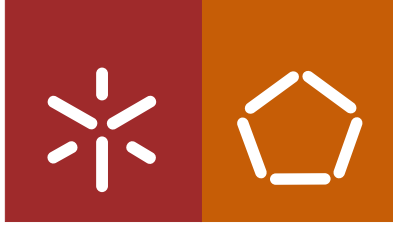


Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Ana Catarina Pereira Cordeiro

Seleção de estirpes de *Yarrowia lipolytica* com potencial para produzir álcoois aromáticos



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Ana Catarina Pereira Cordeiro

**Seleção de estirpes de *Yarrowia lipolytica* com
potencial para produzir álcoois aromáticos**

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Biotecnologia

Trabalho efetuado sob a orientação da
Doutora Adelaide Braga
e da
Professora Doutora Isabel Belo

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.

Licença concedida aos utilizadores deste trabalho



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

AGRADECIMENTOS

A dissertação de mestrado representa a etapa final deste longo percurso académico, como tal não poderia deixar de agradecer a todas as pessoas que me apoiaram e ajudaram permitindo que eu conseguisse chegar aqui.

Em primeiro lugar, gostava de agradecer às minhas orientadoras, Prof.^a Isabel Belo e à Doutora Adelaide Braga pela oportunidade de trabalhar neste tema, por todo o apoio, disponibilidade e paciência demonstrada, mas também por tudo o que me ensinaram ao longo deste ano.

A todas as pessoas do laboratório que me receberam de foram excelente e me acompanharam e ajudaram durante estes meses (Patrícia Ferreira, Helena Fernandes, Sílvia Miranda, Sílvia Fernandes, Sofia Pereira, Patrícia Dias, Joana Oliveira e Daniel Sousa).

À minha família, uma vez que sem eles nada disto seria possível. Obrigada por todo o apoio incondicional que me dedicaram todos estes anos apesar do meu mau humor ocasional e ausência constante.

Aos amigos de Bragança (Tiago, Telma, Carlos e Ana) que apesar da distância, estiveram sempre presentes principalmente nos momentos mais importantes

À Ana, que apesar de estar longe, esteve sempre presente e pronta a ajudar principalmente nos momentos menos bons. Obrigada por todo apoio nestes 5 anos, por todas as conversas, por todos os ensinamentos que me fizeram crescer enquanto pessoa e por todas as histórias que temos para contar.

À Inês e à Vera, por todas as aventuras noturnas e diurnas, por estarem sempre presentes com uma palavra de apoio. Obrigada por me darem um novo animo sempre que as coisas pareciam não correr bem e tornarem estes dois anos no melhor que podiam ter sido.

Aos meus colegas, António, Bruna, Sara, Joana, Mário, Gonçalo, Tiago, Miguel, Marta, Luís, Marlene e Pedro por pelo companheirismo não só nos momentos de descontração, mas também nos momentos de trabalho.

A todos os “pequenos” que tive o prazer de conhecer durante esta jornada que com pequenas coisas conquistaram o meu carinho e terão sempre um lugar especial na minha vida. (Francisco, Valéria, Sara, Joana, Marcela, Fábio)

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração. Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

SUMÁRIO - SELEÇÃO DE ESTIRPES DE *YARROWIA LIPOLYTICA* COM POTENCIAL PARA PRODUZIR ÁLCOOIS AROMÁTICOS

O 2-Feniletanol (2-Fe) é um álcool aromático com aroma de rosas cuja produção já foi reportada utilizando vários microrganismos, no entanto a *Yarrowia lipolytica*, apesar de apresentar características que a tornam interessante para a produção deste álcool, é ainda pouco explorada. Assim, o principal objetivo deste trabalho consiste em explorar o potencial da *Y. lipolytica* para a produção do 2-Fe por biotransformação da L-Fenilalanina (L-Fe), combinando a seleção de estirpes, a utilização de substratos alternativos, a otimização das condições de cultura, modo de operação e aplicação de técnicas de remoção de produto.

Para tal, foi inicialmente avaliado o efeito inibitório do 2-Fe no crescimento de duas estirpes de *Y. lipolytica*, W29 e CH1/5, tendo-se verificado que concentrações de 2-Fe iguais ou superiores a 2 g L⁻¹ inibem completamente o crescimento de ambas as estirpes. Posteriormente, foi demonstrado que ambas as estirpes foram capazes de produzir 2-Fe via *de novo* síntese, apesar das concentrações obtidas serem reduzidas. De seguida, a capacidade de produção de 2-Fe foi avaliada em matraz, com glucose como fonte de carbono tendo-se obtido cerca de 1 g L⁻¹ de 2-Fe em ambas as estirpes. Apesar não de terem sido obtidas diferenças significativas, a estirpe CH1/5 foi selecionada para os ensaios seguintes. Posteriormente, foi avaliado o efeito da concentração de L-Fe na produção do aroma, tendo-se verificado que este aumento não favoreceu a produção de 2-Fe (2 vs 0,5 g L⁻¹ com 4 e 6 g L⁻¹ de L-Fe, respetivamente). O glicerol bruto foi avaliado como fonte de carbono alternativa para a produção de 2-Fe, tendo sido obtidos resultados semelhantes aos obtidos com glucose. Foi ainda testada uma estratégia de produção com remoção do produto por adsorção. A adição de 7 % (p/v húmido) da resina XAD-4-HP ao meio permitiu aumentar em 1,3 vezes o rendimento de 2-Fe quando comparada com os ensaios sem remoção de produto. A produção de 2-Fe pela estirpe CH 1/5 foi também estudada em biorreator, tendo sido avaliada a influência da taxa de transferência de oxigénio e do pH na sua produção. Observou-se que as concentrações de 2-Fe obtidas, para a gama de taxas de transferência de oxigénio estudadas, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, no entanto a acidificação do meio (pH 5,5) permitiu aumentar a produção de 2-Fe (0,31 g L⁻¹). O modo de operação semi-contínuo com alimentação por pulsos de L-Fe permitiu aumentar a produção de 2-Fe tendo-se obtido uma concentração final de 2,65 g L⁻¹.

Palavras Chave: 2-Feniletanol, Biotransformação, L-Fenilalanina, *Yarrowia lipolytica*

ABSTRACT - SELECTION OF *YARROWIA LIPOLYTICA* STRAINS WITH POTENTIAL FOR AROMATIC ALCOHOLS PRODUCTION

The 2-Phenylethanol (2-PE) is an aromatic alcohol with a delicate fragrance of rose petals. Although there are many works in the literature about 2-PE production by several yeasts' strains, the yeast *Yarrowia lipolytica* was poorly explored in this field, despite appearing to be a competitive producer. Thus, the main objective of this work is to explore the potential of *Y. lipolytica* for 2-PE production by L-phenylalanine (L-Phe) bioconversion, combining strain selection, the use of alternative substrates, optimization of culture conditions, mode of operation and application of product removal techniques.

Initially, it was studied the inhibitory effect of 2-PE on *Y. lipolytica* growth, and it was observed that all strains were inhibited by 2-PE concentrations equal or above 2 g L⁻¹. It was confirmed that all strains were able to produce 2-PE by *de novo* synthesis. Thereafter, the ability of both strains to produce 2-PE was assessed at shake flask-scale, with glucose as the carbon source, and a 2-PE concentration of 1 g L⁻¹ was attained for both strains. Although no significant differences were observed between both strains, the strain CH1/5 was selected for the further experiments. Afterwards, it was studied the effect of L-Phe concentration in 2-PE production, and it was observed that increasing L-Phe concentrations decreases the aroma production (2 vs 0,54 g L⁻¹ with 4 and 6 g L⁻¹ of L-Phe, respectively). Crude glycerol was tested as an alternative carbon source for 2-PE production, and when compared with results attained with glucose, a similar 2-PE titer was obtained with this carbon source. It was also tested a bioconversion strategy coupled with product removal by adsorption using XAD-4-HP. The addition of 7 % (wet w/v) resin to the bioconversion system allowed a 1,3-fold increase in the 2-PE yield compared to the bioconversion without addition of the adsorbent resin. The influence of oxygen transfer rate and pH on 2-PE production with CH 1/5 strain was also studied at bioreactor scale. It was observed that the production of 2-Fe is not affect by the oxygen transfer rates, for the range of conditions studied, whereas a more acidic environment (pH 5,5) allow a high 2-PE titer. A stepwise fed-batch cultures improved the 2-Fe production allowing a maximum production of 2,65 g L⁻¹.

Keywords: 2-phenylethanol, biotransformation, L-phenylalanine, *Yarrowia lipolytica*

ÍNDICE

Direitos de autor e condições de utilização do trabalho por terceiros	II
Agradecimentos	III
Declaração de integridade	IV
Sumário - Seleção de estirpes de <i>Yarrowia lipolytica</i> com potencial para produzir álcoois aromáticos	V
Lista de Abreviaturas	IX
Índice de Figuras.....	XI
Índice de tabelas	XIII
1. Introdução	15
1.1. Aromas.....	15
1.1.1. Álcoois Aromáticos.....	17
1.2. <i>Yarrowia lipolytica</i>	21
1.2.1. Produção de 2-Feniletanol por <i>Yarrowia lipolytica</i>	22
1.3. Estratégias de Otimização da Produção de 2-Feniletanol.....	23
1.4. Técnicas de Remoção de Produto	27
2. Materiais e métodos	31
2.1. Microrganismos	31
2.2. Conservação das estirpes	31
2.3. Preparação dos inóculos	31
2.4. Efeito inibitório do 2-Feniletanol.....	32
2.5. Produção de 2-Feniletanol via <i>de novo</i> síntese.....	32
2.6. Ensaio de biotransformação em matraz.....	33
2.7. Ensaio de biotransformação em biorreator.....	33
2.7.1. Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigénio	34
2.8. Ensaio com remoção <i>in situ</i> de produto.....	35

2.8.1.	Ensaios de biotransformação com remoção <i>in situ</i> de produto.....	35
2.8.2.	Dessorção do 2-Feniletanol das resinas e reutilização das mesmas.....	35
2.9.	Métodos analíticos	36
3.	Resultados.....	38
3.1.	Ensaios de Toxicidade.....	38
3.2.	Produção de 2-Fe pela Via <i>de Novo</i> Síntese	39
3.3.	Ensaios de Biotransformação em Matraz.....	41
3.3.1.	Ensaios de Biotransformação com remoção <i>in situ</i> de produto.....	46
3.4.	Ensaios de Biotransformação em Biorreator	48
3.4.1.	Efeito do arejamento.....	49
3.4.2.	Efeito do pH.....	53
3.4.3.	Ensaios de Biotransformação em modo semi-contínuo	56
4.	Conclusões.....	62
5.	Perspetivas futuras	64
6.	Referências	65
	Anexos.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS

2-Fe – 2-Feniletanol

$A_{600\text{ nm}}$ – absorvância lida a 600 nm

B – ordenada na origem da reta

C – concentração, em g L^{-1}

DO – densidade Ótica

DAHP – 3-desoxi-D-aranino-heptulosonato-7-fosfato

FDA – do inglês *Food and Drug Administration*

GC-MS – do inglês *gas chromatography-mass spectrometry*

GRAS – do inglês *Generally Recognized as Safe*

HPLC – do inglês *high performance liquid chromatography*

H_2SO_4 – ácido sulfúrico

KH_2PO_4 – fosfato monopotássico

UHPLC – do inglês *Ultra-high performance liquid chromatography*

IL – líquidos iônicos

ISPR – do inglês *in situ product removal*

k_{La} – coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio

L-Fe – L-Fenilalanina

m – declive da reta

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – sulfato de magnésio heptahidratado

NaCl – cloreto de sódio

Na_2SO_4 – sulfato de sódio

$\text{NH}_4(\text{SO}_4)$ – sulfato de amônio

POMS – Polioctilmetilsiloxano

ppm – partes por milhão

rpm – rotações por minuto

S_m – erro padrão associado ao declive

S_o – o erro padrão associado à ordenada na origem

YPD – Extrato de levedura, peptona e glucose

YPDA – Extrato de levedura, peptona, glucose e agar

YPG – Extrato de levedura, peptona e glicerol

YNB – do inglês *Yeast Nitrogen Base*

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Aromas produzidas por leveduras através da síntese de novo ou biotransformação (adaptado [22])	17
Figura 2. Produção de 2-Fe por leveduras através da síntese de novo ou biotransformação (adaptado [22])	20
Figura 3. Células de <i>Y. lipolytica</i> CH1/5 cultivadas em biorreator de tanque agitado, 57 horas após o início do ensaio (ampliação microscópica de 40x).	21
Figura 4. Reator RALF PLUS SOLO com meio de biotransformação.....	33
Figura 5. Efeito de inibição de 2-Fe para estirpes de <i>Y. lipolytica</i> W29 e CH1/5 (representadas a preto e cinzento, respetivamente) após crescimento em meio líquido com diferentes concentrações de 2-Fe (1, 2 e 3 g L ⁻¹) durante 48 horas a 27 °C. Os valores apresentados representam a média de 2 ensaios independentes e as barras de erro representam o desvio padrão entre estes ensaios.	38
Figura 6. Análise por GC-MS indicando a presença de 2-Fe no meio de cultura da <i>Y. lipolytica</i> CH1/5 (A) e W29 (B) utilizando glucose como fonte de carbono sem L-Fe.	40
Figura 7. Crescimento celular (□), consumo de glucose (○) (A), consumo de L-Fe (○) e produção de 2-Fe (□) (B) por diferentes estirpes de <i>Y. lipolytica</i> , W29 (cinzento), e CH1/5, (preto) em matraz com 40 g L ⁻¹ de glucose, suplementado com 4 g L ⁻¹ de L-Fe. Os valores apresentados representam a média de 2 ensaios independentes ± desvio padrão.....	42
Figura 8. Crescimento celular (□), consumo de glicerol bruto (○) (A), consumo de L-Fe (○) e produção de 2-Fe (□) (B) por <i>Y. lipolytica</i> CH1/5 com diferentes concentrações iniciais de L-Fe, 6 g L ⁻¹ (preto) e 4 g L ⁻¹ , (cinzento). Os valores apresentados representam a média de 2 ensaios independentes ± o desvio padrão.....	44
Figura 9. Crescimento celular (□), consumo de glicerol bruto (○) (A), consumo de L-Fe (○) e produção de 2-Fe (□) (B) por <i>Y. lipolytica</i> CH1/5 em matraz com uma concentração inicial de L-Fe, 4 g L ⁻¹ com remoção do produto com recurso a utilização da resina XAD4-HP. Os valores apresentados representam a média de 2 ensaios independentes ± desvio padrão.....	46
Figura 10. Crescimento celular (□), consumo de glicerol bruto (○) (A), consumo de L-Fe (○) e produção de 2-Fe (□) (B) por <i>Y. lipolytica</i> CH1/5 em biorreator com uma concentração inicial de L-Fe, 5 g L ⁻¹ , para os ensaios a 600 rpm e 1 L min ⁻¹ (preto), 600 rpm e 3 L min ⁻¹ de ar (cinzento) e 900 rpm e 3 L min ⁻¹ de ar (cinzento claro). Os valores apresentados representam a média de 2 ensaios independentes ± desvio padrão.....	50

Figura 11. Morfologia de *Yarrowia lipolytica* CH1/5 durante ensaios de biotransformação de L-Fe em biorreator com uma velocidade de agitação e caudal de ar de 600 rpm e 1 L min⁻¹ (A), 600 rpm e 3 L min⁻¹ de ar (B) e 900 rpm e 3 L min⁻¹ de ar (C). 52

Figura 12. Crescimento celular (□), consumo de glicerol bruto (○) (A), consumo de L-Fe (○) e produção de 2-Fe (□) (B) por *Y. lipolytica* CH1/5 em biorreator com 45 g L⁻¹ de glicerol bruto, suplementado com 4 g L⁻¹ de L-Fe,, fazendo-se variar o pH do meio, tendo sido testados valores de 5,5 (preto), 6,5 (cinzento), e 7,5 (cinzento claro). Os valores apresentados para a condição de pH 5,5 representam a média de 2 ensaios independentes ± desvio padrão..... 53

Figura 13. Crescimento celular (□), consumo de glicerol bruto (○) (A), consumo de L-Fe (○) e produção de 2-Fe (□) (B) por *Y. lipolytica* CH1/5 em biorreator com 45 g L⁻¹ de glicerol bruto, uma concentração inicial de L-Fe, 4 g L⁻¹, tendo sido utilizada uma agitação de 600 rpm e 1 L min⁻¹ sem controlo de pH..... 55

Figura 14. Crescimento celular (□), consumo de glicerol bruto (○) (A), consumo de L-Fe (○) e produção de 2-Fe (□) (B) por *Y. lipolytica* CH1/5 em biorreator com uma concentração inicial de L-Fe, 4 g L⁻¹, tendo sido dado um pulso de 4 g L⁻¹ de L-Fe, 24 horas (a cinzento) e 81 horas (a preto) após o início do ensaio. As setas representam o momento da adição do pulso de L-Fe. 56

Figura 15. Crescimento celular (□), consumo de glicerol bruto (○) (A), consumo de L-Fe (○) e produção de 2-Fe (□) (B) por *Y. lipolytica* CH1/5 em biorreator com uma concentração inicial de L-Fe, 12 g L⁻¹. 59

Figura 16. Crescimento celular (□), consumo de glicerol bruto (○) (A), consumo de L-Fe (□) e produção de 2-Fe (○) (B) por *Y. lipolytica* CH1/5 em biorreator com uma concentração inicial de L-Fe, 8 g L⁻¹, tendo sido dado um pulso de 8 g L⁻¹ (a cinzento) e 4 g L⁻¹ (a preto) de L-Fe, 81 horas após o início do ensaio. As setas representam o momento da adição do pulso de L-Fe. 60

