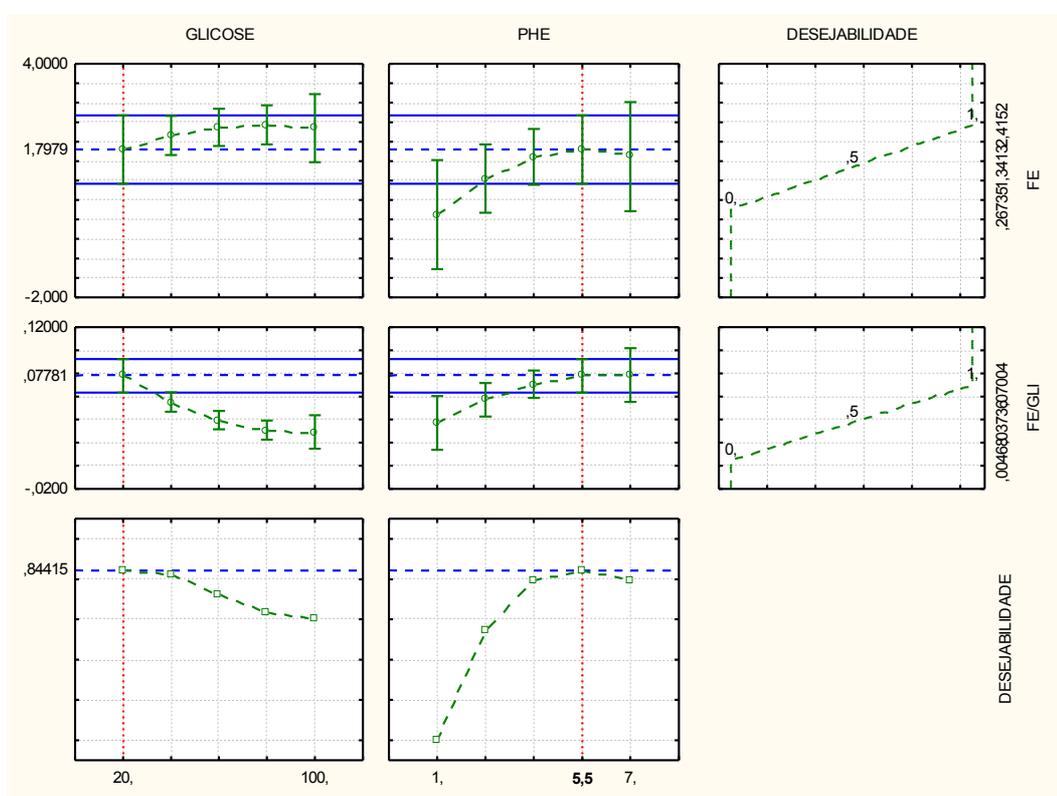


Figura 13 Índices de desejabilidade global em função dos níveis de glicose e PHE.

5.5 Etapa 4 - Validação

A validação experimental da produção de FE e da bioconversão FE/glicose nas condições otimizadas foi realizada em triplicata nas condições, X_1 – glicose de 20 g.L^{-1} e X_2 – PHE de $5,5 \text{ g.L}^{-1}$, e calculou-se a média ($0,98$), o desvio-padrão ($0,34$) e o coeficiente de variação ($CV= 34,87\%$).

A produção de FE (g.L^{-1}) e o consumo de PHE (%) em função do tempo são apresentados na Figura 14.