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Resumo dos microrganismos já reportados para a produção de 2-Fe com diferentes substratos e concentrações de L-Fe.	19
Tabela 2. Resumo das técnicas de extração in situ utilizadas na produção de 2-Fe.....	30
Tabela 3. Concentração de 2-Fe, rendimento e produtividade ao fim de 168 horas de ensaio em matraz por diferentes estirpes de <i>Y. lipolytica</i> , CH1/5 e W29. Os valores apresentados representam a média de 2 ensaios independentes. Valores seguidos da mesma letra não representam diferenças estatisticamente significativas entre eles ($p \leq 0,05$) por análise de t-test.	43
Tabela 4. Concentração de 2-Fe, rendimento e produtividade ao fim de 216 horas de ensaio em matraz por <i>Y. lipolytica</i> , CH1/5 utilizando diferentes fontes de carbono, glucose e glicerol e diferentes concentrações de L-Fe, 4 e 6 g L ⁻¹ . Os valores apresentados representam a média de 2 ensaios independentes $\pm$ desvio padrão. Valores seguidos da mesma letra não representam diferenças estatisticamente significativas entre eles ($p \leq 0,05$) por análise de t-test. Letras maiúsculas representam a análise entre as diferentes concentrações de L-Fe e letras minúsculas representam a análise entre diferentes fontes de carbono.	45
Tabela 5. Concentrações de 2-Fe extracelulares, na resina e totais, rendimento e produtividade para os ensaios com remoção de produto. Os valores apresentados representam a média de 2 ensaios independentes $\pm$ desvio padrão.	47
Tabela 6. Valores de k_{La} experimentais determinados para diferentes condições de agitação (600 e 900 rpm) e caudal de ar (1 e 3 L min ⁻¹). Os valores apresentados representam a média de 2 ensaios independentes $\pm$ desvio padrão. Valores seguidos da mesma letra não representam diferenças estatisticamente significativas entre eles ($p \leq 0,05$) por análise de t-test.	49
Tabela 7. Concentração de 2-Fe, rendimento e produtividade ao fim de 81 horas de ensaio em reator por <i>Y. lipolytica</i> , CH1/5 utilizando diferentes condições de agitação e caudal de ar, 600 rpm e 1 L min ⁻¹ , 600 rpm e 3 L min ⁻¹ e 900 rpm e 3 L min ⁻¹ . Os valores apresentados representam a média de 2 ensaios independentes. Valores seguidos da mesma letra não representam diferenças estatisticamente significativas entre eles ($p \leq 0,05$) por análise de t-test.	51
Tabela 8. Concentração de 2-Fe, rendimento e produtividade ao fim de 81 horas de ensaio em reator por <i>Y. lipolytica</i> , CH1/5 utilizando diferentes condições pH, 5,5, 6,5 e 7,5. Os valores apresentados para a condição de pH 5,5 representam a média de 2 ensaios independentes $\pm$ desvio padrão.	54

Tabela 9. Concentração de biomassa, concentração de 2-Fe, rendimento e produtividade ao fim de 216 horas de ensaio em reator e matraz por *Y. lipolytica*, CH1/5. Em reator, foi utilizada uma agitação de 600 rpm e 1 L min⁻¹ sem controlo de pH. Os valores apresentados para o ensaio em matraz representam a média de 2 ensaios independentes $\pm$ desvio padrão..... 55

Tabela 10. Concentração de 2-Fe, rendimento e produtividade nos ensaios de biotransformação por *Y. lipolytica* CH1/5 com a adição de um pulso de 4 g L⁻¹ de L-Fe ao fim de 24 e 81 horas de ensaio..... 57

Tabela 11. Concentração de 2-Fe, rendimento e produtividade obtidos ao fim de 249 horas no ensaio de biotransformação por *Y. lipolytica* CH1/5 com uma concentração inicial de L-Fe de 8 g L⁻¹ com a adição de um pulso de 8 e 4 g L⁻¹ de L-Fe..... 61

Tabela A 1. Reta de calibração da biomassa para a estirpe de *Y. lipolytica* CH1/5..... 74

Tabela A 2. Reta de calibração para a glucose e glicerol 75

1. INTRODUÇÃO

1.1. AROMAS

O aroma é o resultado da presença de compostos voláteis e não voláteis, que possuem propriedades químicas e físicas diversas [1], e que são apreciados essencialmente pelo cheiro, mas também pelo sabor [2]. Enquanto os compostos não voláteis contribuem essencialmente para o sabor, os voláteis influenciam tanto o sabor como o aroma proporcionando uma junção destas duas sensações [3]. Os compostos com propriedades aromatizantes representam uma grande variedade de grupos químicos que incluem cetonas, aldeídos, álcoois, ácidos carboxílicos, ésteres, lactonas e terpenóides [4].

Os aromas e as fragrâncias têm elevada importância na indústria alimentar [5] uma vez que, com o processamento dos alimentos, estes têm tendência para perder as suas características organoléticas [6]. Além deste setor de mercado, os aromas e as fragrâncias também desempenham um papel crucial em indústrias como a cosmética, perfumes, farmacêutica e química [7]. Assim, estes compostos representam mais de um quarto do mercado mundial de aditivos alimentares [8], sendo que a revista especializada *Perfumer & Flavorist* reportou que o mercado das fragrâncias poderá atingir cerca de US \$ 70000 milhões em 2022 [9].

Quimicamente, os aromas são compostos com estruturas únicas e grupos funcionais que permitem uma grande variedade de odores podendo ser obtidos, maioritariamente, através da extração a partir de plantas ou animais ou por síntese química [10]. No entanto, os processos de extração aplicados apresentam uma baixa produtividade, o que faz com que a purificação seja mais difícil, tornando o processo mais caro [1], [11], [12]. Além disso, as variações sazonais, as doenças, e as pragas que podem atacar as plantas, levam a um défice constante da oferta destes aromas obtidos através de fontes naturais [1]. Assim, tendo em conta estas limitações, a maioria dos aromas e fragrâncias utilizados hoje em dia são produzidos por síntese química [11], [13], [14]. Contudo, esta requer condições adversas (catalisadores tóxicos, altas pressões e temperaturas, entre outros) e não apresenta seletividade para o substrato o que resulta numa mistura de produtos. Além disso, os compostos produzidos são denominados de artificiais diminuindo o seu valor no mercado [15], [16].

O aumento do interesse em produtos naturais por parte do consumidor, a adaptação a um estilo de vida mais saudável e a restrição ao uso de alguns aromas sintetizados quimicamente na alimentação, bebidas e cosméticos (segundo legislações Europeias e dos Estados Unidos da América),

impulsionou o desenvolvimento de processos de produção alternativos e amigos do ambiente [17]. Nos Estados Unidos e de acordo com a regulação Europeia (como a CFR 1990 e EEC 1334/2008), os compostos isolados a partir de fontes naturais ou obtidos através de processos que utilizam microrganismos ou enzimas envolvendo precursores isolados da natureza são classificados como naturais.

Os aromas produzidos por via biotecnológica requerem a utilização de microrganismos para a sua biotransformação ou produção pela via *de novo* síntese [16]. Na síntese *de novo* são usados substratos simples (tais como açúcares, aminoácidos, minerais, entre outros) que darão origem ao composto de interesse através de um conjunto vias metabólicas complexas [14]. Já a biotransformação consiste numa ou num conjunto de reações catalisadas por determinadas enzimas (enzimas puras ou dentro de células) que darão origem a um composto estruturalmente similar ao substrato usado, no entanto o produto resultante terá as propriedades de interesse como determinadas fragrâncias ou sabores [18]. A produção de aromas por via biotecnológica apresenta-se assim como uma alternativa económica e ecológica para a produção destes compostos. Além disso também é evitada a produção de misturas racémicas e o uso de compostos prejudiciais ao ambiente como acontece na síntese química [1]. Geralmente, o preço de mercado do composto obtido por via biotecnológica será mais elevado que o análogo produzido por métodos químicos, mas mais reduzido que o produto obtido por extração de fontes naturais [19]. Alguns compostos com propriedades aromáticas já são produzidos por via biotecnológica utilizando leveduras como é o caso da γ -decalactona, do acetato de 2-feniletilo, do acetato de etilo, do geraniol, limoneno, vanilina ou álcoois como o 2-Feniletanol [1] (Figura 1). No entanto, apesar das concentrações obtidas serem ainda reduzidas, em alguns casos o processo já é economicamente viável [20]. No Reino Unido, é feita a produção de ácido δ -dodecanoico à escala industrial usando *Saccharomyces cerevisiae* num biorreator de 30000 litros sendo o ácido 5-cetododecanoico o substrato utilizado. A lactona resultante é posteriormente utilizada para conferir sabor a manteiga nas margarinas [21].

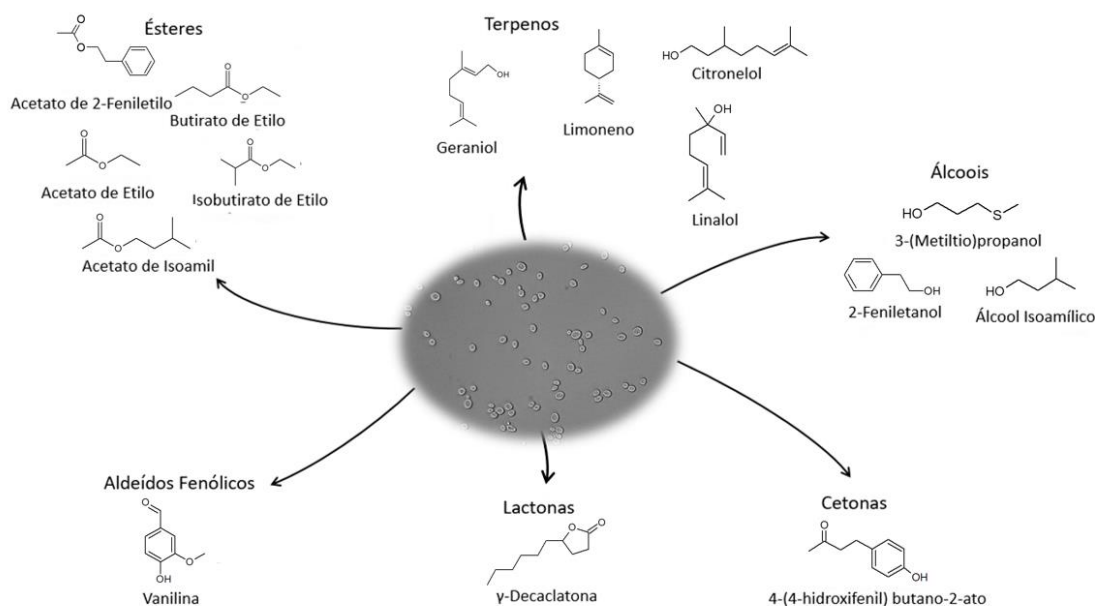


Figura 1. Aromas produzidas por leveduras através da síntese *de novo* ou biotransformação (adaptado [22])

1.1.1. ÁLCOOIS AROMÁTICOS

Muitos microrganismos sintetizam compostos com características organoléticas como metabolitos secundários resultantes da biotransformação de determinados substratos, como é o caso dos álcoois aromáticos. Estes compostos são obtidos em baixas concentrações como resultado da atuação de microrganismos em alimentos ou bebidas contribuindo para o sabor destes produtos. Tendo em conta a capacidade demonstrada por vários microrganismos em produzirem compostos com características organoléticas, tornou-se interessante estudar este processo de forma a otimizar a produção destes compostos. Os álcoois que demonstram ter mais interesse industrial são o álcool isoamílico (aroma de banana) e o 2-feniletanol (aroma de rosas). Estes aromas podem ser naturalmente produzidos por microrganismos pela via Ehrlich a partir de aminoácidos [23].

Apesar das leveduras terem a capacidade de produzir álcoois aromáticos a partir do catabolismo dos aminoácidos é necessário avaliar as limitações deste processo. Um dos fatores limitantes na produção destes álcoois é a inibição do crescimento celular, uma vez que os álcoois aromáticos provocam o aumento da fluidez da membrana permitindo a saída de iões e uma redução da entrada de aminoácidos e de glucose [24],[25].

Tendo em conta o interesse industrial destes álcoois torna-se importante estudar a sua produção de forma a ultrapassar as limitações associadas a este processo permitindo a obtenção de concentrações mais elevadas.

O álcool aromático mais relevante a nível industrial é o 2-Feniletanol (2-Fe) [26]. Este composto apresenta uma fragrância delicada a rosas a partir dos 20 ppm, sendo amplamente utilizado na indústria de perfumes e cosméticos, farmacêutica e na indústria alimentar e de bebidas [27], [28]. Para além disso, o 2-Fe pode também ser utilizado como matéria-prima para produzir outros aromas importantes, especialmente o fenilacetato (um éster aromático com elevado valor [29], [30] e potencial molécula combustível [31]), o fenilacetaldeído (aroma) e o hidroxifeniletanol (usado nas indústrias farmacêuticas e da química fina) [30]. O 2-Fe pode também ser utilizado como precursor na produção de biopolímeros com propriedades aromáticas, como o precursor do octano, etil ciclohexano [32].

Este álcool superior é encontrado nos óleos essenciais de várias flores e plantas, como narcisos, jacintos, *Borboun geranium*, pinheiro-de-alepo, jasmims ou lírios, mas apenas 1 - 5% de 2-Fe está presente nos seus óleos essenciais [2], [27]. Os óleos essenciais das rosas são uma exceção a estas baixas concentrações: mais de 60% (v/v) de 2-Fe pode ser obtido pelos rebentos florais das rosas (*Rosa centifolia*) [2], [29]. No entanto, a maioria do 2-Fe usado nos dias de hoje é sintetizado quimicamente a partir de benzeno e estireno [14], [33].

O 2-Fe é um aroma com uma elevada importância económica. De acordo com a informação atualmente disponível, a produção global de 2-Fe é estimada em aproximadamente 10 000 toneladas por ano, sendo a sua produção dominada pela síntese química [11], [13]. As informações disponíveis sobre a sua produção por via natural são escassas, no entanto, em 2002 foi estimado que o seu mercado seria cerca de 0,5 toneladas [29], [34]. O 2-Fe extraído de plantas ou produzido por via biotecnológica atinge os US \$ 1000/kg no mercado enquanto que o análogo sintético apenas chega aos US \$ 5/kg [11]. Considerando as desvantagens da síntese química e as limitações da extração a partir de fontes naturais para a produção à escala industrial destes compostos, tornou-se importante encontrar uma alternativa mais económica e ecológica para a sua produção. [35].

Apesar da produção biotecnológica apresentar diversas vantagens, apresenta também alguns problemas como a inibição pelo produto [27], ou o efeito inibitório sinérgico causado pela formação de etanol [24]. Contudo, as leveduras são os microrganismos mais promissores para a produção de 2-Fe uma vez que apresentam uma elevada atividade catalítica, robustez, além da resistência ao produto inibitório. No que diz respeito aos efeitos inibitórios da biossíntese deste álcool, as leveduras Crabtree

negativas são preferíveis, uma vez não produzem etanol em condições aeróbias [14]. Nestes microrganismos, a produção de álcoois, como o 2-Fe, está relacionada com o catabolismo dos aminoácidos, nomeadamente com as vias do chiquimato, Ehrlich e cinamato, podendo ainda ser sintetizado pela via *de novo* síntese onde a fonte de carbono é utilizada como precursor [36].

Existem vários microrganismos descritos na literatura com potencial para a produção de 2-Fe (Tabela 1), tendo sido já reportada a produção por *S. cerevisiae* [31], [37], [38], *Kluyveromyces marxianus* [14], [33], *Aspergillus oryzae* [39], *Pichia fermentans* [40] e também *Yarrowia lipolytica* [14], onde foram obtidas concentrações entre 0,4 g L⁻¹ a 5 g L⁻¹. No entanto, a produção pode ser melhorada através da escolha do modo de operação mais adequado ou com aplicação de técnicas de remoção de produto podendo ser atingidas concentrações até 20,4 g L⁻¹ [38], [31]

Tabela 1. Resumo dos microrganismos já reportados para a produção de 2-Fe com diferentes substratos e concentrações de L-Fe.

Estirpe	Fonte de Carbono	L-Fenilalanina (g L ⁻¹)	2-Feniletanol (g L ⁻¹)	Ref
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Glucose e Sacarose	4	3,65	[41]
	Melaço de beterraba	7	4,0	[42]
	Soro de Queijo	5	2,71	[43]
<i>Pichia fermentans</i>	Glucose e Sacarose	5	1,62	[43]
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Glucose e Sacarose	5	2,3	[43]
	Glucose	0	1,0	[43]
<i>Pichia kudriavzevii</i>	Glucose e Sacarose	5	2,71	[43]
<i>Candida glycerinogenes</i>	Glucose	7	5,0	[44]
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Glucose	7	1,98	[45]
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Soro de Queijo	0	0,96	[46]

O 2-Fe e outros álcoois são produzidos naturalmente pelos microrganismos como parte do catabolismo dos aminoácidos. Nas leveduras, a síntese de 2-Fe está relacionada com as vias do chiquimato, Ehrlich e cinamato (Figura 2) [22], [29], [47], [48]. O 2-Fe pode ser obtido a partir da via do chiquimato, via *de novo* síntese a partir da glucose [22], [29], [47] e pela via de Ehrlich, a partir da biotransformação da L-Fenilalanina (L-Fe) [22], [29], [47]. A via do cinamato é apenas uma via de degradação da L-Fe, que não leva à produção de 2-Fe [14], no entanto, a glucose inibe a enzima que catalisa a primeira reação desta via [14], [49].

Na biotransformação de L-Fe pela via de Ehrlich, este aminoácido sofre uma transaminação que origina fenilpiruvato, que vai ser posteriormente descarboxilado produzindo o fenilacetaldeído, que por último vai ser reduzido a 2-Fe (Figura 2). A abordagem biotecnológica mais simples e mais utilizada para obtenção de 2-Fe é através da biotransformação da L-Fe (como única fonte de azoto) pela via de Ehrlich, no entanto, seria desejável a utilização de um substrato mais acessível que este aminoácido, de forma a tornar o processo economicamente viável [37], [50]. Para além da produção de 2-Fe, a via de Ehrlich pode também originar o 2-Feniletíl acetato, um composto aromático de elevada importância, através da esterificação do 2-Fe [31].

Na via *de novo* síntese, este álcool pode ser produzido através da via do chiquimato a partir da glucose (Figura 3). Nesta via, os intermediários da glicólise e da via das pentoses-fosfato são combinados e convertidos em 3-desoxi-D-aranino-heptulose-7-fosfato (DAHP) que é convertido a corismato. Por sua vez, este composto será descarboxilado a fenilacetaldeído, e, posteriormente desidrogenado em 2-Fe [36], [51]. No entanto, a via *de novo* síntese, para além de ineficiente, não é economicamente viável nem aplicável para um bioprocessamento à escala industrial, uma vez que a glicólise e a via das pentoses-fosfato são usadas pelos microrganismos preferencialmente para o crescimento celular, produzindo assim quantidades muito baixas de 2-Fe [22], [29].