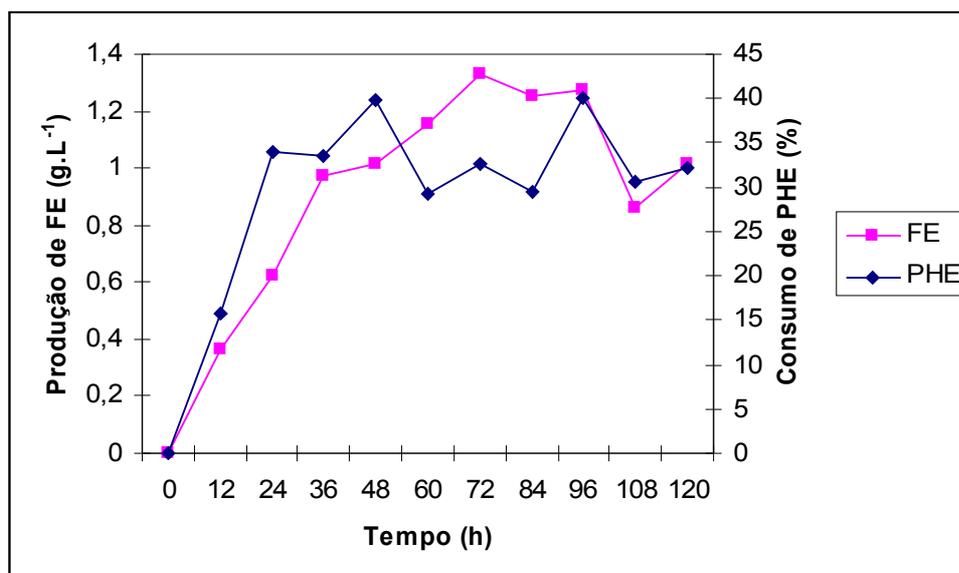


Figura 14 Gráfico da produção de 2-feniletanol e do consumo de L-fenilalanina, em função do tempo, obtido na validação do modelo.

A produção máxima de FE obtida foi de $1,33 \text{ g.L}^{-1}$, obtida em 72 h de cultivo (Figura 14). Este valor equivale a 74,3% do valor dado pelo gráfico de desejabilidade, que era de $1,79 \text{ g.L}^{-1}$.

O melhor rendimento de bioconversão ocorreu em 72 h, obtendo-se $0,070 \text{ g.g}^{-1}$ de FE/glicose. Este valor equivale a 89,7% do esperado no gráfico de desejabilidade, que era de $0,078 \text{ g.g}^{-1}$, ficando bem próxima da desejada.

Após as primeiras 36 h, o consumo de PHE oscilou entre 30 e 40%, não ultrapassando este último valor. Permaneceu no meio um residual de $3,73 \text{ g.L}^{-1}$ de PHE ao final das 120 h. Este fato demonstra que, apesar da produção de FE ser aumentada na presença de maior quantidade de PHE, esta não é totalmente consumida pela levedura. STARK *et al.* (2002) também observaram que a PHE, a partir de 12 h de cultivo, praticamente não foi mais consumida pelo *S. cerevisiae*, permanecendo no meio, ao final do processo de 42 h, cerca de 5 g.L^{-1} de PHE, dos $13,8 \text{ g.L}^{-1}$ iniciais. O meio continha 270 g.L^{-1} de glicose, em processo contínuo.

GARAVAGLIA (2006) observou que a concentração total do precursor não foi consumida, restando $0,92 \text{ g.L}^{-1}$ de PHE ao final do cultivo de 100 h, sendo 74% da PHE consumida durante a bioconversão FE/PHE. O meio continha $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ iniciais de PHE. Observa-se que a partir de 20 h de cultivo houve um pequeno consumo de PHE, porém sofreu um forte incremento a partir de 40 h de cultivo.

HUANG, LEE & CHOU (2000) afirmam que a porcentagem de consumo de PHE diminui quando a concentração inicial do precursor no meio é aumentada. Porém, a quantidade total de PHE nunca é completamente convertida em FE (STARK *et al.*, 2003).