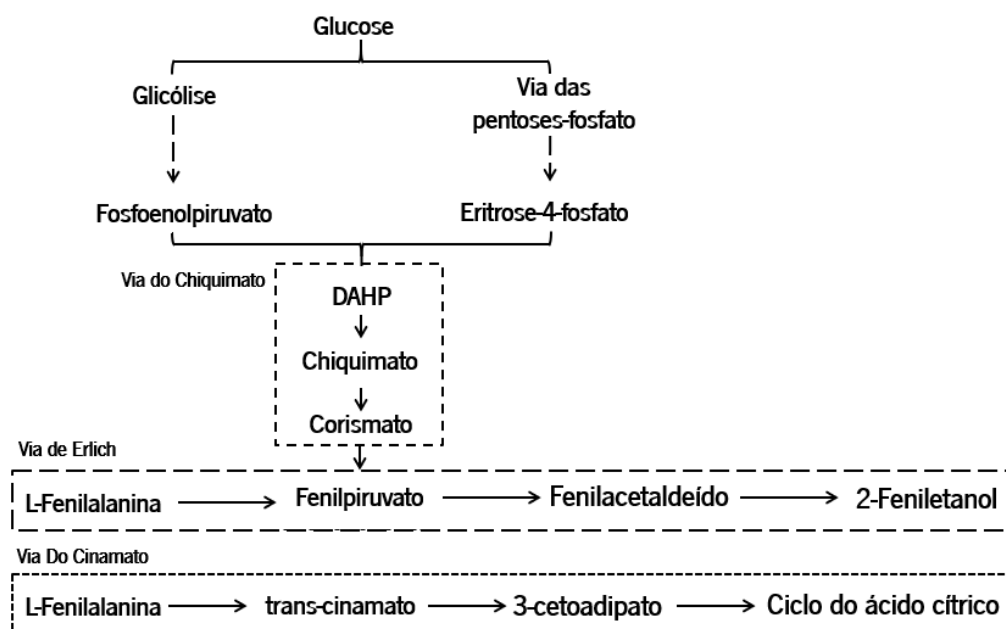


Figura 2. Produção de 2-Fe por leveduras através da síntese *de novo* ou biotransformação (adaptado [22])

1.2. *YARROWIA LIPOLYTICA*

A levedura *Yarrowia lipolytica* é um microrganismo pertencente à classe dos Ascomicetes, subclasse Hemiascomicetes, sendo uma das leveduras não convencionais mais estudadas. Esta classificação foi inicialmente utilizada para diferenciar este grupo de leveduras das mais frequentemente utilizadas, as “convencionais”, e bem estudadas, *S. cerevisiae* e, com algumas restrições, *Schizosaccharomyces pombe* [52]. Esta levedura aeróbia tem uma temperatura ótima de crescimento de 30°C e o pH ótimo que varia entre os 5 e 7. Além disso, é não patogênica e classificada como segura (GRAS do inglês *Generally Recognized as Safe*) pela *Food and Drug Administration* (FDA) [53], [54]. Esta levedura exibe dimorfismo, ou seja, é capaz de alternar, reversivelmente, entre duas formas morfológicas distintas: células típicas de levedura (ovais) ou hifa (Figura 3) [45], [55], [56].

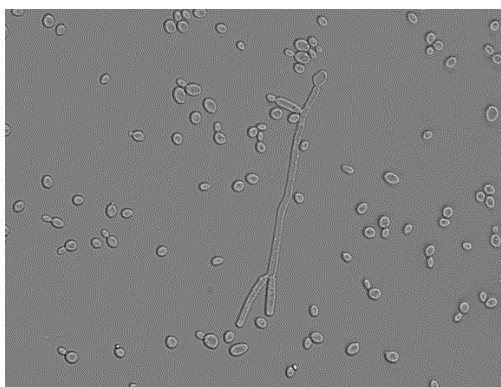


Figura 3. Células de *Y. lipolytica* CH1/5 cultivadas em biorreator de tanque agitado, 57 horas após o início do ensaio (ampliação microscópica de 40x).

Na natureza, *Y. lipolytica* pode ser encontrada em produtos lácteos, como queijo e iogurtes, mas também em salsichas, kefir, shoyu e saladas contendo carne ou camarão [57], [58]. Algumas estirpes de *Y. lipolytica* também foram isoladas a partir de meios ricos em lipídios, como solo, esgoto ou ambientes poluídos por óleos e também de ambientes hipersalinos, indicando o seu metabolismo versátil e capacidade de sobreviver sob condições extremas [59]. Esta levedura é capaz de utilizar como fontes de carbono a glucose, álcoois, acetato e substratos hidrofóbicos, como ácidos gordos, e biotransformá-los em diferentes produtos de valor acrescentado [60], [61].

Esta levedura tem sido usada em muitas aplicações relacionadas com a indústria alimentar, como para a produção de aromas, como o 2-Fe a síntese de ácidos orgânicos (cítrico, isocítrico, α -cetoglutarico, pirúvico e succínico), produção de poliálcoois para substituição de sacarose (como o manitol e o eritritol), produção de emulsionantes e surfactantes e produção de óleos e proteínas para

alimentos [55], [62], [63]. Esta levedura, tem ainda a capacidade de produzir e excretar proteínas, nomeadamente enzimas como proteases alcalinas, proteases extracelulares, RNases, fosfatases, vários tipos de lipases e esterases [64]. Também tem sido aplicada no tratamento e degradação de poluentes como hidrocarbonetos, óleos, compostos nitro e halogenados, para a redução de metais e para o tratamento de águas residuais [65]. Além destas aplicações, também tem sido utilizada na produção de lipídios e compostos derivados de lípidos como biodiesel, óleos comestíveis ou ácidos dicarboxílicos devido à sua atividade lipolítica e proteolítica extracelulares [66], [67].

1.2.1. PRODUÇÃO DE 2-FENILETANOL POR *YARROWIA LIPOLYTICA*

Tal como já foi referido anteriormente, *Y. lipolytica* tem a capacidade de produzir 2-Fe, no entanto este microrganismo tem sido pouco explorado no que diz respeito à produção deste álcool superior, mesmo tendo em conta as características que a tornam atrativa para a sua produção, como o facto de ser Crabtree negativa, não produzindo etanol durante o crescimento em glucose, ou ser capaz de consumir vários substratos como fonte de carbono [68].

A capacidade desta levedura produzir 2-Fe foi reportada pela primeira vez por Celińska *et al* [45]. Neste estudo, foi avaliada a capacidade de diferentes estirpes de *Y. lipolytica* produzirem 2-Fe. Para tal, seis estirpes desta levedura foram cultivadas em meio sem L-Fe, de forma a determinar quais as estirpes com maior capacidade intrínseca para a produção deste composto. Após identificada a estirpe com maior potencial produtor, NCYC 3825, esta foi posteriormente utilizada em ensaios de biotransformação em matraz e biorreator, utilizando como fonte de carbono a glucose e o glicerol, obtendo uma produção de 2-Fe de 1,98 g L⁻¹ e 0,77 g L⁻¹, respetivamente [45]. Apesar destes resultados, o rendimento obtido, 0,31 (2-Fe L-Fe⁻¹), foi inferior ao rendimento teórico máximo, 0,75 (2-Fe L-Fe⁻¹) [14]. No entanto, comparando as concentrações de 2-Fe obtidas com *Y. lipolytica* com dados na literatura é possível verificar o potencial desta levedura para a produção deste álcool aromático [14], [45], [69].

1.3. ESTRATÉGIAS DE OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE 2-FENILETANOL

Já foram desenvolvidas diversas estratégias para aumentar a concentração de 2-Fe, a produtividade e o rendimento dos processos de produção deste álcool superior por via biotecnológica. Estas estratégias passam pela seleção de estirpes, manipulação genética ou mutagenese, otimização da composição do meio e das condições de cultura, do tipo de reator e do modo de operação utilizado.

No que diz respeito ao efeito da composição do meio de cultura, Huang *et al.* [40] estudou a influência da utilização de diferentes fontes de carbono como a glucose, frutose, galactose, xilose, sacarose, maltose, lactose, amido solúvel, sorbitol, glicerol e etanol e das suas concentrações na produção de 2-Fe por *P. fermentans* L-5. Neste estudo foi verificado que as fontes de carbono mais adequadas são o glicerol e a sacarose, e de forma a avaliar a influência da concentração da fonte de carbono no meio, foi testada a produção de 2-Fe utilizando diferentes concentrações de sacarose no meio. Neste caso, observou-se que a produção máxima de 2-Fe foi obtida com uma concentração de fonte de carbono de 18%. Verificou-se ainda que com o aumento da concentração da fonte de carbono observa-se uma diminuição da produção de 2-Fe. Esta diminuição foi provocada pelo aumento da pressão osmótica que leva à inibição das enzimas envolvidas na produção de 2-Fe. Foi ainda estudado o efeito da concentração de extrato de levedura na produção de 2-Fe, neste caso o autor concluiu que a produção máxima de 2-Fe é atingida com 0,25% de extrato de levedura no meio. Relativamente à concentração de L-Fe, foi observado que adição de 0,1% de L-Fe aumentou a produção de 2-Fe, no entanto, o aumento da concentração do aminoácido não demonstrou ter um efeito positivo na produção deste álcool. Assim, quando realizada a biotransformação com 18% de sacarose, 0,25% de extrato de levedura e 0,1% de L-Fe foi obtida a concentração máxima de 2-Fe (435,1 mg L⁻¹) [40].

Apesar das vantagens da utilização das fontes de carbono convencionais como a glucose, a lactose ou a sacarose, é necessário desenvolver estratégias alternativas que permitam utilizar substratos de baixo custo, como resíduos industriais, de modo a tornar a produção biotecnológica de aromas à escala industrial economicamente vantajosa e competitiva. As atuais práticas agrícolas e industriais geram grandes quantidades de resíduos que causam problemas ecológicos e económicos, implicando altos custos de manuseamento e de tratamento. No entanto, estes podem contribuir para o desenvolvimento da economia circular, sendo utilizados para a produção biotecnológica de compostos de valor acrescentado [70]. Nos últimos anos tem-se verificado um aumento crescente na utilização deste tipo de substratos para a produção de aromas como resíduos da indústria do tabaco [70],

melaço [71], bagaço da cana-de-açúcar [72], águas residuais de mandioca [73], resíduos de tomate e pimenta [74], entre outros.

Relativamente à produção de 2-Fe, já foi reportada a utilização de vários resíduos e subprodutos industriais como fonte de carbono tornando o processo de produção de 2-Fe economicamente mais atrativo [75]. Martinez *et al.* [76] descreveu a utilização do bagaço da cana-de-açúcar em fermentação em estado sólido para a produção de 2-Fe por *K. marxianus* ATCC 10022, tendo obtido uma concentração máxima de 18,4 g (massa de produto/massa de substrato⁻¹) utilizando um processo de alimentação semi-contínuo [76]. Um estudo descrito por Mierzejewska *et al.* [77] avaliou a possibilidade da utilização de palha de milho hidrolisada como fonte de carbono para a produção de 2-Fe por estirpes de *M. chrysopertae* WUT25 e *P. fermentans* WUT36. Neste estudo verificou-se que todas as estirpes eram capazes de metabolizar a xilose presente no hidrolisado da biomassa lignocelulósica como fonte de carbono e posteriormente converter a L-Fe a 2-Fe, obtendo uma concentração máxima de 3,67 g L⁻¹ utilizando *P. fermentans* WUT36 [77]. Já Wang *et al.* [70] reportou a produção de 2-Fe a partir de desperdícios de tabaco por *S. cerevisiae*, via *de novo* síntese, tendo obtido uma concentração máxima de 1,55 g L⁻¹ [70]. Conde-Báez *et al.* [46] descreveu a utilização de três tipos de soro de leite (soro doce, soro ácido e coalhada) obtidos como subprodutos durante a produção de queijo, para a produção de 2-Fe por *K. marxianus*. Neste caso a produção máxima do aroma desejado foi obtida para o soro doce (0,96 g L⁻¹), devido à sua maior concentração de lactose [46]. Mais recentemente, Chreptowicz *et al.* [78], reportou a produção de 2-Fe por várias estirpes de *S. cerevisiae* utilizando um sistema bifásico, com óleo de colza como segunda fase. Neste estudo, foi possível obter uma concentração de 2-Fe de 18,5 g L⁻¹ na fase orgânica e cerca de 1 g L⁻¹ no meio [78].

O glicerol é um subproduto da produção do biodiesel e pode ser assimilado como fonte de carbono por muitos microrganismos, sendo metabolizado pela via fosforilativa para a produção de vários compostos [79]. A utilização de glicerol como fonte de carbono para a produção de 2-Fe por *Y. lipolytica* também já foi reportada por Celińska *et al.* [80], tendo sido obtida 1 g L⁻¹ deste álcool [80].

Para um crescimento celular viável e uma produção de 2-Fe eficaz é necessário garantir a adição de uma fonte de azoto adequada ao meio de cultura. A via de Ehrlich, que origina este álcool, é inibida pela presença de azoto inorgânico, como o extrato de levedura, que estimula apenas o crescimento celular. Assim, a fonte de azoto mais adequada para a produção deste álcool é, exclusivamente, a L-Fe. A concentração deste aminoácido no meio tem influência no crescimento

celular e, conseqüentemente, a produção de 2-Fe. Seria espectável que, com o aumento da concentração de L-Fe, tanto o crescimento celular como a produção de 2-Fe aumentassem devido a maior disponibilidade de fonte de azoto e de precursor. Porém, este aminoácido tem efeito inibitório no crescimento celular quando se encontra em concentrações elevadas no meio. Assim é necessário otimizar a sua concentração consoante o microrganismo utilizado para a biotransformação [44].

Além da fonte de azoto e carbono, os microrganismos precisam de micronutrientes como minerais e vitaminas, para o seu crescimento, no entanto estes compostos podem também favorecer a produção de 2-Fe. Como já foi referido, os álcoois provocam o aumento da fluidez da membrana celular. Assim iões como o magnésio e o cálcio, são essenciais uma vez que estes estabilizam a membrana impedindo a saída de moléculas essenciais. As restantes vitaminas e minerais essenciais para o crescimento podem ser adicionadas ao meio através da adição de YNB sem aminoácidos, no entanto, é ainda necessário complementar o meio com Tiamina, uma vez que esta vitamina é um cofator das descarboxilases que convertem o fenilpiruvato a fenilacetaldéido [81].

Relativamente às condições da cultura, a temperatura, pH e concentração de oxigénio dissolvido são fatores fundamentais para a produção de 2-Fe, uma vez que asseguram as condições que mantêm a viabilidade e crescimento celular, mas também a atividade das enzimas que catalisam as reações que darão origem ao composto desejado [82].

No que diz respeito à temperatura do ensaio, tem influência no crescimento celular e, conseqüentemente na produção de 2-Fe. Lu *et al.* [44] estudou a influência da temperatura na produção de 2-Fe por *C. glycerinogenes* WL2002-5, verificando que, com o aumento da temperatura, ocorre uma diminuição do crescimento celular com conseqüente diminuição da produção de 2-Fe. O aumento da temperatura de 30 para 40°C provocou uma diminuição de 60% na concentração de 2-Fe produzido [44]. Assim, é fundamental otimizar a temperatura do meio de acordo com o microrganismo em estudo.

A biotransformação de L-Fe a 2-Fe é um conjunto de reações catalisadas por várias enzimas, assim, é de esperar que o pH do meio influencie a atividade destas enzimas e, conseqüentemente, a produção deste álcool [83]. A expressão de enzimas chave na via de Ehrlich, como transaminases e descarboxilases, é regulada por ação do pH. Assim, enquanto a expressão das transaminases é ótima a pH alcalino, a expressão das descarboxilases é desregulada tornando-se imperativo alcançar um equilíbrio de forma a regular toda a via de Ehrlich [84].

Depois de selecionadas as condições de cultura e o meio a utilizar, é necessário determinar a estratégia de operação mais eficaz. A escolha do tipo de biorreator a utilizar influencia a produtividade e rendimento do processo uma vez que terá grande impacto nos fenómenos de transferência de massa, nomeadamente a transferência de massa de oxigénio da fase gasosa para a fase líquida e, posteriormente, desta para as células. Como a levedura *Y. lipolytica* é um organismo aeróbio, este é um parâmetro muito importante a ter em conta durante o seu crescimento. O biorreator do tipo tanque agitado é o mais aplicado na produção de aromas [85], uma vez que é o mais utilizado em processos para o cultivo de microrganismos aeróbios e sobre o qual existe um grande conhecimento. No entanto foram desenvolvidas e estudadas conformações alternativas, como é o caso do reator *air-lift* [86].