Os resultados das variáveis respostas obtidas quanto ao pH, biomassa, consumo de açúcares redutores e remoção de DQO, no decorrer dos 11 ensaios executados aleatoriamente, estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 Média de bioconversão FE/glicose, pH, biomassa, consumo de açúcares redutores e remoção de DQO no cultivo de validação do modelo

Tempo (h)	Bioconversão FE/glicose (g.g ⁻¹)	pH	Biomassa (g.L ⁻¹)	Consumo açúc. Redutores (%)	Remoção DQO (%)
12	0,019	3,78	1,36	92,87	6,39
24	0,032	3,76	2,97	95,08	4,10
36	0,048	3,97	3,44	99,11	31,95
48	0,050	4,45	4,04	99,08	41,02
60	0,057	4,38	4,21	99,07	43,42
72	0,066	4,21	4,10	98,68	43,10
84	0,062	3,88	4,40	98,70	39,93
96	0,063	3,86	4,14	98,72	36,98
108	0,042	3,94	4,28	98,75	41,13
120	0,050	4,06	4,25	98,60	42,88

Observou-se que, tanto no primeiro quanto no segundo DCCR, a concentração de glicose foi determinante na variação do pH. Quanto menor a concentração de glicose, mais altos os valores de pH encontrados. Os valores mais altos de pH coincidem com as melhores taxas de obtenção de FE, como também foi observado na cinética de validação.

No primeiro DCCR, a biomassa apresentou valores maiores em concentrações baixas e médias de glicose, e nos valores altos e baixos de PHE. No segundo DCCR, a biomassa não variou com os valores de glicose, porém com altas taxas de PHE se verificaram valores maiores de biomassa. Na cinética de validação, após as primeiras 24 h, não houve um aumento considerável da biomassa, assim como do FE.

O consumo de açúcares redutores no primeiro e segundo DCCR foi maior quanto maior foi a quantidade de PHE do meio, provavelmente em virtude de uma maior quantidade de biomassa, consequentemente consumindo mais a fonte de carbono. Na cinética de validação, os açúcares redutores foram consumidos quase que totalmente já nas primeiras 36 h.

No primeiro DCCR, valores baixos de glicose com valores baixos ou médios de PHE foram melhores para uma maior remoção de DQO. No segundo DCCR, observou-se a mesma tendência, porém, também verificada com valores altos de glicose e baixos ou

médios de PHE, porém com menor intensidade de remoção. Na cinética de validação, a remoção de DQO não chegou a 50%.

Na Tabela 16 são apresentados os resultados dos parâmetros fermentativos Produtividade (Q_p), rendimento em biomassa ($Y_{x/s}$) e rendimento em produto ($Y_{p/s}$) para *S. cerevisiae*.

Tabela 16 Parâmetros fermentativos produtividade (Q_p), rendimento em biomassa ($Y_{x/s}$) e rendimento em produto ($Y_{p/s}$) para *S. cerevisiae*

Tempo	Q_p ($g.L^{-1}.h^{-1}$)	$Y_{x/s}$ ($g.g^{-1}$)	$Y_{p/s}$ ($g.g^{-1}$)
12	0,0301	0,0713	0,0189
24	0,0259	0,1516	0,0318
36	0,0270	0,1686	0,0477
48	0,0211	0,1980	0,0497
60	0,0192	0,2065	0,0567
72	0,0185	0,2022	0,0656
84	0,0149	0,2165	0,0618
96	0,0133	0,2037	0,0628
108	0,0080	0,2109	0,0424
120	0,0085	0,2096	0,0501

O rendimento em produto observado na Tabela 16 foi cerca de 250% superior ao encontrado no primeiro cultivo do *S. cerevisiae*, em que se obteve $0,0108 g.L^{-1}.h^{-1}$ em 24 h (Tabela 5), indicando uma melhora considerável na obtenção do produto. O rendimento diminuiu ao longo do tempo, como ocorreu no primeiro cultivo.

O rendimento em biomassa não teve um incremento muito grande nas primeiras 24 h, como ocorreu no primeiro cultivo, em que se obteve 0,3295 e depois estabilizou entre 0,1671 e 0,1808 (Tabela 5). No presente cultivo, o rendimento em biomassa aumentou lentamente ao longo do tempo, atingindo, em 48 h, valores que variaram entre 0,1980 e 0,2109. O grande incremento observado no primeiro cultivo, em relação a este, provavelmente se deve à existência de maior quantidade de glicose disponível ao microrganismo ($50 g.L^{-1}$), proporcionando um grande ganho em biomassa. Na medida em que a glicose foi consumida, o que ocorreu nas primeiras 48 h, no caso do primeiro cultivo, o rendimento diminuiu paralelamente.