A escolha do modo de operação é também um dos parâmetros importantes a ter em consideração no caso de produção do 2-Fe, tendo em conta a sua toxicidade para as células. Desta forma, é possível selecionar um modo de operação capaz de remover ou diluir o produto tóxico do meio, reduzindo o seu efeito inibitório e maximizando a produtividade. A operação em modo semi-contínuo permite a adição gradual de meio durante um ciclo, até que o biorreator atinja o seu volume máximo, sendo que os componentes permanecem no biorreator até ao fim do processo. A aplicação desta estratégia de operação minimiza o problema da toxicidade do substrato, uma vez que este é diluído pela adição de meio novo, diminuindo assim o seu efeito inibitório [87]. Em sistema fechado, todos os nutrientes necessários são adicionados no início do processo e permanecem no biorreator até ao fim do ensaio, o que pode originar efeitos inibitórios sinérgicos por acumulação de etanol e 2-Fe com consequente paragem do processo obtendo-se uma concentração de 2-Fe reduzida [87]. Contrariamente, no modo de alimentação contínuo, são adicionados nutrientes continuamente ao biorreator enquanto que uma fração do meio é removida a um caudal equivalente ao da alimentação, de modo a que o volume da cultura seja mantido constante. Esta abordagem é especialmente interessante para a produção de 2-Fe, considerando a sua toxicidade para as células, sendo possível remover ou diluir o 2-Fe do meio reduzindo o efeito inibitório e maximizando a produtividade. No entanto, devido à perda de substrato por consequência da remoção de meio, a taxa de conversão poderá ser mais baixa [88]. A produção de 2-Fe em sistema fechado já foi descrita em vários estudos. Wang *et al.* [87] descreveu a produção deste álcool superior por *S. cerevisiae* R-UV3 usando glucose como fonte de carbono, obtendo 2,80 g L⁻¹ de produto e uma produtividade de 0,12 g L⁻¹ h⁻¹ [87]. Lu *et al.* [44] reportou a produção de 2-Fe por *C. glycerinogenes* WL2002-5, em sistema fechado usando glucose como fonte de carbono num meio suplementado com L-Fe, tendo obtido uma concentração máxima de 5,0 g L⁻¹ com uma taxa de biotransformação de 0,71 g g⁻¹ [44]. Garavalia *et al.* [89] obteve

0,77 g L⁻¹ de 2-Fe com um rendimento de 0,62 (2-Fe L-Fe⁻¹), com *K. marxianus* CBS 6556 [89]. Mais recentemente, Chantasuban *et al.* [88] descreveu a produção de 2-Fe por *M. pulcherrima* usando glucose como fonte carbono em sistema fechado, neste caso obteve-se uma concentração de 0,7 g L⁻¹ [88].

De forma a evitar a formação de etanol e aumentar a produção de 2-Fe, a glucose pode ser alimentada de forma semi-continua sob condições oxidativas [24], [90]. Wang *et al.* [87] reportou a biotransformação de L-Fe por *S. cerevisiae* R-UV3 por um processo de alimentação semi-contínuo com a utilização de pulsos de 2,5 g L⁻¹ de L-Fe obtendo-se uma concentração de 2-Fe de 4,38 g L⁻¹ e uma produtividade de 0,31 g L⁻¹ h⁻¹, o que corresponde a um aumento de 1,56 e 2,58 vezes, respetivamente, relativamente ao processo em sistema fechado [87]. Chantasuban *et al.* [91] testou a produção de 2-Fe em sistema contínuo com *M. pulcherrima* utilizando glucose como fonte de carbono. Neste caso, o ensaio foi realizado durante 7 dias em sistema fechado, tendo sido produzido 0,5 g L⁻¹ de 2-Fe, ao fim de 7 dias foi adicionado meio ao biorreator, aumentando a produção para 15 g L⁻¹ de 2-Fe ao fim de 11 dias [91].

1.4. TÉCNICAS DE REMOÇÃO DE PRODUTO

Apesar das estratégias de otimização anteriormente apresentadas, a inibição pelo produto é um dos problemas principais da biossíntese de 2-Fe [22], uma vez que este álcool superior pode inibir completamente o crescimento celular em concentrações que variam entre 2,0 e 4,0 g L⁻¹, dependendo da espécie e da estirpe do microrganismo [13]. Diferentes técnicas de remoção *in situ* do produto têm sido aplicadas de forma a diminuir a toxicidade e aumentar a produção do 2-Fe [13], [22], [38], [42], [78], [90], [92]–[94]. Estes métodos atuam mantendo a concentração do produto abaixo de um nível inibitório, permitindo que as estirpes possam continuar a produção de 2-Fe [93]. Estes métodos de remoção podem ser divididos de acordo com as técnicas de extração aplicadas em extração líquido-líquido, imobilização do solvente, pervaporação organofílica e adsorção (Tabela 2) [95]. Assim, é possível evitar ou reduzir a inibição do crescimento celular, estabilizar o produto, e facilitar o processo de recuperação e purificação [93].

A extração líquido-líquido passa pela utilização de um solvente orgânico que extrai continuamente os compostos hidrofóbicos do meio. Este método apresenta como principais vantagens o facto de ser simples, com poucos custos e pode ser facilmente utilizado em grande escala. No entanto pode ocorrer a formação de emulsões e por vezes é difícil de separar o produto do solvente

extratante [95]. Chreptowicz *et al.* [78], reportou a produção de 2-Fe por várias estirpes de *S. cerevisiae* com a utilização de um sistema bifásico, utilizando o óleo de colza como segunda fase. Neste estudo, foi possível obter uma concentração de 2-Fe de 18,5 g L⁻¹ na fase orgânica e cerca de 1 g L⁻¹ na fase aquosa tendo sido possível aumentar a produção total em 2,7 vezes comparativamente a resultados previamente descritos [78]. Desta forma torna-se possível obter dois produtos com interesse industrial: o óleo de colza com aroma a rosas, e o 2-Fe puro depois de extraído da fase aquosa. Stark *et al.* [24] reportou a extração do mesmo composto usando ácido oleico como fase orgânica. Neste caso, a concentração total de 2-Fe foi de 12,6 g L⁻¹ verificando-se um aumento de 3,3 vezes relativamente ao ensaio sem remoção do produto, sendo a concentração do aroma na fase de 24 g L⁻¹ [24].

Apesar dos resultados demonstrados, os solventes orgânicos podem ser muito voláteis e, em alguns casos, altamente tóxicos. Assim os líquidos iónicos demonstram ser uma alternativa mais eficaz devido à sua alta estabilidade térmica, pressão de vapor insignificante e altas propriedades de solvatação. Recentemente, tem sido estudado o uso destes líquidos imiscíveis como solventes não orgânicos de forma a substituir os solventes orgânicos comumente utilizados e menos ecológicos [96]. Okuniewska *et al.* [97] estudou a possibilidade da utilização de líquidos iónicos (IL) na extração de 2-Fe. Dos dez IL testados os melhores resultados foram obtidos com [HMPyr][NTf₂] conseguindo-se extrair 16,46 g L⁻¹ de 2-Fe [97].

De modo a melhorar a eficiência da extração do 2-Fe foram ainda exploradas outras estratégias de remoção, como a extração com a encapsulação do solvente. Neste sistema o solvente é encapsulado numa matriz polimérica evitando assim os problemas de toxicidade e a formação de emulsões, simplificando o processamento a jusante uma vez que serão necessárias menos etapas para a extração e purificação do produto. No entanto, apesar desta técnica apresentar melhores resultados que a extração líquido-líquido, apresenta a desvantagem de ser mais dispendiosa devido à etapa de imobilização da fase orgânica. Serp *et al.* [98] reportou a retenção de dibutylsebacato numa matriz polimérica de polietileno de modo a formar uma resina altamente adsorvente, química e mecanicamente estável capaz de remover de forma eficaz o 2-Fe do meio evitando a toxicidade deste para as células. Isto permitiu um aumento da produção deste álcool de cerca de 1,67 vezes, sendo que no ensaio com remoção do produto foi obtida uma concentração de 2-Fe de 6,0 g L⁻¹ enquanto que sem remoção foi obtida uma concentração de 3,6 g L⁻¹ [98].

A aplicação de técnicas de remoção *in situ* de produto por adsorção, recorre à utilização de resinas adsorventes ou outros adsorventes, de modo a recuperar o produto de interesse [11]. Esta técnica é amplamente utilizada na produção de aromas e fragrâncias, no entanto a sua aplicação para a produção de 2-Fe é ainda reduzida [38], [42], [99]. Com essa abordagem, é possível simultaneamente reduzir a toxicidade do produto e purifica-lo, tornando o processo de purificação e separação mais prático e viável [38], [42], [99]. Além disso, ao contrário dos solventes orgânicos, as resinas adsorventes apresentam uma maior biocompatibilidade, são mais baratas, não voláteis e não comprometem a qualidade do produto final [38], [42]. A adição da resinas macroporosa D101 e HZ818 ao meio de biotransformação permitiu obter uma concentração de 6,2 g L⁻¹ de 2-Fe [99]. Posteriormente, Hua *et al.* [42] reportou o uso de 7% (peso seco volume⁻¹) de resina HZ818 tendo-se verificando um aumento de 66,2 % na concentração final de 2-Fe quando comparado com o ensaio sem remoção do produto [42]. Mais recentemente, Chantasuban *et al.* [88] reportou a produção de 2-Fe em sistema fechado com *M. pulcherrima* NCYC373 utilizando pó de carvão ativado como fase adsorvente, obtendo-se uma concentração de 14 g L⁻¹ [88]. Gao *et al.* [38] estudou a possibilidade e os benefícios da extração de 2-Fe com base na técnica de adsorção hidrofílica com recurso a esferas poliméricas imiscíveis para adsorver o produto em biorreator. Neste estudo verificou-se que o polímero mais eficaz foi o Hytre1 8206. Ao testar este polímero em sistema fechado foi obtida uma concentração de 2-Fe final de 13,7 g L⁻¹ (1,2 g L⁻¹ na fase aquosa e 88,74 g L⁻¹ no polímero). Esta técnica de remoção foi ainda testada em sistema semi-contínuo, com aumento da quantidade de polímero como forma de aumentar a produção de 2-Fe. Neste ensaio foi obtida uma concentração final de 20,4 g L⁻¹ (1,4 g L⁻¹ de 2-Fe na fase aquosa e 97 g L⁻¹ de 2-Fe no polímero). A utilização deste sistema apresentou melhores resultados que o sistema de duas fases líquidas no que diz respeito à produtividade e facilidade de operação mas também na recuperação final do produto [38].

Existem ainda outras técnicas de remoção de produto como a pervaporação organofílica que consiste na separação com recurso a uma membrana densa, não porosa que irá separar o meio líquido da fase que está em vapor. No entanto esta técnica ainda necessita de ser desenvolvida e explorada de modo a obter membranas mais eficientes [92]. A utilização de uma membrana de polioctilmetilsiloxano (POMS) acoplada a um biorreator foi reportada por Etschmann *et al.* [92], e neste estudo foram extraídos 2,2 g L⁻¹ de 2-Fe [92].

Para além destas técnicas, foi também reportada a utilização de CO₂ supercrítico. Devido à sua baixa viscosidade e alta difusividade, este solvente parece ser promissor para a extração de aromas em

meio líquido. Apesar de não ser um composto tóxico nem químico, o que o torna atrativo industrialmente, pode ser prejudicial para a viabilidade celular [100]. Fabre *et al.* [100] reportou a extração de 2-Fe com CO₂ supercrítico demonstrando a capacidade de extrair 90% do produto do meio [100].

Tabela 2. Resumo das técnicas de extração *in situ* utilizadas na produção de 2-Fe.

Técnica de extração	Material	2-Feniletanol (g L ⁻¹)		Ref
		Total produzido	Extraído do meio	
Líquido-líquido	Glicol polipropileno 1500	7,5	22	[101]
	Glicol polipropileno 1200	10,2	26,5	[90]
	Ácido oleico	12,6	24	[24]
Sólido-Líquido	DBS imobilizado numa matriz polimerica de polietileno	12,8	20,5	[98]
	DBS encapsulado em hidrogéis de alginato	5,6	47,2	[102]
Adsorção hidrofílica	Resina macroporosa	2,7	84 mg _{2-Fe} g _{resina} ⁻¹	[30]
	Resina macroporosa não polar D101	3,15	45,3 mg _{2-Fe} g _{resina} ⁻¹	[103]
	Resina HZ818	6,6	1,6	[42]
	HytreIVR 8206	98,4	97	[38]
	Microesfera de PMMA	7,05	5,4	[104]
Pervaporação organofílica	Membrana de POMS		5,23	[92]
CO₂ Supercritico		90% de 2-Fe extraído		[100]

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. MICRORGANISMOS

Neste trabalho foram utilizadas as estirpes *Yarrowia lipolytica* W29 (ATCC20460) e *Yarrowia lipolytica* CH 1/5, isolada a partir de queijos. A estirpe *Y. lipolytica* CH 1/5 foi fornecida pela Szent István University, Budapeste [105].

2.2. CONSERVAÇÃO DAS ESTIRPES

As estirpes foram conservadas a - 80 °C em tubos criogénicos. Para reativação das células foi feita uma cultura das mesmas em meio YPDA (10 g L⁻¹ de extrato de levedura, 20 g L⁻¹ de peptona, 20 g L⁻¹ de glucose e 10 g L⁻¹ de agar), durante 24 horas a 27°C. As colónias foram conservadas a 4°C, servindo posteriormente para inocular os meios de cultura.

2.3. PREPARAÇÃO DOS INÓCULOS

O crescimento dos inóculos foi efetuado em matraz de 500 mL, com 200 mL de meio YPG (10 g L⁻¹ de extrato de levedura, 20 g L⁻¹ de peptona e 20 g L⁻¹ de glicerol) ou YPD (10 g L⁻¹ de extrato de levedura, 20 g L⁻¹ de peptona e 20 g L⁻¹ de glucose), consoante a fonte de carbono selecionada nos ensaios de biotransformação. A cada matraz foram adicionadas células da estirpe de *Y. lipolytica* selecionada para o ensaio, previamente preparada de acordo com a secção 2.2. Os matrizes foram mantidos num agitador orbital (Shel Lab, Sheldon Manufacturing, Cornelius, Oregon, EUA), a 27°C e 200 rpm. Após crescimento durante 14 a 16 horas, as células foram centrifugadas (8000 rpm, 10 minutos) (Centrifuga 5804 R, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), lavadas com uma solução de NaCl (0,9 % p/v) e posteriormente utilizadas para inocular os matrizes dos ensaios de biotransformação com uma DO_{600 nm} de 0,5 (correspondente a uma concentração celular de 0,417 g L⁻¹).

2.4. EFEITO INIBITÓRIO DO 2-FENILETANOL

De forma a avaliar o efeito inibitório do 2-Fe nas estirpes de *Y. lipolytica* estudadas, estas foram cultivadas em meio YPG, como descrito na secção 2.3., sendo posteriormente utilizadas para inocular matrizes de 100 mL com 50 mL de meio (10 g L⁻¹ de glicerol, 2 g L⁻¹ de NH₄(SO₄)) com uma DO_{600 nm} inicial de 0,4, que corresponde a uma concentração celular de 0,331 g L⁻¹. O meio foi suplementado com diferentes concentrações de 2-Fe (0 (controlo), 1, 2, e 3 g L⁻¹) e as culturas foram incubadas a 27°C, 200 rpm durante 48 horas. A percentagem de inibição do crescimento celular foi determinada de acordo com a equação (1).

$$\left(1 - \frac{\Delta X_A}{\Delta X_C}\right) \times 100 \text{ (Eq. 1)}$$

Onde ΔX_A corresponde à variação de biomassa em cada ensaio e ΔX_C corresponde à variação de biomassa do ensaio controlo.

2.5. PRODUÇÃO DE 2-FENILETANOL VIA *DE NOVO* SÍNTESE

De modo a validar a produção de 2-Fe via *de novo* síntese (utilizando a glucose como fonte de carbono) as estirpes de *Y. lipolytica* foram cultivadas segundo as condições descritas na secção 2.3 e posteriormente utilizadas para inocular matrizes de 500 mL com 200 mL de meio de cultura contendo, por litro de água: 40 g de glucose e 10 g de extrato de levedura, sem suplementação de L-Fe, com uma OD_{600nm} de 0,5 (correspondente a uma concentração celular de 0,417 g L⁻¹). De seguida estas foram incubadas a 27°C e 200 rpm, num agitador orbital (Shel Lab, Sheldon Manufacturing, Cornelius, Oregon, EUA) durante 7 dias, tendo sido retirada uma amostra no final do ensaio para posterior análise por GC-MS (método descrito na secção 2.9) de forma a detetar a presença de 2-Fe.

2.6. ENSAIOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO EM MATRAZ

De modo a estudar a influência da fonte de carbono e da concentração de L-Fe na conversão da L-Fe em 2-Fe, foram realizados ensaios de biotransformação em matraz utilizando duas fontes de carbono distintas: a glucose e glicerol bruto. Foi ainda avaliado o efeito da concentração de L-Fe na produção do 2-Fe.

Os ensaios de biotransformação foram levados a cabo em matrizes de 500 mL com 200 mL de meio de biotransformação, que contem por litro de água: 40 g de glucose ou 58,84 g de glicerol bruto, 15 g de KH_2PO_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02 g de YNB sem aminoácidos, 3 mg de tiamina, suplementado com 4 ou 6 g de L-Fe [106], incubados a 27 °C e 200 rpm, num agitador orbital (Shel Lab, Sheldon Manufacturing, Cornelius, Oregon, EUA).

O glicerol bruto utilizado foi fornecido pela Prio Energy - Prio Biocombustíveis, SA e apresenta a seguinte composição (p/p), de acordo com o fornecedor: 52,9 % de glicerol, 9 % de água, 4,9 % de NaCl, menos de 0,01 % de metanol e 0,5 % de matéria orgânica (que não é glicerol).

2.7. ENSAIOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO EM BIORREATOR

Os ensaios de biotransformação foram levados a cabo em biorreator 3,7 L (RALF PLUS SOLO, Bioengineering, Suíça) com 31 cm de altura e 17 cm de diâmetro (Figura 4). O ar foi fornecido utilizando um aspersor localizado na base do agitador, sendo o caudal de ar controlado automaticamente. A agitação foi realizada por dois impulsores do tipo Rushton, com 6 lâminas de 6 cm de diâmetro externo.



Figura 4. Reator RALF PLUS SOLO com meio de biotransformação.

A concentração de oxigénio dissolvido foi controlada através da velocidade de agitação e do caudal de ar definidas no início de cada ensaio. Os valores de referência para o pH e a percentagem de oxigénio dissolvido foram controlados automaticamente por uma unidade de controlo acoplada ao biorreator. O pH do meio foi controlado pela adição de hidróxido de potássio (4 M) ou ácido clorídrico (2 M), utilizando uma bomba peristáltica Peripex (Bioengineering, Suíça)

As células foram preparadas conforme está descrito na secção 2.3., sendo posteriormente usadas para inocular 1,1 L de meio de biotransformação cuja composição se encontra definida na secção 2.5, tendo sido usado glicerol como fonte de carbono. A concentração inicial de L-Fe foi 4 e 8 g L⁻¹ para os ensaios em sistema fechado. Após terem sido determinadas as condições de arejamento e pH ótimas para a produção de 2-Fe, foram realizados ensaios com alimentação semi-contínua através da adição de pulsos de L-Fe. Nestes ensaios, foram adicionados pulsos de 4 g L⁻¹ de L-Fe, 24 e 81 horas após o início do ensaio onde a concentração inicial de L-Fe foi de 4 g L⁻¹. Foram ainda realizados dois ensaios onde foi testada a adição de um pulso de 8 e 4 g L⁻¹ após 81 horas do início do ensaio, com uma concentração inicial de L-Fe de 8 g L⁻¹.

2.7.1. DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE VOLUMÉTRICO DE TRANSFERÊNCIA DE OXIGÉNIO

Para a determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigénio, k_La , recorreu-se ao método indireto de desarejamento estático (estado não estacionário), não tendo sido utilizados microrganismos respiratórios. Esta técnica permite avaliar o efeito das variáveis operacionais como a agitação e o arejamento tendo sido proposta em 1951 por Wise.

Para determinar o k_La , colocou-se 1,1L de água destilada no biorreator descrito na secção 2.7. De forma a remover o oxigénio dissolvido no meio foi inicialmente injetado azoto. Posteriormente foi feito o arejamento do meio, com caudal e agitação controlados, até ser atingida a saturação.

Esta técnica baseia-se na equação de balanço de massa do oxigénio que, na ausência de células e em sistema fechado, pode ser simplificada à variação da concentração de oxigénio dissolvido ao longo do tempo (dO/dt) igualada ao k_La (Eq. 2).

$$dO/dt = k_La(O^S - O) \quad \text{Eq. 2}$$

Pela integração da equação é possível determinar o k_{La} que é igual ao valor simétrico do declive da reta resultante da representação gráfica do logaritmo de $(1 - O/O_s)$ em função do tempo.

2.8. ENSAIOS COM REMOÇÃO *IN SITU* DE PRODUTO

2.8.1. ENSAIOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO COM REMOÇÃO *IN SITU* DE PRODUTO

Nos ensaios de biotransformação com remoção *in situ*, a resina adsorvente utilizada nos ensaios de adsorção foi a Amberlit XAD-4 (Sigma-Aldrich). Antes de ser utilizada, a resina foi colocada em metanol, de modo a serem removidas impurezas, e posteriormente lavada com água destilada. De seguida foi pesada, esterilizada com etanol e lavada com água destilada esterilizada. Esta foi adicionada ao meio de biotransformação, antes da inoculação (preparada de acordo com a secção 2.3.). Os ensaios foram realizados em matrizes de 500 mL, utilizando glicerol bruto (58,84 g L⁻¹) como fonte de carbono e com 4 g L⁻¹ de L-Fe.

2.8.2. DESSORÇÃO DO 2-FENILETANOL DAS RESINAS E REUTILIZAÇÃO DAS MESMAS

No final da biotransformação, a resina foi separada do meio de cultura por sedimentação sendo posteriormente lavada com água destilada, com um volume equivalente a 5 vezes o peso húmido da resina. De seguida, a resina foi eluída com etanol absoluto (1:2 p/v) após incubação a 180 rpm, 27 °C durante 2 horas, tendo sido este procedimento repetido 3 vezes de modo a garantir que todo o 2-Fe tinha sido removido da resina [42]. Os diferentes extratos recolhidos foram misturados e posteriormente analisados por HPLC. Após a dessorção, a resina foi colocada em metanol, lavada com água destilada e posteriormente reutilizada.

2.9. MÉTODOS ANALÍTICOS

Ao longo dos ensaios de biotransformação foram retiradas amostras de modo a determinar a concentração da biomassa, consumo de glucose e glicerol, produção de 2-Fe, e consumo de L-Fe.

A determinação da concentração em biomassa foi efetuada por leitura da densidade ótica (DO) a um comprimento de onda de 600 nm com recurso ao leitor de microplacas (Sunrise, Tecan, Männedorf, Suíça). Através da curva de calibração previamente determinada, foi possível converter a absorvância obtida em peso seco de células (g L^{-1}) (Anexo I).

De modo a determinar o consumo de glucose e glicerol ao longo do tempo, recolheram-se amostras de 2 mL e centrifugaram-se a 8000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente o sobrenadante foi filtrado (filtro WHATMAN, PES – 0,2 μm) e armazenado em *vials* a -20°C para posterior análise. A concentração de glucose e glicerol foi determinada por HPLC (do inglês *high performance liquid chromatography*) utilizando um sistema JASCO associado a um detetor RI (RI-2031). As amostras foram analisadas com recurso a uma coluna de troca iónica (Aminex HPX-87H, 300x7,8 mm, Bio-rad), que foi mantida a 60°C . As amostras foram injetadas automaticamente a um caudal de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$, utilizando como eluente H_2SO_4 a uma concentração de 5 mM, durante 25 minutos. Os dados foram interpretados com o software Jasco ChromPass. Após determinadas as curvas de calibração (Anexo II), foi possível calcular as diferentes concentrações de glucose e o glicerol.

De forma a determinar o consumo de L-Fe e a produção de 2-Fe ao longo do tempo, recolheram-se amostras de 2 mL e centrifugaram-se a 8000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente o sobrenadante foi filtrado (filtro WHATMAN, PES – 0,2 μm) e armazenado em *vials* a -20°C para posterior análise. As concentrações de 2-Fe e L-Fe foram determinadas por UHPLC (do inglês *Ultra-high performance liquid chromatography*) (Nexera X2, SHIMADZU), utilizando um detetor *diode array* (SPD-M20A) a 215 nm, com recurso a uma coluna de fase reversa YMC ODS-Aq (250x4,6 mm) a 30°C (CTO-30A). As amostras foram injetadas automaticamente (SIL-30AC Autosampler, SHIMADZU) a um caudal de 1 mL min^{-1} , utilizando como eluentes água (solvente A) e acetonitrilo (solvente B). A separação foi feita com recurso a um gradiente, em que a concentração do eluente A aumentou: 0 min – 100% A, 10 min – 100% A, 16,7 minutos – 70% A, 26,7 min – 70% A, 33,3 minutos – 100% A; 41,7 minutos – 100% A. Os dados foram interpretados com o software LabSolutions.

De forma a validar a produção de 2-Fe via de novo síntese pelas duas estirpes em estudo, a identificação do 2-Fe produzido foi realizada por GC-MS (do inglês *gas chromatography-mass*

spectrometry). No final dos ensaios de produção referidos na secção 2.5, o meio foi centrifugado a 8000 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante recolhido. Posteriormente, o 2-Fe foi extraído utilizando clorofórmio (1:1, v/v) e seco com Na₂SO₄. O extrato foi analisado por GC-MS (Varian 4000) utilizando uma coluna MS Restek RXI-5Sil (30 m, 0,25 mm, 0,25 mm), com um volume de injeção de 1 µL usando hélio como gás de arraste. As temperaturas do injetor e do detetor foram 270°C e 250°C, respetivamente, e foi aplicada programa seguinte rampa de temperaturas: 100°C durante 3 min, seguido de uma subida de 12°C por minuto até serem atingidos os 200°C. Os parâmetros do detetor de massa foram: linha de transferência D 250°C e faixa de varrimento D 38-750 m/z [31].

3. RESULTADOS

3.1. ENSAIOS DE TOXICIDADE

Como já foi referido anteriormente, um dos fatores limitantes na produção de 2-Fe é a inibição do crescimento celular, no entanto é necessário ter em atenção que esta inibição depende da espécie e da estirpe em estudo. A inibição do crescimento celular de *K. marxianus* por 2-Fe, foi descrita por Fabre *et al.* [27]. Neste caso verificou-se um decréscimo significativo no crescimento celular a partir de 0,5 g L⁻¹ de 2-Fe, observando-se uma diminuição da viabilidade celular de 37% para 0 quando a concentração deste álcool superior passa de 1 g L⁻¹ para 2 g L⁻¹ [27]. Já Lu *et al.* [44] compararam o efeito inibitório de 2-Fe em estirpes de *C. glycerinogenes* WL2002-5 e *S. cerevisiae* W303-1, descrevendo uma tolerância até uma concentração de 4 g L⁻¹ e 2 g L⁻¹, respetivamente [44].

De modo a avaliar o efeito inibitório do 2-Fe nas estirpes de *Y. lipolytica* W29 e CH1/5, as células foram cultivadas em meio líquido com diferentes concentrações deste composto, sendo posteriormente avaliado o seu crescimento celular e determinada a respetiva percentagem de inibição (Figura 5).

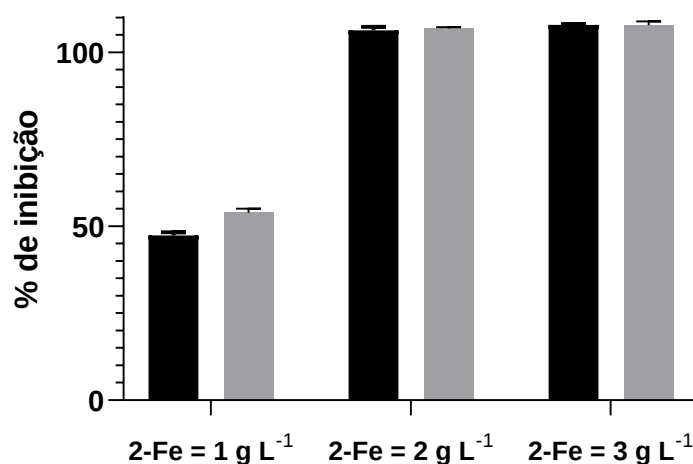


Figura 5. Efeito de inibição de 2-Fe para estirpes de *Y. lipolytica* W29 e CH1/5 (representadas a preto e cinzento, respetivamente) após crescimento em meio líquido com diferentes concentrações de 2-Fe (1, 2 e 3 g L⁻¹) durante 48 horas a 27 °C. Os valores apresentados representam a média de 2 ensaios independentes e as barras de erro representam o desvio padrão entre estes ensaios.

Através da análise dos resultados apresentados na Figura 5 é possível verificar um efeito inibitório do 2-Fe no crescimento de ambas as estirpes, para concentrações de 2-Fe iguais ou superiores a 2 g L⁻¹. Em relação à concentração de 1 g L⁻¹ foi obtida uma percentagem de inibição de 47,3 ± 0,9% e 53,8 ± 1,2% para a estirpe W29 e CH1/5, respetivamente, no entanto esta diferença não mostrou ser estatisticamente significativa. Estudos anteriores realizados em meio sólido para as estirpes W29, CH 1/5, CH 3/4 e CBS2075 de *Y. lipolytica*, revelaram resultados semelhantes, tendo-se verificado que a partir de 2 g L⁻¹ de 2-Fe o crescimento celular é totalmente inibido [107]. Comparativamente a outros microrganismos, é possível verificar que a levedura *Y. lipolytica* apresentou resultados semelhantes, por exemplo a *K. marxianus* cuja inibição total do crescimento se verificou também a partir de 2 g L⁻¹ [38], no entanto já foi reportada a tolerância a 2-Fe até 4 g L⁻¹ por *S. cerevisiae* JM2014 [41].

3.2. PRODUÇÃO DE 2-FE PELA VIA DE NOVO SÍNTESE

A produção de 2-Fe por microrganismos pode ocorrer pela via *de novo* síntese, na qual este álcool superior é produzido através da via do chiquimato a partir da glucose [14]. A produção de 2-Fe por esta via já foi reportada utilizando diversos microrganismos como por exemplo *Phellinus ignarius*, *P. laevigatus* e *P. tremulae* *Ischnoderma benzoinum* por *Geotrichum penicillatum* [108]–[110].

De forma a validar a produção de 2-Fe via *de novo* síntese pelas estirpes em estudo, estas foram cultivadas em meio utilizando a glucose como fonte de carbono sem L-Fe. Ao fim de 7 dias foi retirada uma amostra para verificar a presença deste álcool superior no meio por GC-MS e quantificação do mesmo por UHPLC.

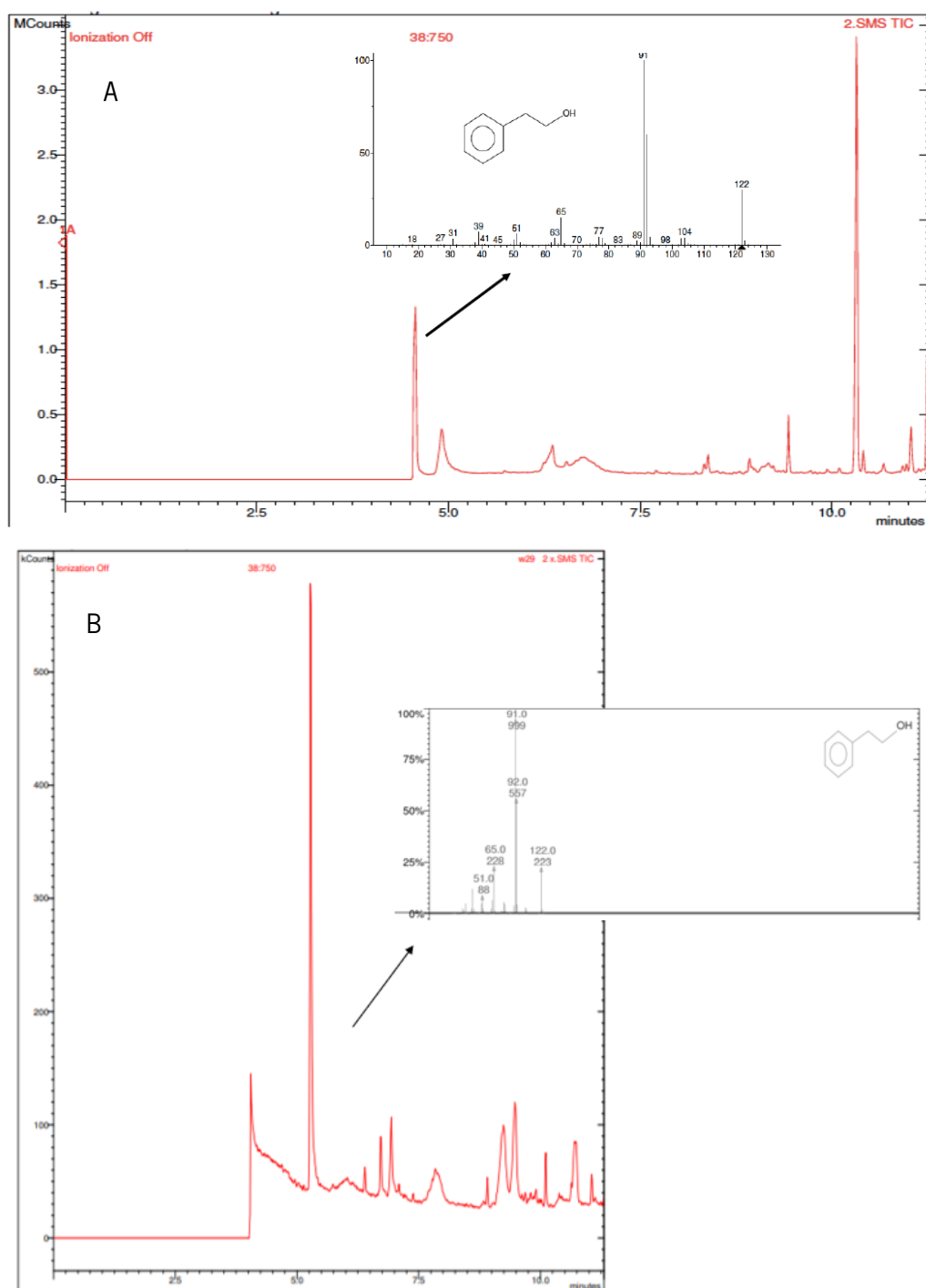


Figura 6. Análise por GC-MS indicando a presença de 2-Fe no meio de cultura da *Y. lipolytica* CH1/5 (A) e W29 (B) utilizando glucose como fonte de carbono sem L-Fe.

Pela análise do espectro obtido (Figura 6) é possível verificar a presença de 2-Fe no meio, o que permite confirmar a capacidade da estirpe CH1/5 e W29 produzirem este álcool superior, tendo sido obtida uma concentração de $33,8 \pm 1,9$ e $22 \pm 0,4$ mg L⁻¹, respetivamente.

Estes resultados estão de acordo com resultados já descritos por Celińska et al. [45], que reportou pela primeira vez a capacidade desta levedura produzir 2-Fe utilizando glucose como fonte de carbono sem a adição de precursor. Neste estudo, foram testadas 6 estirpes de *Y. lipolytica*, A101.1.31, A18, A15, B57-4, MK1, A101, tendo-se verificado que apenas 4 destas estirpes demonstraram a capacidade de produzir 2-Fe com concentrações de 240, 20, 40 e 10 mg L⁻¹, para as estirpes A101.1.31, A18, B57-4 e A15, respetivamente [45].

Sem a adição de precursor, o 2-Fe é sintetizado através da glicólise e a via das pentoses fosfato, sendo estas vias utilizadas essencialmente para a produção de biomassa em detrimento da produção de 2-Fe o que resulta, consequentemente, na obtenção de concentrações de 2-Fe reduzidas [4]. No entanto, apesar das baixas concentrações de 2-Fe, estes ensaios demonstraram o potencial desta levedura para a produção do 2-Fe pela via *de novo* síntese.

3.3. ENSAIOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO EM MATRAZ

Apesar da capacidade dos microrganismos produzirem 2-Fe pela via *de novo* síntese, as concentrações obtidas são reduzidas. Assim, a produção de 2-Fe por biotransformação da L-Fe é uma das estratégias mais simples e mais utilizadas para a produção deste aroma [14].

Assim, tendo em consideração que a produção de 2-Fe por estirpes de *Y. lipolytica* se encontra pouco estudada [45] foi avaliada a capacidade das estirpes W29 e CH1/5 produzirem este aroma por biotransformação da L-Fe. Para tal foram realizados ensaios em matraz utilizando a glucose como fonte de carbono, tendo sido os meios foram suplementados com 4 g L⁻¹ de L-Fe, sendo este aminoácido a única fonte de azoto. Os valores obtidos para o crescimento celular, consumo de glucose e L-Fe e produção de 2-Fe, estão representados na Figura 7.