O rendimento em produto foi bem superior ao observado no primeiro cultivo, em que teve o maior rendimento em 72 h, com o valor de 0,0152 (Tabela 5). No presente cultivo, foi observado no mesmo tempo, o rendimento de 0,0656, cerca de 600% superior ao primeiro.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram concluir que:

1. O *S. cerevisiae* foi o melhor produtor de 2-feniletanol em resíduo líquido de fecularia de mandioca, seguido pelo *K. marxianus* e *G. fragrans*, respectivamente.
2. A glicose foi a melhor fonte de carbono para obtenção do 2-feniletanol para *S. cerevisiae* e *K. marxianus*.
3. Não houve diferença significativa entre a produção de 2-feniletanol utilizando glicose ou frutose para o *G. fragrans*.
4. O estudo das variáveis glicose e PHE, pela metodologia de superfície de resposta, alcançou as expectativas, visto que foram obtidas produções maiores de FE e maior eficiência de bioconversão.
5. Os modelos obtidos para a produção de FE foram estatisticamente significativos, ao nível de 95% de significância.
6. Os maiores valores de FE foram alcançados com a concentração de glicose de 20,0 g.L⁻¹ e PHE de 5,5 g.L⁻¹, os quais foram validados experimentalmente, obtendo-se produção de FE de 74,3% e eficiência de bioconversão FE/glicose de 89,7%, em relação aos valores de desejabilidade, segundo o modelo validado.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a finalidade de aumentar a produção de FE, recomendam-se a realização de novas pesquisas em que sejam testadas maiores concentrações de PHE, temperaturas mais elevadas, velocidades de agitação maiores, outros valores de pH do substrato e utilizando técnicas de remoção do produto na medida em que é produzido, para melhorar a taxa de obtenção de FE.

REFERÊNCIAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH – APH; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION – AWWA; WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION - WPCF. Standard Methods for examination of water and wastewater. 18 ed. Washington, APHA/AWWA/WPDF, 1992.

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

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE AMIDO DE MANDIOCA – ABAM. **Evolução da produção, 1990/2008**. 2009. Disponível em <<http://www.abam.com.br>>. Acesso em: 22 jan. 2010.

BALBANI, A. P. S.; STELZER, L. B.; MONTOVANI, J. C. Excipientes de medicamentos e as informações da bula. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, São Paulo, v. 72, n. 3, p. 400-406, maio/jun. 2006.

BARANA, A. C.; CEREDA, M. P. Avaliação do tratamento de manipueira de farinheiras em biodigestores fase acidogênica e metanogênica. **Energia na Agricultura**, Botucatu, v. 4, n. 15, p. 69-81, 2001.

BARANA, A. C.; CEREDA, M. P. Tratamento de água residual do processamento de mandioca (manipueira) utilizando biodigestor anaeróbio de duas fases. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 2, p. 181-186, maio/ago. 2000.

BARROS NETO B.; SARMINO I. S.; BRUNS R. E. **Como fazer experimentos**. Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 3. ed. Campinas/SP : Editora da Unicamp, 2007.

BAUER, K.; GARBE.; D. SURBURG, H. **Common fragrance and flavor materials. Preparation, properties and uses**. 4. Ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2001.

BEDOUKIAN, P. Z. **Phenyl ethyl alcohol**. In: *Perfumery and flavoring synthetics*. Allured, Wheaton, 1986. P. 370–383.

BERGER, C.; KHAN, J. A.; MOLIMARD, P.; MARTIN, N.; SPINLER, H.E. Production of sulfur flavors by ten strains of *Geotrichum candidum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65 n. 12, p. 5510-5514.1999.