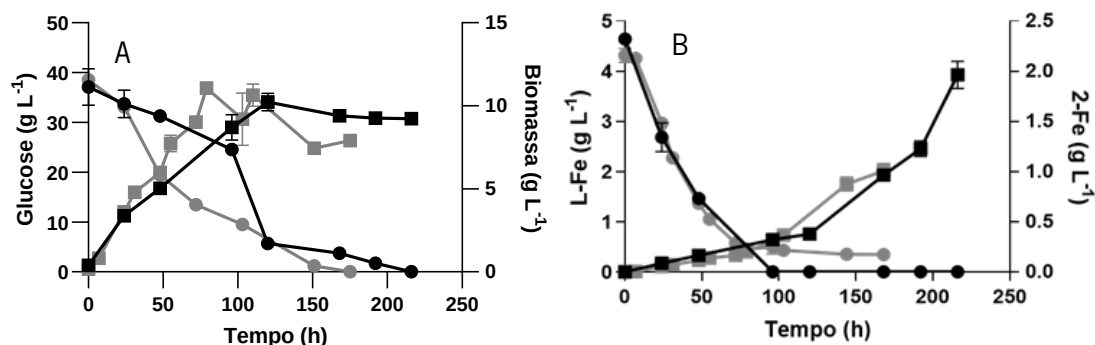


Figura 7. Crescimento celular (□), consumo de glucose (○) (A), consumo de L-Fe (○) e produção de 2-Fe (□) (B) por diferentes estirpes de *Y. lipolytica*, W29 (cinzento), e CH1/5, (preto) em matraz com 40 g L⁻¹ de glucose, suplementado com 4 g L⁻¹ de L-Fe. Os valores apresentados representam a média de 2 ensaios independentes ± desvio padrão

Analisando o consumo da fonte de carbono é possível verificar que esta é totalmente consumida após 175 e 216 horas, nos ensaios com as estirpes W29 e CH1/5, respetivamente. Observando o perfil de crescimento celular para ambas as estirpes, é ainda possível verificar que este é semelhante, sendo atingida a concentração de biomassa máxima, cerca de 10 g L⁻¹, às 120 horas.

Analisando o consumo da L-Fe, observou-se que esta foi praticamente toda consumida nos dois ensaios, restando apenas cerca de 2,02% da concentração inicial de L-Fe ao fim de 168 horas no ensaio com a estirpe W29. Já para a estirpe CH1/5 verificou-se um consumo total do precursor ao fim de 96 horas, coincidindo com o aumento acentuado da concentração de 2-Fe. Este aumento da produção de 2-Fe na ausência de L-Fe pode ser explicada pela acumulação de intermediários da via de Ehrlich que serão posteriormente convertidos neste álcool superior [4].

Relativamente à produção de 2-Fe, foi possível verificar que as duas estirpes são capazes de produzir o aroma pretendido, não tendo sido observadas diferenças entre ambas. Assim, ao fim de 168 horas a concentração máxima de 2-Fe obtida foi cerca de 1 g L⁻¹, para as duas estirpes. Como o ensaio com a estirpe CH1/5 foi prolongado por mais 48 horas, a concentração final obtida foi superior (1,9 g L⁻¹). Comparando os valores de concentração máxima de 2-Fe, rendimento e produtividade das duas estirpes 168 horas após o início do ensaio (Tabela 3) é possível verificar que a estirpe W29 apresentou um maior rendimento, sendo neste caso 1,2 vezes superior ao rendimento obtido pela estirpe CH1/5. No entanto, estes valores são inferiores ao rendimento teórico máximo de conversão mássica de L-Fe em 2-Fe de 75% , o que indica a necessidade de otimizar o processo de modo a obter melhorias na produção deste aroma [14].

Em relação à concentração máxima de 2-Fe e à produtividade obtidas para a estirpe CH1/5 apesar de, em ambos os casos, estes serem inferiores aos atingidos com estirpe W29, as diferenças observadas não são estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Resultados semelhantes foram obtidos por Huang *et al.* [40] tendo reportado a produção de 0,5 g L⁻¹ de 2-Fe utilizando 1 g L⁻¹ de L-Fe por *P. fermentans* L-5 em 16 horas de ensaio [40]. Já Lomascolo *et al.* [111] reportou a biotransformação de 6 g L⁻¹ de L-Fe por *A. niger* tendo obtido 1,4 g L⁻¹ de 2-Fe ao fim de 9 dias [111]. Albertazzi *et al.* [47] descreveu a obtenção de 1,7 g L⁻¹ de 2-Fe por *Kloeckera saturnus* CBS 5761 e *Hansenula anomala* CBS 110 e 1,5 g L⁻¹ do mesmo álcool por *S. cerevisiae* NCYC 739 em meio com 2 g L⁻¹ de L-Fe como fonte de azoto exclusiva [47].

Tabela 3. Concentração de 2-Fe, rendimento e produtividade ao fim de 168 horas de ensaio em matraz por diferentes estirpes de *Y. lipolytica*, CH1/5 e W29. Os valores apresentados representam a média de 2 ensaios independentes. Valores seguidos da mesma letra não representam diferenças estatisticamente significativas entre eles ($p \leq 0,05$) por análise de *t*-test.

Estirpe	Concentração de 2-Fe (g L ⁻¹)	Rendimento mássico (2-Fe L-Fe ⁻¹)	Produtividade (mg L ⁻¹ h ⁻¹)
CH1/5	0,97 ± 6E-6 ^a	0,208 ± 0,003 ^a	5,75 ± 4E-4 ^a
W29	1,01 ± 0,05 ^a	0,25 ± 0,01 ^b	6,0 ± 0,3 ^a

Apesar das concentrações de 2-Fe obtidas não apresentarem diferenças estatisticamente significativas entre as duas estirpes em estudo, decidiu-se selecionar a estirpe CH1/5 para os ensaios seguintes, uma vez que esta estirpe não se encontra tão explorada como a W29.

As atuais práticas industriais e agrícolas levam à produção de elevadas quantidades de resíduos e subprodutos que podem ser utilizados na produção de compostos de valor acrescentado, o que vai de encontro ao desenvolvimento da economia circular [112], [113]. A utilização do glicerol bruto como substrato em processos biotecnológicos tem-se apresentado como uma estratégia alternativa bastante interessante [114]. A levedura *Y. lipolytica* é conhecida pela sua capacidade em consumir o glicerol bruto com elevada eficiência [114], [115], sendo o uso desta fonte alternativa de carbono uma estratégia que pode tornar a produção de 2-Fe economicamente atrativa.

Assim, foram realizados ensaios em matraz utilizando a estirpe CH1/5 e glicerol bruto como fonte de carbono. Considerando que a concentração de L-Fe no meio influencia a produção de 2-Fe

[45] e que a estirpe selecionada apresentou um consumo total do precursor, foram também realizados ensaios utilizando uma concentração de L-Fe de 6 g L⁻¹ (Figura 8).

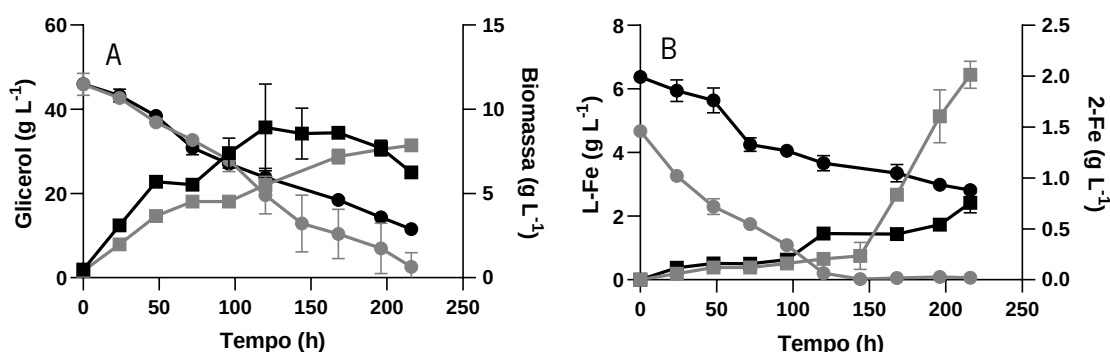


Figura 8. Crescimento celular (□), consumo de glicerol bruto (○) (A), consumo de L-Fe (○) e produção de 2-Fe (□) (B) por *Y. lipolytica* CH1/5 com diferentes concentrações iniciais de L-Fe, 6 g L⁻¹ (preto) e 4 g L⁻¹ (cinza). Os valores apresentados representam a média de 2 ensaios independentes $\pm$ o desvio padrão.

Comparando os resultados obtidos para as duas fontes de carbono, é possível verificar que não são observadas diferenças significativas a nível do crescimento celular. A concentração máxima de biomassa foi atingida ao fim de 120 horas, em ambos os casos, com concentrações de biomassa de $10,2 \pm 0,2$ e $8,9 \pm 0,9$ para a glucose e glicerol, respetivamente. Resultados semelhantes foram descritos por Celinska *et al.* [45] que demonstrou a capacidade de *Y. lipolytica* NCYC3825 utilizar glicerol como fonte de carbono para a produção de 2-Fe. Neste estudo também não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas no crescimento celular quando utilizada glucose ou glicerol como fonte de carbono [45]. Relativamente ao aumento da concentração de precursor é possível verificar que este não influencia o crescimento celular tendo sido obtida uma concentração máxima de $7,2 \pm 0,2$ g L⁻¹ 168 horas após o início do ensaio.

No que diz respeito ao consumo da fonte de carbono, observou-se que tanto a glucose como o glicerol são totalmente consumidos ao fim de 216 horas de ensaio. No entanto verificou-se que, com o aumento da concentração de L-Fe, a levedura não consome o glicerol na sua totalidade, restando 25% do glicerol total no final do ensaio.

Analogamente à fonte de carbono, também o precursor foi consumido na sua totalidade, quando comparadas as diferentes fontes de carbono testadas utilizando 4 g L⁻¹ de precursor, observando-se a inexistência de precursor no meio 96 e 120 horas após o início do ensaio quando usada a glucose e o glicerol, respetivamente. Na produção de 2-Fe (Tabela 4) não foram tendo sido observadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre si obtendo-se cerca de 2 g L⁻¹ deste

aroma. De forma semelhante, também o rendimento e produtividade (Tabela 4) não demonstraram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Estes resultados vão de encontro ao reportado por Celínska *et al.* [45], que também obteve concentrações de 2-Fe semelhantes quando comparou a produção de 2-Fe utilizando a glucose e o glicerol com fonte de carbono, tendo sido produzidos cerca de $0,8 \text{ g L}^{-1}$ do aroma pretendido ao fim de 54 horas [45]. Com base nestes resultados, é possível verificar que a utilização de glicerol bruto como fonte de carbono, quando comparada à utilização da glucose, não afetou significativamente a concentração de 2-Fe obtida, torna-se assim vantajosa a utilização deste subproduto da indústria do biodiesel.

Relativamente à concentração de precursor utilizada, verificou-se que com o aumento da concentração de L-Fe, a levedura não consegue consumir o precursor na sua totalidade, consumindo apenas 55,8% deste aminoácido ao fim de 216 horas de ensaio. Seria de esperar que, com este aumento da concentração inicial de precursor, se observasse um consequente aumento da produção de 2-Fe devido à sua maior disponibilidade no meio [45], no entanto, observou-se uma diminuição da concentração de 2-Fe produzida bem como do rendimento e produtividade (Tabela 4) comparativamente ao ensaio em que foi utilizada uma concentração mais baixa de L-Fe. Uma vez que a levedura não demonstrou ser capaz de consumir toda a L-Fe presente no meio, esta permaneceu em concentrações elevadas. Estas concentrações podem ter levado a uma inibição das proteínas transportadoras deste aminoácido que passam a apresentar baixa afinidade para este precursor, quando este se encontra em concentrações elevadas, impedindo a sua entrada na célula e posterior biotransformação. [116].

Tabela 4. Concentração de 2-Fe, rendimento e produtividade ao fim de 216 horas de ensaio em matraz por *Y. lipolytica*, CH1/5 utilizando diferentes fontes de carbono, glucose e glicerol e diferentes concentrações de L-Fe, 4 e 6 g L^{-1} . Os valores apresentados representam a média de 2 ensaios independentes $\pm$ desvio padrão. Valores seguidos da mesma letra não representam diferenças estatisticamente significativas entre eles ($p \leq 0,05$) por análise de t-test. Letras maiúsculas representam a análise entre as diferentes concentrações de L-Fe e letras minúsculas representam a análise entre diferentes fontes de carbono.

Fonte de carbono	L-Fe (g L ⁻¹)	Concentração de 2-Fe (g L ⁻¹)	Rendimento mássico (2-Fe L-Fe ⁻¹)	Produtividade (mg L ⁻¹ h ⁻¹)
Glucose	4	$1,9 \pm 0,1^a$	$0,42 \pm 0,01^a$	$9,1 \pm 0,4^a$
	4	$2,0 \pm 0,1^{aA}$	$0,41 \pm 0,01^{aA}$	$9,2 \pm 0,5^{aA}$
Glicerol	6	$0,540 \pm 0,005^B$	$0,160 \pm 0,003^B$	$2,83 \pm 0,03^B$

Assim, uma vez que quando são utilizadas concentrações mais elevadas de L-Fe as células não são capazes de metabolizar todo o aminoácido, verificando-se ainda um decréscimo na produção de 2-Fe, não se torna viável a utilização de concentrações superiores a 4 g L⁻¹, tendo-se dado continuidade ao estudo com esta concentração de precursor.

3.3.1. ENSAIOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO COM REMOÇÃO *IN SITU* DE PRODUTO

Tendo em consideração que um dos principais problemas na produção de 2-Fe é a sua toxicidade para as células e que concentrações de 2-Fe superiores a 2 g L⁻¹ inibem o crescimento da estirpe *Y. lipolytica* CH 1/5, foram realizados ensaios em matraz com remoção *in situ* de produto por adsorção. Estudos anteriores do grupo [117] demonstraram que a resina XAD4-HP apresentava uma elevada afinidade para o 2-Fe, sendo capaz de adsorver cerca de 73 % de 2-Fe [117].

Para os ensaios com remoção *in situ* de produto foram utilizados 7 % (p/v húmido) da resina XAD4-HP [117], com uma concentração de 4 g L⁻¹ de L-Fe, e utilizando o glicerol bruto como fonte de carbono (Figura 9).

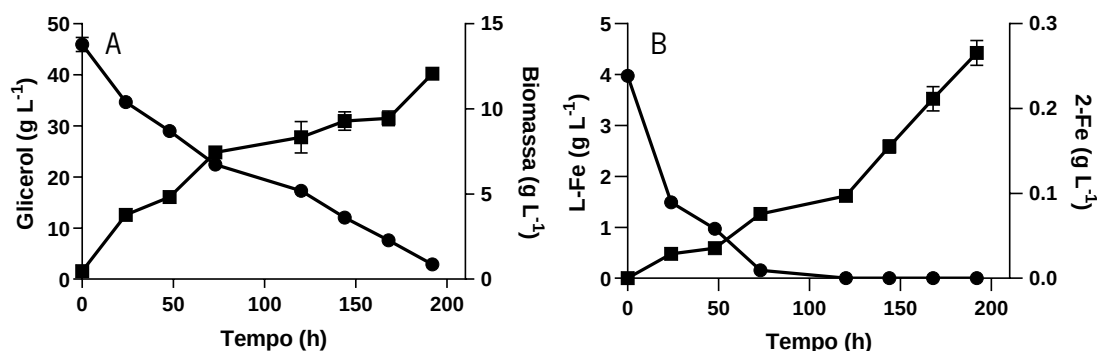


Figura 9. Crescimento celular (□), consumo de glicerol bruto (○) (A), consumo de L-Fe (○) e produção de 2-Fe (□) (B) por *Y. lipolytica* CH1/5 em matraz com uma concentração inicial de L-Fe, 4 g L⁻¹ com remoção do produto com recurso a utilização da resina XAD4-HP. Os valores apresentados representam a média de 2 ensaios independentes ± desvio padrão.

Comparando o perfil de crescimento nestas condições com o obtido nos ensaios sem remoção de produto (Figura 8) é possível verificar que a viabilidade das células não é afetada pela presença da resina, isto é, não há adsorção de nenhum dos nutrientes nem é libertado nenhum componente que possa afetar o crescimento celular. Os dados da Figura 9 comprovam estes resultados, uma vez que é obtida uma concentração máxima de biomassa de 12 g L⁻¹ ao fim de 192 horas, indicando que a

adição da resina não afeta o crescimento celular. Como seria expectável, a sua utilização permite um maior crescimento celular pois como a resina adsorve o 2-Fe, composto tóxico, este não está em contacto direto com as células, permitindo um maior crescimento [42], [99]. Além disso, também é possível observar que a resina utilizada não tem afinidade para o glicerol, uma vez que o perfil de consumo de substrato não foi afetado pela sua presença.

No ensaio com presença de resina foi possível observar que toda a L-Fe foi consumida ao fim de 72 horas, 48 horas mais rápido do que no ensaio sem adição de resina (Figura 9). Assim, a introdução da resina permitiu um maior consumo do precursor, uma vez que com a remoção do 2-Fe foi evitado o seu efeito inibitório nas células. Assim, após 192 horas foi obtida uma concentração de $2,16 \text{ g L}^{-1}$ de 2-Fe ($0,27 \text{ g L}^{-1}$ no meio extracelular e $1,89 \text{ g L}^{-1}$ adsorvido na resina) (Tabela 4 e 5). Apesar de não serem observadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre a concentração máxima de 2-Fe obtida assim como da produtividade ($9,6 \pm 0,2 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ no ensaio com resina), é possível verificar que a aplicação de um suporte sólido como técnica de remoção de produto favorece a produção de 2-Fe, pois permite aumentar em 1,3 vezes o rendimento de 2-Fe ($0,52 \text{ 2-Fe L-Fe}^{-1}$) em relação ao ensaio sem resina.

Tabela 5. Concentrações de 2-Fe extracelulares, na resina e totais, rendimento e produtividade para os ensaios com remoção de produto. Os valores apresentados representam a média de 2 ensaios independentes $\pm$ desvio padrão.