BRAMORSKI, A. **Caracterização do crescimento e produção de compostos metabólitos voláteis por fungos filamentosos cultivados sobre substratos agro-industriais**. 1997, 112 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - UFPR, Curitiba, PR, Brasil, 1997.

BRASIL. Resolução de Diretoria Colegiada nº 02, de 15 de janeiro de 2007. Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes. Diário Oficial da União, Brasília, DF, seção 1. p. 41, 17/01/2007.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. C. **Planejamento de experimentos usando o Statistica**. Rio de Janeiro: E-Papers, 2003. 260 p.

CARVALHO, P. R. Aditivos dos alimentos. **Revista Logos**, Faculdade de filosofia Ciências e Letras de São José do Rio Pardo, São José do Rio Pardo. n. 12, p. 57-69. 2005.

CEREDA, M. P. Caracterização dos resíduos da industrialização da mandioca. In: CEREDA, M. P. (Ed). **Resíduos da industrialização da mandioca**. São Paulo: Paulicéia, 1994, p. 11-50.

COLIN, X.; FARINET J. L.; ROJAS, O.; ALAZARD, D. Anaerobic treatment of cassava starch extraction wastewater using a horizontal flow filter with bamboo as support. **Bioresource Technology**, New York, v. 98, p. 1602-1607, set. 2006.

COSTELLI, M. C.; MILLER, K. J.; LUERCE, R. F.; FURIGO JUNIOR, A. Influência do pH inicial e do tempo de cultivo do inóculo na produção de acetoina por *Bacillus polymyxa*. **Acta Ambiental Catarinense**, Chapecó, Brasil, v. 3, n. 2, p. 55-64, 2004.

DAIGLE, P.; GÉLINAS, P.; LEBLANC, D.; MORIN, A. Production of aroma compounds by *Geotrichum candidum* on waste bread crumb. **Food Microbiology**, Quebec, v. 16, n. 5, p. 517-522, 1999.

DAMASCENO, S. **Cultivo de *Geotrichum fragans* em manipueira**. 1999. 114 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, 1999.

DAMASCENO, S.; CEREDA, M. P.; PASTORE, G. M.; OLIVEIRA, J. G. Compostos de aroma por *Geotrichum fragans* cultivado em manipueira. In: CEREDA, M. P. (Coord.). **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**. v. 4. São Paulo: Cargill, 2001. p. 96-107.

DAMASCENO, S; CEREDA, M. P.; PASTORE, G .M.; OLIVEIRA, J. G. Production of volatile compounds by *Geotrichum fragans* using cassava wastewater as substrate. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v. 39, n. 4, p. 411- 414, 2003.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality Technology**, New York, v. 12, n. 4, p. 214-219, 1980.

DRAWERT, F; BARTON, H. Biosynthesis of flavor compounds by microorganisms: production of monoterpenes by the yeast *Kluyveromyces lactis*. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, New York, v. 26, n. 3, p. 765-766, 1978.

EHRlich F. Über die Bedingungen der Fuselölbildung und über ihren Zusammenhang mit dem Eiweißaufbau der Hefe. **Ber. Dtsch. Chem. Ges.**, Berlin, v. 40, p. 1027–1047. 1907.

ESCRIG F. Improved propylene oxide and styrene monomer co-production procedure. Patent application EP0943611A1.1999.

ETSCHMANN, M. M. W; SELL, D.; SCHRADER, J. Biotechnological production of 2-phenylethanol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Münster, v. 59, p. 1–8, 2002.

ETSCHMANN, M. M. W; SELL, D.; SCHRADER, J. S. cerevisiaereening 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; SCHRADER, J. An aqueous–organic two-phase bioprocess for efficient production of the natural aroma chemicals 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate with yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**. Münster v. 71 p. 440–443, 2006.

FABRE, C. E.; BLANC, P. J.; GOMA, G. 2-Phenylethyl alcohol: an aroma profile. **Perfumer and Flavorist**, New York, v. 23, p. 43-45, 1998a.

FABRE, C. E., BLANC, P. J., GOMA, G. Production of 2-phenylethyl alcohol by *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology progress**, Washington, v. 14, p. 270-274. 1998b.

FANTIN, G.; FOGAGNOLO, M.; GUERZONI, M. E.; MEDICI, A.; PEDRINI, P.; POLI, S. Stereochemical control in Baker's yeast redox biotransformation of aryl methyl ketone and carbinols. **Journal of Organic Chemistry**. Washington, v. 59, p.924-925.1994.

FEIDEN, A.; CEREDA, M. P. Potencial energético de gás gerado no tratamento de águas residuárias de fecularia de mandioca em sistema piloto de biodigestão com separação de fases. **Energia na Agricultura**, Botucatu, v. 18, n. 2, p. 54-66, 2003.

FIORETTO, A. M. **Viabilidade de cultivo de *Trichosporon sp* em manipueira**. 1987. 96 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1987.

FIORETTO, R. A. Uso direto da manipueira em fertirrigação, In: CEREDA, M. P. (org.). **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**. v. 4. São Paulo: Fundação Cargill, 2001. p. 67-79.

GARAVAGLIA, J. **Bioconversão de L-fenilalanina em 2-feniletanol por *Kluyveromyces marxianus* em mosto de uva**. 2006. 105 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e Meio Ambiente) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

GARAVAGLIA J.; FLORES S. H.; PIZZOLATO T. M.; PERALBA M. C.; ZACHIA AYUB M. A.; Bioconversion of L-phenylalanine into 2-phenylethanol by *Kluyveromyces marxianus* in grape must cultures. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v. 23, n. 9, p. 1273-1279. 2007.

GODOY, A. M. G; SANTOS, R.J.C. **A Gestão dos efluentes líquidos da Indústria de Mandioca**. ENCONTRO NACIONAL DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO, 22, 2002. Curitiba – PR. Disponível em: http://www.abepro.org.br/biblioteca/ENEGEP2002_TR104_0414.pdf. Acesso em: 12 fev. 2010.

GROXKO, M. **Análise da conjuntura agropecuária safra 2007-2008**. Curitiba: Secretaria da Agricultura e do Abastecimento, set. 2007. Disponível em: <http://www.seab.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/mandioca_2007_08.doc>. Acesso em: 5 maio 2010.

GUICHARD, H.; BONNARME, P. Development and validation of a plate technique for screening of microorganisms that produce volatile sulfur compounds. **Analytical Biochemistry**. Amsterdam, v. 15, n. 2; p. 299-305. 2005.

HUANG, C. J.; LEE, S. L.; CHOU, C. C. Production and molar yield of 2-phenylethanol by *Pichia fermentans* I-5 as affected by some medium components. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Japan, 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**. Toronto, v. 34, p. 277-282, 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Publicação Indicadores. IBGE, 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm>. Acesso em: 12 fev. 2010.

JANSSENS, L.; DE POOTER, H. L.; VANDAMME, E. J.; SCHAMP, N. M. Bio-synthesis of esters by *Geotrichum penicillatum*. In: **Bioflavour'87**, 1987, Würzburg. Analysis – Biochemistry – Biotechnology. Berlin: Walter de Gruyter, p. 453-463, 1988.

JANSSENS, L.; POOTER, H. L.; SCHAMP, N. M.; VANDAMME, E. J. Production of flavour by microorganisms. **Process Biochemistry**. Amsterdam, v. 27, p. 195-215, 1992.

LATRASSE, A.; DAMERON, P.; HASSANI, M.; STARON, T. Production d'un arôme fruité par *Geotrichum candidum* (staron). **Sciences des aliments**, Paris, v. 7, p. 637-645, 1987.

KUCZMAN, O. **Tratamento anaeróbio de efluentes de fecularia em reator horizontal de uma fase**. 2007. 70 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2007.

KUCZMAN, O.; TORRES, D. G. B.; ALCANTARA, M. S.; TAVARES, M.H.F.; GOMES, S. D. Tratamento anaeróbio de efluente de fecularia em reator horizontal de uma fase. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**. v. 3, p. 5, 2007.