Ensaio	[2-Fe] na resina (g L^{-1})	[2-Fe] no meio (g L^{-1})	[2-Fe] total (g L^{-1})	Rendimento mássico (2-Fe L-Fe $^{-1}$)	Produtividade ($\text{mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$)
Com remoção de produto	$1,89 \pm 0,03$	$0,27 \pm 0,01$	$2,16 \pm 0,04$	$0,52 \pm 0,01$	$9,6 \pm 0,2$

Relativamente ao rendimento molar observou-se um aumento de 57,9% para 72,9% quando aplicada esta técnica de remoção, estes resultados vão de encontro aos descritos por Hua *et al.* [42], em que a utilização da resina HZ818 com *S. cerevisiae* C-3 reduziu a toxicidade do 2-Fe e permitiu aumentar a concentração do produto, tendo-se obtido $6,6 \text{ g L}^{-1}$ de 2-Fe, com o rendimento molar de 74,4%, (66,2% superior ao obtido na biotransformação convencional) [42]. Wang *et al.* [87] descreveu a produção de 2-Fe por *S. cerevisiae* R-UV3 em sistema semi-contínuo com uma técnica de remoção do produto *in situ* com recurso à resina FD0816. A utilização desta resina permitiu aumentar a

concentração de 2-Fe de 4,38 g L⁻¹ para 13,7 g L⁻¹ o que corresponde a um aumento da produção de 3,1 vezes [87].

Mais recentemente, Chantasuban *et al.* [88] reportou a produção de 2-Fe em sistema fechado com *M. pulcherrima* utilizando 0,5 g de carvão ativado em pó como adsorvente, tendo sido possível obter 7,4 g L⁻¹ de 2-Fe (1,5 g L⁻¹ na fase aquosa e 10 g L⁻¹ no carvão ativado) , quando sem a utilização desta técnica de remoção do produto, apenas foi produzido 4,6 g L⁻¹ de 2-Fe a partir de 10 g L⁻¹ de L-Fe, o que corresponde a um aumento de 1,6 vezes da produção pelo uso do carvão [88].

Os resultados obtidos no presente trabalho para os ensaios com e sem remoção *in situ* de produto são muito semelhantes (as diferenças obtidas não são estatisticamente significativas). Assim, apesar dos valores obtidos serem promissores, o processo ainda precisa de ser otimizado a fim de se tornar competitivo. A combinação de diferentes estratégias de produção, como o aumento de escala para biorreator onde é possível controlar de forma mais eficaz algumas condições ambientais (pH, agitação, caudal de arejamento), a operação em modo semi-contínuo, aliada à aplicação de técnicas de remoção do produto, poderá levar a melhorias significativas na produção deste aroma.

3.4. ENSAIOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO EM BIORREATOR

Muitos dos estudos reportados na literatura relativos à produção de 2-Fe são realizados em matraz, no entanto este sistema apresenta algumas limitações, não só devido à escala reduzida, mas também devido à dificuldade de controlar condições de arejamento e pH, parâmetros que tem influência na produção do 2-Fe. O pH para além de influenciar o crescimento celular, também irá ter influência na atividade das enzimas envolvidas na produção de 2-Fe. Já a taxa de arejamento é um fator essencial para o crescimento celular, principalmente no caso de microrganismos aeróbios como é o caso da *Y. lipolytica* [82], [45]. Com o aumento de escala para biorreator torna-se possível controlar estes parâmetros, sendo necessário averiguar quais as condições de arejamento, temperatura e pH ótimas para a produção de 2-Fe consoante o microrganismo utilizado na biotransformação [91].

O aumento de escala na produção de 2-Fe bem como as condições ótimas de produção de 2-Fe já foram reportadas para vários microrganismos. Garavaglia *et al.* [89] reportou o aumento de escala da produção de 2-Fe por *K. marxianus* com otimização de pH, concentração inicial de L-Fe e temperatura. Neste caso a concentração máxima de 0,77 g L⁻¹ de 2-Fe foi obtida a pH 7, 37°C com uma concentração de L-Fe de 3,0 g L⁻¹ [89]. Mu *et al.* [71] descreveu a otimização das condições de

arejamento, pH e temperatura em sistema fechado para uma mistura de culturas de *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *C. tropicalis*, *A. niger*, *S. cerevisiae*, *K. hubeiensis*, *Rhodotorula glutinis* e *P. kudriazevi*. Tendo obtido uma concentração máxima de 2-Fe de 988 mg L⁻¹ a pH 7, 35°C e uma taxa de arejamento de 0,8 wvm [71].

3.4.1. EFEITO DO AREJAMENTO

Em biorreator do tipo tanque agitado, o arejamento do meio depende não só da velocidade de agitação, mas também do caudal de ar injetado. Estes parâmetros tornam-se de extrema importância no aumento de escala da produção de 2-Fe por *Y. lipolytica*, uma vez que esta levedura, sendo aeróbia, depende da percentagem de oxigénio dissolvido no meio para crescer e consequentemente para converter a L-Fe e produzir o aroma pretendido.

Assim, para determinar qual o conjunto de condições de arejamento mais favoráveis para a produção de 2-Fe, foram realizados ensaios de biotransformação em biorreator do tipo tanque agitado com *Y. lipolytica* CH1/5 utilizando o glicerol como fonte de carbono e uma concentração de 4 g L⁻¹ de L-Fe. Nestes ensaios fez-se variar o caudal de arejamento e a velocidade de agitação tendo-se testado as seguintes condições: 600 rpm e 1 L min⁻¹, 600 rpm e 3 L min⁻¹ e 900 rpm e 3 L min⁻¹.

Primeiramente, avaliou-se a influência da velocidade agitação e do caudal de ar no coeficiente volumétrico de transferência de oxigénio, k_La (Tabela 6).

Tabela 6. Valores de k_La experimentais determinados para diferentes condições de agitação (600 e 900 rpm) e caudal de ar (1 e 3 L min⁻¹). Os valores apresentados representam a média de 2 ensaios independentes $\pm$ desvio padrão. Valores seguidos da mesma letra não representam diferenças estatisticamente significativas entre eles ($p \leq 0,05$) por análise de t-test.

Caudal de ar (L min ⁻¹)	Velocidade de agitação (rpm)	Taxa de transferência de oxigénio (h ⁻¹)
1	600	86,6 $\pm$ 0,1 ^a
3	600	89,1 $\pm$ 0,3 ^b
3	900	124 $\pm$ 2 ^c

Como é possível observar, ao manter a velocidade de agitação e aumentar o caudal de ar de 1 para 3 L min⁻¹ verifica-se um aumento de 1,03 vezes no valor de k_La . No entanto, mantendo o caudal de ar e aumentando a velocidade de agitação, de 600 para 900 rpm, observou-se um aumento foi de 1,39 vezes no valor de k_La . Estes resultados permitem concluir que para a gama de condições testadas a agitação é o parâmetro que tem maior impacto no aumento do k_La , tal como descrito por Gómez Dias *et al.* [118].

Alguns valores de k_La já foram reportados para várias condições de arejamento no mesmo biorreator por Ferreira *et al.* [119]. Neste estudo foram testados vários valores de agitação bem como de caudal de ar, tendo-se verificado também um aumento do k_La com o aumento da agitação e do caudal de ar. Para a condição de 600 rpm e 3 L min⁻¹, também estudado no presente trabalho, foi obtido um valor de k_La de 125 ± 15 h⁻¹, um valor consideravelmente mais alto relativamente ao obtido devido ao volume de água superior ao utilizado neste ensaio [119].

Após determinado o valor de k_La para as condições de arejamento em estudo, foram realizados ensaios de bioconversão de L-Fe para os diferentes valores de k_La determinados de modo a determinar qual o conjunto de condições mais favoráveis para a produção de 2-Fe. Os valores obtidos para o crescimento celular, consumo de glicerol e L-Fe e a produção de 2-Fe estão representados na Figura 10.

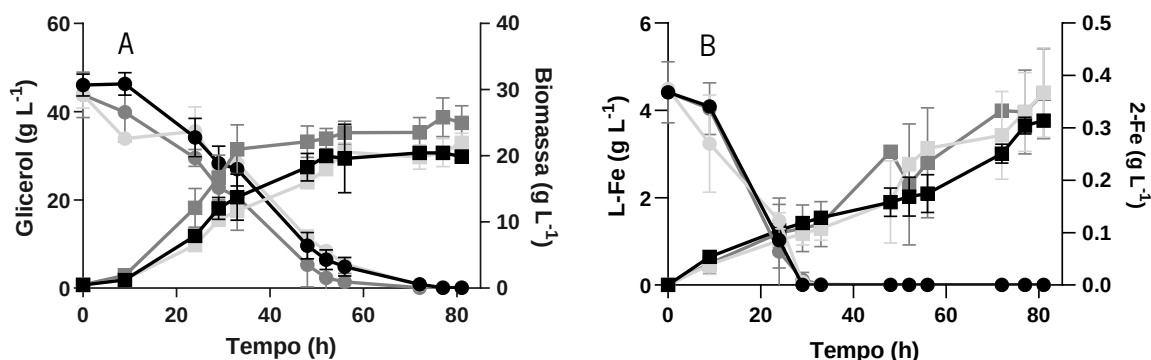


Figura 10. Crescimento celular (□), consumo de glicerol bruto (○) (A), consumo de L-Fe (○) e produção de 2-Fe (□) (B) por *Y. lipolytica* CH1/5 em biorreator com uma concentração inicial de L-Fe, 5 g L⁻¹, para os ensaios a 600 rpm e 1 L min⁻¹ (pretor), 600 rpm e 3 L min⁻¹ de ar (cinzento) e 900 rpm e 3 L min⁻¹ de ar (cinzento claro). Os valores apresentados representam a média de 2 ensaios independentes $\pm$ desvio padrão.

Como é possível observar, o crescimento celular é semelhante nos três casos em estudo tendo sido obtida uma concentração de biomassa máxima de cerca de 20 g L⁻¹. No entanto, quando usada uma agitação de 600 rpm e um caudal de ar de 3 L min⁻¹ foi atingida a fase estacionária mais rapidamente (cerca de 15 horas). Relativamente ao consumo da fonte de carbono e do precursor pode-

se verificar que estes foram totalmente consumidos ao fim de 77 e 29 horas, respetivamente, nos três casos em estudo.

Comparando o perfil de crescimento destes ensaios com os ensaios realizados em matraz, para além de se obter uma concentração de biomassa máxima 3 vezes superior verifica-se ainda que esta concentração é alcançada em menos 87 horas. Este crescimento superior pode ser justificado pela limitação da percentagem de oxigénio dissolvido no meio dos ensaios em matraz uma vez que não é injetado ar e a agitação utilizada é apenas de 200 rpm. O mesmo se verifica quando se compara o perfil de consumo de precursor em ambos os casos, observando-se um consumo 7 vezes mais rápido nos ensaios em biorreator. Esta diferença verificada no perfil do consumo do precursor pode ser uma consequência do crescimento mais acentuado que se observou. Assim, uma vez que a L-Fe é a única fonte de azoto disponível no meio, esta também vai ser utilizada para o crescimento celular, observando-se um consumo mais rápido [4].

No que diz respeito à concentração de 2-Fe, à produtividade e ao rendimento (Tabela 7), não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre as três condições em estudo. Contudo, quando comparada a produção obtida nestes ensaios com os ensaios realizados em matraz, observou-se uma diminuição de 6 vezes na concentração de 2-Fe. Esta redução pode ser explicada pelo rápido consumo do precursor nas primeiras horas de ensaio, possivelmente para o crescimento celular em detrimento da produção de 2-Fe [4]. Relativamente ao rendimento, verificou-se uma diminuição na mesma razão, devido à diminuição da produção de 2-Fe. Já para a produtividade, visto que depende também do tempo que durou a biotransformação, não se observou uma diminuição tão acentuada (cerca de 2,4 vezes) devido ao prolongamento dos ensaios em matraz.

Tabela 7. Concentração de 2-Fe, rendimento e produtividade ao fim de 81 horas de ensaio em reator por *Y. lipolytica*, CH1/5 utilizando diferentes condições de agitação e caudal de ar, 600 rpm e 1 L min⁻¹, 600 rpm e 3 L min⁻¹ e 900 rpm e 3 L min⁻¹. Os valores apresentados representam a média de 2 ensaios independentes. Valores seguidos da mesma letra não representam diferenças estatisticamente significativas entre eles ($p \leq 0,05$) por análise de t-test.

Condições de arejamento	Concentração de 2-Fe (g L⁻¹)	Rendimento mássico (2-Fe L-Fe⁻¹)	Produtividade (mg L⁻¹ h⁻¹)
600 rpm 1 L min⁻¹	0,314 ± 0,005 ^a	0,069 ± 0,002 ^a	3,87 ± 0,07 ^a
600 rpm 3 L min⁻¹	0,37 ± 0,06 ^a	0,08 ± 0,01 ^a	4,5 ± 0,7 ^a
900 rpm 3 L min⁻¹	0,37 ± 0,06 ^a	0,082 ± 0,004 ^a	4,5 ± 0,7 ^a

Mu *et al.* [71] estudou o efeito da taxa de arejamento na produção de 2-Fe por uma mistura de culturas de *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *C. tropicalis*, *A. niger*, *S. cerevisiae*, *K. hubeiensis*, *R. glutinis* e *P. kudriazevi*, tendo feito variar a taxa de arejamento entre 0,2 e 1 vvm, tendo verificando que para uma taxa de arejamento de 0,8 vvm obteve a concentração de biomassa máxima (10,3 g L⁻¹) mas também a produção de 2-Fe máxima (998 mg L⁻¹). Já para a taxa de arejamento mais baixa (0,2 vvm) foram obtidas as concentrações de biomassa (6,3 g L⁻¹) e de 2-Fe (500,5 mg L⁻¹) mais baixas, devido à limitação de oxigénio no meio [71].

A *Y. lipolytica* é uma levedura dimórfica, apresentando a forma de hifa quando se encontra em condições adversas. A morfologia da levedura é afetada por diversos fatores, como a fonte de carbono e azoto, as condições de pH e também a percentagem de oxigénio dissolvido no meio [120], [121]. Analisando a morfologia das células durante os ensaios anteriores (Figura 11) é possível verificar uma maior quantidade de hifas no ensaio cuja velocidade de agitação e o caudal de ar foram mais elevados (Figura 11C). É ainda possível observar que com o aumento da agitação (de 600 para 900 rpm) há um aumento da quantidade de hifas (Figura 11B e 11C). O mesmo se verifica para o aumento do caudal de ar (de 1 para 3 L min⁻¹) (Figura 11A e 11B), podendo-se concluir que para a menor velocidade de agitação e caudal de ar se observam menos hifas no meio. Resultados semelhantes foram obtidos por Braga *et al.* [122] que comparou a morfologia das células de *Y. lipolytica* durante a produção de γ -decalactona em biorreator de tanque agitado e em reator *air lift*, também neste caso foi possível observar uma maior percentagem de hifas quando é provocado um maior stress hidrodinâmico [122].



Figura 11. Morfologia de *Yarrowia lipolytica* CH1/5 durante ensaios de biotransformação de L-Fe em biorreator ao fim de 81 horas de ensaio com uma velocidade de agitação e caudal de ar de 600 rpm e 1 L min⁻¹ (A), 600 rpm e 3 L min⁻¹ de ar (B) e 900 rpm e 3 L min⁻¹ de ar (C).

Uma vez que a concentração de 2-Fe obtida para as três condições em estudo não apresentou diferenças estatisticamente significativas, selecionou-se a condição de 600 rpm e 1 L min⁻¹ de caudal de ar, uma vez que apresenta ser a condição que causa menor stress hidrodinâmico às células [121].

3.4.2. EFEITO DO pH

Estudos anteriores, revelaram que o pH do meio influencia a produção de 2-Fe uma vez que a ação do pH regula a expressão das enzimas envolvidas na produção de 2-Fe [84]. Assim torna-se relevante estudar e determinar qual o pH ótimo para a produção deste álcool. Para tal, foram realizados ensaios de biotransformação a pH 5,5, 6,5 e 7,5, com uma velocidade de agitação de 600 rpm e um caudal de ar de 1 L min⁻¹.

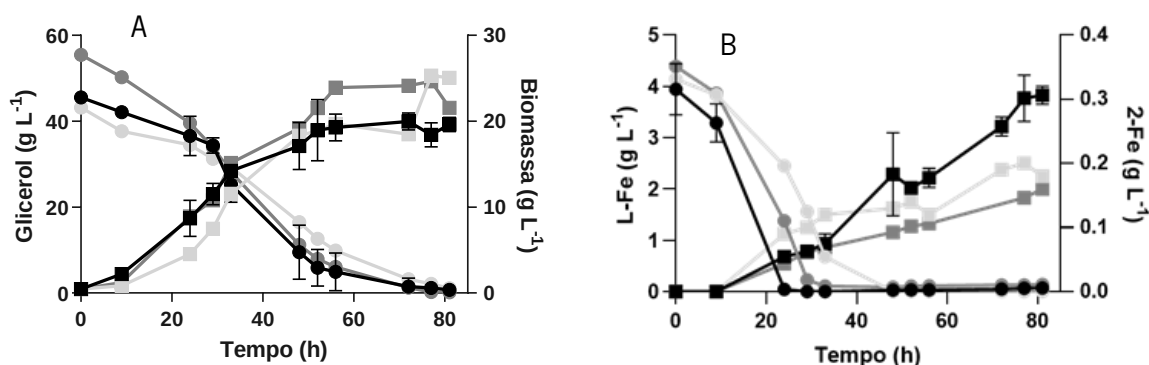


Figura 12. Crescimento celular (□), consumo de glicerol bruto (○) (A), consumo de L-Fe (○) e produção de 2-Fe (□) (B) por *Y. lipolytica* CH1/5 em biorreator com 45 g L⁻¹ de glicerol bruto, suplementado com 4 g L⁻¹ de L-Fe, fazendo-se variar o pH do meio, tendo sido testados valores de 5,5 (preto), 6,5 (cinzento), e 7,5 (cinzento claro). Os valores apresentados para a condição de pH 5,5 representam a média de 2 ensaios independentes ± desvio padrão.

Como é possível observar na Figura 12, o crescimento celular foi ligeiramente superior a pH 6,5 tendo-se atingido uma concentração máxima de biomassa de cerca de 19 g L⁻¹ às 56 horas de ensaio, não se verificando uma diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado com o crescimento sem controlo de pH. Relativamente ao consumo da fonte de carbono pode-se verificar que esta foi totalmente consumida ao fim de 77 horas nos 3 casos em estudo, o que também se observou no ensaio sem controlo de pH. No que diz respeito ao consumo do precursor, verificou-se que este também foi consumido de forma semelhante nos 3 casos, não sendo detetada L-Fe no meio ao fim de 48 horas, demorando mais 9 horas quando comparado com o ensaio sem controlo de pH.