KUMAR A.; RAWLINGS R. D.; BEAMAN D. C. The mystery ingredients: sweeteners, flavorings, dyes, and preservatives in analgesic/antipyretic, antihistamine/decongestant, cough and cold, antidiarrheal, and liquid theophylline preparations. **Pediatrics**. Elk Grove Village, v. 91. p. 927-33, 1993.

LEONEL, M. Uso dos subprodutos da industrialização da mandioca na alimentação animal. In: CEREDA, M. P. **Culturas de tuberosas amiláceas latino americanas**. v. 4. São Paulo: Fundação Cargill, 2001. p. 229-239.

LEONEL, M.; CEREDA, M. P. Manipueira como substrato na biossíntese de ácido cítrico por *Aspergillus niger*. **Scientia agricola**, Piracicaba, v. 52, n. 2, 1995.

MAMEDE, M. E. O.; PASTORE, G. M. Avaliação da produção dos compostos majoritários da fermentação de mosto de uva por leveduras isoladas da região da "Serra Gaúcha" (RS). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 3, p. 453 - 458, 2004.

MAMEDE, M. E. O.; PASTORE, G. M. Avaliação de mosto de uva fermentado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 2, 2007.

MARQUES, D. B. **Produção e caracterização de aromas de frutas por linhagem de levedura previamente selecionada**. 1998. 138 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos/Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 1998.

MEDEIROS, A. B. P.; PANDEY, A.; FREITAS, R. J. S.; CHRISTEN, P.; SOCCOL, C. R. Optimization of the production of aroma compounds by *Kluyveromyces marxianus* in solid-

state fermentation using factorial design and response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 6, n. 1, p. 33-39. 2000.

MEI J.; MIN H.; LÜ Z. Enhanced biotransformation of L-phenylalanine to 2-phenylethanol using an in situ product adsorption technique. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v. 44, p. 886-890. 2009.

NITSCHKE, G.; FERRAZ, C.; PASTORE, G.M. Seleção de microrganismos para a produção de biossurfactantes em resíduos agroindustriais. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 35, n. 1-2, p. 81 - 85, 2004.

OLIVEIRA, M. A.; REIS, E. M.; NOZAKI, J. Biological treatment of wastewater from the cassava meal industry. **Environmental Research**, New York, v. 85, p. 177-183, mar. 1999.

PASTORE, G. M.; SATO, H. H.; YANG, T. S.; PARK, Y. K.; MIN, D. B. Production of fruity aroma by newly isolated yeast. **Biotechnology Letters**, New York, v. 16, n. 4, p. 389-392, 1994.

PEREIRA, C. D. A. **Produção de metabólitos voláteis frutais por *Kluyveromyces marxianus* em fermentação submersa em meio à base de melão de soja**. 2007. 80 f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

GOMES, F. P. **Curso de estatística experimental**, 14. ed. Piracicaba: Nobel, 2000.

PINOTTI, T.; CARVALHO, P. M. B.; GARCIA, K. M. G.; SILVA, T. R.; HAGLER, A. N.; LEITE, S. G. F. Influência da composição do meio de cultivo e da suplementação com aminoácidos na produção de aroma frutal por *Geotrichum candidum*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 494 - 498, 2006.

PINTO, P. H. M.; CABELLO, C. Tratamento de efluentes líquidos de fecularia em biodigestores anaeróbios de fluxo ascendente. **Revista raízes e amidos tropicais**, Botucatu, v. 3, p. 1-4, 2007.

PRADO, M. R. **Estudo de alternativas para o reaproveitamento de resíduos líquidos em fecularias**. In: CONGRESSO INTERAMERICANO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 27., 2000, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: ABES, 2000. 1 CD-ROM.

REZENDE, R. P.; DIAS, J. C. T.; MONTEIRO, A. S.; CARRAZA, F.; LINARDI, V. R. The use of acetonitrile as the sole nitrogen and carbon source by *Geotrichum* sp. JR1. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 35, n. 1-2, p. 117 - 120, 2003.

[RIBAS, M. M.](#); CEREDA, M. P. Comparação da estabilização da manipueira com calcáreo e hidróxido de sódio na fase acidogênica da biodigestão anaeróbia. **Energia na Agricultura**, São Paulo, v. 19, p. 33-46, 2004.

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

SCHRADER, J.; ETSCHMANN, M. M. W.; SELL, D.; HILMER, J. M.; RABENHORST, J. Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavour compounds – current industrial process and future prospects. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 26, p. 463-474, 2004.

SENDOVSKI, M.; NIR, N.; FISHMAN, A. Bioproduction of 2-Phenylethanol in a Biphasic Ionic Liquid Aqueous System. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 58, p. 2260–2265, 2010.

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**, v. 82, n. 1, p. 103-110. 2003.

SILVER, S.; WENDT, L. Mechanism of action of phenethyl alcohol: breakdown of the cellular permeability barrier. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 93, n. 2, p. 560-566, 1967.

SOLOMONSON, L. P.; Cyanide as a metabolic inhibitor. In: Cyanide in Biology, VENNESLAND, B.; CONN, E. E.; KNOWLESS, C. J.; WESTLEY J.; WISSING, F. **Academic Press**, New York. 1981. p. 11-28.

SOMOGY, M. Determination of blood sugar. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, n. 160, p. 69-73, 1945.

SOUZA, L. S.; FIALHO, J. F. Cultivo da mandioca para a região do cerrado. **Embrapa Mandioca e Fruticultura**. Sistemas de produção, 8. 2003. Disponível em: http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mandioca/mandioca_cerrados/colheita.htm. Acesso em: 25 maio 2010.

SOUZA NETO, R.; PASTORE, G. M.; MACEDO, G. A. Biocatalysis and Biotransformation Producing γ -Decalactone. **Journal of Food Science**, Published on Web, Chicago, v. 69, n. 9, p. C677-680, 2004.

STARK, D.; MÜNCH, T.; SONNLEITNER, B.; MARISON, I. W.; VON STOCKAR, U. Extractive bioconversion of 2-phenylethanol from L-phenylalanine by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Progress**, Washington, v. 18, p. 514–523. 2002.

STARK, D.; ZALA, D.; MÜNCH, T.; SONNLEITNER, B.; MARISON, I. W.; VON STOCKCAR, U. Inhibition aspects of the bioconversion of L-phenylalanine to 2-phenylethanol by *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, Amsterdam, v. 32, p. 212–223, 2003.

TAHARA, S.; MIZUTANI, J. Gama-lactones produced by *Sporobolomyces odorus*. **Agricultural Biological Chemistry**, Tokyo, v. 39, n. 1, p. 281-282, 1975.

UENOJO, M. **Produção e caracterização de aromas de frutas por microrganismos pectinolíticos utilizando-se resíduos agroindustriais**. 2003. 134 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Isolamento e seleção de microrganismos pectinolíticos a partir de resíduos provenientes de agroindústrias para produção de aromas frutais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 509 - 515, 2006.

VOLLBRECHT, D.; RADLER, F. Die Bildung höherer Alkohole bei Aminosäuremangelmutanten von *Saccharomyces cerevisiae*. I. Der Abbau von Aminosäuren zu höheren Alkoholen. **Archives of Microbiology**, Berlim, v. 94, p. 351–358. 1973.

WELSH, F. W.; MURRAY, W. D.; WILLIAMS, R. E. Microbiological and enzymatic production of flavor and fragrance chemicals. **Critical Review Biotechnology**, Boca Raton, v. 9, p. 105-169, 1989.

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

WOSIACKI, G.; CEREDA, M. P. Valorização de resíduos do processamento de mandioca. **Publicatio UEPG. Exact and soil Sciences, Agrarian S. and Engineering**, Ponta Grossa, v. 8 n.1 p. 27-43, 2002.