No que diz respeito à concentração de 2-Fe, à produtividade e ao rendimento (Tabela 8), quando comparado o ensaio a pH 5,5 com o ensaio a pH 6,5, observou-se uma diminuição da concentração de 2-Fe de 1,7 vezes. Com o aumento do pH para 7,5 verificou-se uma diminuição da concentração de 2-Fe de 2 vezes em relação ao pH mais baixo. A diminuição da concentração de 2-Fe obtida com o aumento do pH resultou também numa diminuição na mesma razão do rendimento e da produtividade. Comparando os resultados do ensaio a pH 5,5 com os obtidos no ensaio sem controlo de pH não verificaram diferenças significativas ($p < 0,05$).

Comparativamente aos ensaios realizados em matraz, de forma semelhante ao ensaio sem controlo de pH, observou-se uma diminuição significativa da produção de 2-Fe, como já referido anteriormente, explicada pela utilização do precursor para o crescimento em detrimento da produção de 2-Fe [4].

Tabela 8. Concentração de 2-Fe, rendimento e produtividade ao fim de 81 horas de ensaio em reator por *Y. lipolytica*, CH1/5 utilizando diferentes condições pH, 5,5, 6,5 e 7,5. Os valores apresentados para a condição de pH 5,5 representam a média de 2 ensaios independentes $\pm$ desvio padrão.

pH	Concentração de 2-Fe (g L ⁻¹)	Rendimento mássico (2-Fe L-Fe ⁻¹)	Produtividade (mg L ⁻¹ h ⁻¹)
5,5	0,31 $\pm$ 0,01	0,078 $\pm$ 0,009	3,8 $\pm$ 0,1
6,5	0,185	0,044	2,28
7,5	0,152	0,037	1,87

O efeito do pH na produção de 2-Fe já foi estudado em vários microrganismos [40]. Huang *et al.* [83] reportou a otimização do pH inicial na produção de 2-Fe por *P. fermentans* L-5, tendo demonstrado que, para valores de pH entre 4 e 8,5 a concentração de 2-Fe obtida variou entre 0,77 e 0,80 g L⁻¹, no entanto para valores de pH mais altos a produção pode ser totalmente inibida [83]. Chantasuban *et al.* [91] estudou o efeito do pH na produção de 2-Fe por *M. pulcherrima*, neste caso observaram-se concentrações mais elevadas de 2-Fe quando o pH é mantido a 4, tendo produzido cerca de 1 g L⁻¹ deste álcool superior [91]. Já Mu *et al.* [71] reportou o pH ótimo para a produção de 2-Fe utilizando uma mistura de culturas microbianas. Neste caso com o aumento do pH de 4 para 8 verificou-se um decréscimo da biomassa, no entanto observou-se um aumento de 43% da produção de 2-Fe para 741,1 mg L⁻¹ [71].

Após determinadas as condições ótimas para o pH e arejamento para a produção deste álcool superior, foi realizado um novo ensaio em biorreator em que a duração do mesmo foi prolongada (Figura 13) de modo a comparar os resultados obtidos em biorreator com os ensaios já descritos em matraz. Assim pretendia-se verificar se as baixas concentrações de 2-Fe obtidas em biorreator poderiam estar relacionadas com o facto de o ensaio ter uma duração mais curta e a conversão de algum dos intermediários da via de Ehrlich em 2-Fe não ser completa.

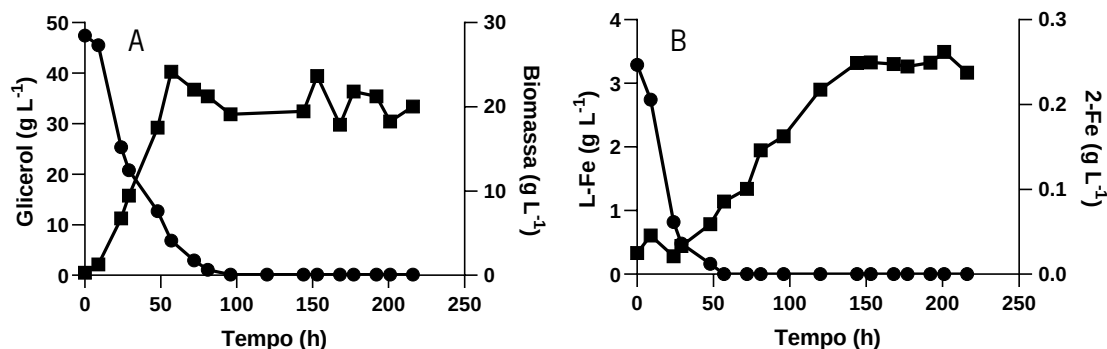


Figura 13. Crescimento celular ($\square$), consumo de glicérol bruto ($\circ$) (A), consumo de L-Fe ($\circ$) e produção de 2-Fe ($\square$) (B) por *Y. lipolytica* CH1/5 em biorreator com 45 g L^{-1} de glicérol bruto, uma concentração inicial de L-Fe, 4 g L^{-1} , tendo sido utilizada uma agitação de 600 rpm e 1 L min^{-1} sem controlo de pH.

Comparando a concentração de 2-Fe (Tabela 9) obtida neste ensaio é possível verificar que esta é 8,3 vezes menor do que a atingida em matraz ao fim das 216 horas. Relativamente ao rendimento, este demonstrou ser 5,9 vezes menor no ensaio em biorreator. Para a produtividade foi observada uma diminuição na mesma proporção que a redução da concentração de 2-Fe.

Como já foi discutido anteriormente, a concentração de 2-Fe reduzida obtida em biorreator comparativamente com os resultados obtidos em matraz pode ser explicada pelo facto da L-Fe ser a única fonte de azoto disponível no meio. Dado o crescimento celular consideravelmente elevado nos ensaios em biorreator, é possível que este aminoácido esteja a ser utilizado para o crescimento celular pela via do cinamato onde é degradado e integrará posteriormente o ciclo do ácido cítrico, ficando indisponível para entrar na via de Ehrlich e produzir 2-Fe [14].

Tabela 9. Concentração de biomassa, concentração de 2-Fe, rendimento e produtividade ao fim de 216 horas de ensaio em reator e matraz por *Y. lipolytica*, CH1/5. Em reator, foi utilizada uma agitação de 600 rpm e 1 L min^{-1} sem controlo de pH. Os valores apresentados para o ensaio em matraz representam a média de 2 ensaios independentes $\pm$ desvio padrão.

Ensaio	Concentração de biomassa (g L^{-1})	Concentração de 2-Fe (g L^{-1})	Rendimento mássico (2-Fe L-Fe^{-1})	Produtividade ($\text{mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$)
Matraz	$8,9 \pm 0,9$	$2,0 \pm 0,1$	$0,41 \pm 0,01$	$9,2 \pm 0,5$
Biorreator	24,2	0,24	0,07	1,1

3.4.3. ENSAIOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO EM MODO SEMI-CONTÍNUO

Como foi possível observar, as concentrações obtidas em biorreator ainda são muito reduzidas não só quando comparadas com os ensaios em matraz, mas também comparativamente a ensaios já descritos na literatura [44], [89]. Assim torna-se necessário o estudo de diferentes estratégias de produção de forma a aumentar a concentração deste aroma. Como já foi referido, esta diferença nas concentrações de 2-Fe obtidas nos ensaios em matraz e em biorreator deve-se ao crescimento celular mais acentuado verificado nos ensaios em biorreator. Assim a L-Fe, precursor do 2-Fe mais também fonte de azoto, vai ser consumido pela via do cinamato, não integrando a via de Ehrlich, que levaria à produção de 2-Fe [14]. Assim, decidiu-se estudar a produção de 2-Fe em modo semi-contínuo com a adição de pulsos de L-Fe, de modo a fornecer novamente precursor e verificar se este integra a via de Ehrlich.

Para além desta questão da utilização do precursor para o crescimento celular, a adição de pulsos apresenta diversas vantagens nomeadamente no que diz respeito à inibição e consumo do precursor. Como já foi referido, elevadas concentrações de L-Fe podem inibir não só o crescimento celular, mas também inibem os transportadores deste aminoácido. Assim, com a adição de pulsos pode-se garantir concentrações de L-Fe totais superiores sem se observar o efeito inibitório uma vez que, quando é feita a adição da L-Fe a sua concentração no meio é baixa evitando assim o efeito inibitório [116].

Assim, foram testadas duas estratégias de produção em modo semi-contínuo, nas quais foi comparada a adição de um pulso 4 g L⁻¹ de L-Fe às 24 horas e às 81 horas, sendo em ambos os casos utilizada uma concentração inicial de L-Fe de 4 g L⁻¹ na fase descontínua. Os valores obtidos para o crescimento celular, consumo de glicerol e L-Fe e a produção de 2-Fe estão representados na Figura 14.

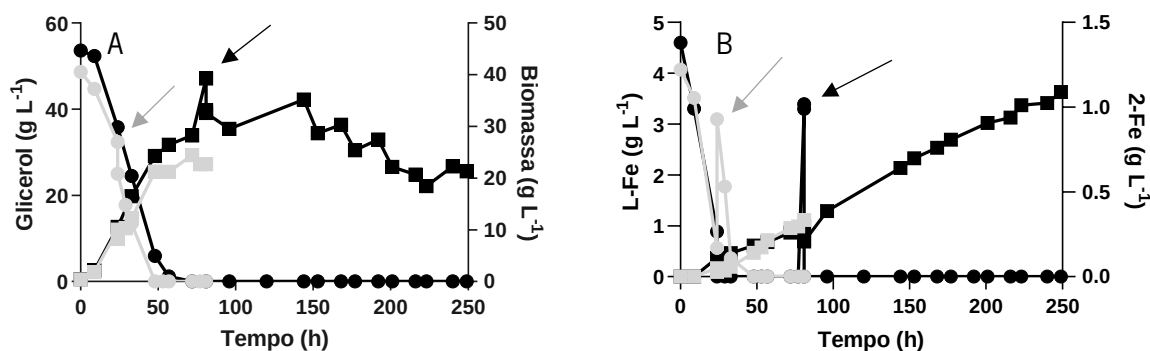


Figura 14. Crescimento celular (□), consumo de glicerol bruto (○) (A), consumo de L-Fe (○) e produção de 2-Fe (□) (B) por *Y. lipolytica* CH1/5 em biorreator com uma concentração inicial de L-Fe, 4 g L⁻¹, tendo sido dado um pulso de 4 g L⁻¹ de L-Fe, 24 horas (a cinzento) e 81 horas (a preto) após o início do ensaio. As setas representam o momento da adição do pulso de L-Fe.

Pela análise da Figura 14A, é possível verificar que o perfil de crescimento da levedura é semelhante em ambos os ensaios, no entanto observa-se um crescimento celular elevado às 81 horas no ensaio em que o pulso é adicionado mais tarde. Quanto ao consumo da fonte de carbono, verifica-se que esta é totalmente consumida ao fim de 48 horas no ensaio cujo pulso é adicionado às 24 horas, já quando a L-Fe é adicionada mais tarde, a fonte de carbono apenas é totalmente consumida ao fim de 77 horas. Relativamente ao consumo do precursor verificou-se que ao fim de 24 horas, quando adicionado o pulso de L-Fe, apenas se encontram 0,5 g L⁻¹ aminoácido no meio, verifica-se também que o perfil de consumo do pulso é semelhante não se encontrando precursor no meio ao fim de 48 horas. Quando o pulso é adicionado apenas às 81 horas, a concentração inicial de L-Fe demora 29 horas a ser consumida na sua totalidade, já o pulso demora apenas 24 horas a ser consumido.

Em relação à concentração de 2-Fe, rendimento e produtividade (Tabela 10), obteve-se uma concentração de 2-Fe 2 vezes superior quando adicionado o pulso de L-Fe às 81 horas comparativamente aquando a adição é feita às 24 horas. Como é possível observar na Figura 15, quando adicionado o pulso de L-Fe às 24 horas, não é atingida a fase estacionária, o que indica que ao adicionar o precursor às 24 horas, este vai ser maioritariamente utilizado para o crescimento celular e não para a produção de 2-Fe. Já quando o precursor é adicionado ao meio apenas às 81 horas, a fase estacionária já foi atingida, o que indica uma maior disponibilidade da L-Fe integrar a via de Ehrlich e produzir 2-Fe. Comparando os valores de rendimento obtidos nestes ensaios, observou-se também um aumento de 1,6 vezes do rendimento obtido, consequência do aumento da concentração de 2-Fe. No entanto é visível uma diminuição de 1,4 vezes da produtividade uma vez que o ensaio cujo pulso foi adicionado às 81 horas foi prolongado 168 horas. Assim, e apesar de se verificar uma diminuição da produtividade, a adição de pulso após 81 horas do início do ensaio mostrou ser a estratégia de produção mais vantajosa.

Tabela 10. Concentração de 2-Fe, rendimento e produtividade nos ensaios de biotransformação por *Y. lipolytica* CH1/5 com a adição de um pulso de 4 g L⁻¹ de L-Fe ao fim de 24 e 81 horas de ensaio.

Adição do pulso	Concentração de 2-Fe (g L⁻¹)	Rendimento mássico (2-Fe L-Fe⁻¹)	Produtividade (mg L⁻¹ h⁻¹)
24	0,54	0,087	6,63
81	1,09	0,14	4,37

Comparando o ensaio com a adição de pulso às 24 horas com os ensaios em matraz, não se verifica nenhuma melhoria relativamente na concentração de 2-Fe sendo esta 3,7 vezes inferior, para além do consumo do precursor para o crescimento celular, esta diferença também pode ser causada pelo facto do ensaio ter uma duração mais curta, impedindo que a L-Fe complete a via de Ehrlich, podendo estar na forma de um dos intermediários do 2-Fe [14]. Relativamente ao rendimento, a diferença foi ainda mais acentuada, cerca de 4,7 vezes, também devido à diferença da concentração de L-Fe total utilizada em ambos os ensaios. Quanto à produtividade a diminuição foi menor (1,3 vezes) uma vez que o ensaio em matraz foi realizado durante mais tempo. Quando comparado este ensaio com os ensaios em biorreator em sistema fechado, observa-se uma ligeira melhoria da concentração de 2-Fe sendo esta 1,7 vezes superior. O mesmo aumento foi observado na produtividade, já para o rendimento o aumento não foi significativo, devido também ao aumento da concentração total de L-Fe.

Quando comparado os resultados obtidos no ensaio cujo pulso é adicionado às 81 horas com os resultados em sistema fechado observou-se um aumento de 3,5 vezes na concentração de 2-Fe produzida, no entanto a concentração do aroma obtido continua a ser 2 vezes inferior à concentração conseguida nos ensaios em matraz. Tal como foi discutido anteriormente, uma das limitações dos ensaios em biorreator, é a utilização do precursor como fonte de azoto, que, ao ser utilizado para o crescimento celular, vai ser consumido muito mais rapidamente, provocando um crescimento celular mais elevado e a produção de 2-Fe mais reduzida [4].

Esta estratégia de produção de 2-Fe com a adição de pulsos de L-Fe, já foi reportada por Wang *et al.* [87] com *S. cerevisiae* R-UV3 com a utilização de pulsos de 2,5 g L⁻¹ de L-Fe, 17 horas após o início do ensaio. Neste caso obteve-se uma concentração de 2-Fe de 4,38 g L⁻¹ e uma produtividade de 0,31 g L⁻¹ h⁻¹, em sistema fechado foi obtida uma concentração de 2-Fe de 2,8 g L⁻¹ e uma produtividade de 0,12 g L⁻¹ h⁻¹, o que representa uma melhoria de 1,6 e 2,6 vezes, respetivamente [87].

Uma vez que nos ensaios em sistema semi-contínuo, tanto a L-Fe adicionada no início do ensaio como a acrescentada nos pulsos, foi rapidamente consumida decidiu-se testar o aumento da concentração inicial de L-Fe em biorreator. Apesar deste estudo já ter sido apresentado em matraz, e de não ter sido consumido todo o precursor, provocando ainda uma diminuição da concentração de 2-Fe produzida, espera-se que os resultados em biorreator não sejam semelhantes, uma vez que as células aparentam necessitar de uma maior concentração de L-Fe para satisfazer as suas necessidades de crescimento. Assim, realizou-se um ensaio em biorreator com uma concentração de L-Fe de 12 g L⁻¹

¹. Os valores obtidos para o crescimento celular, consumo de glicerol e L-Fe e a produção de 2-Fe estão representados na Figura 15.

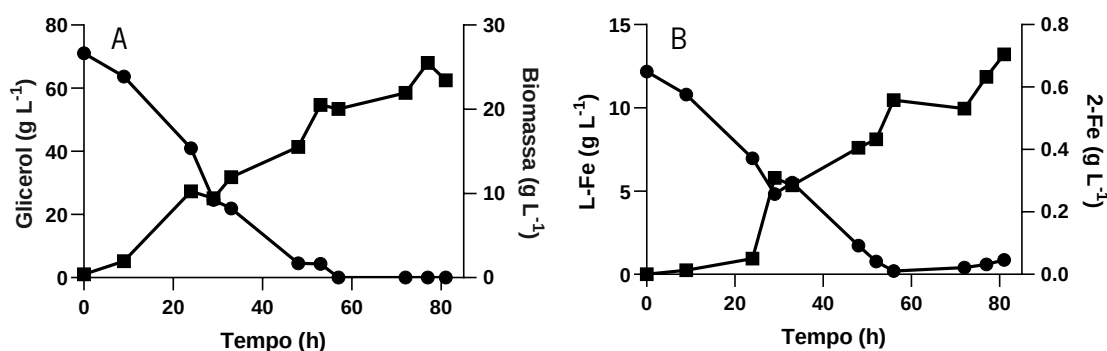


Figura 15. Crescimento celular (□), consumo de glicerol bruto (○) (A), consumo de L-Fe (○) e produção de 2-Fe (□) (B) por *Y. lipolytica* CH1/5 em biorreator com uma concentração inicial de L-Fe, 12 g L⁻¹.

Neste ensaio observou-se uma concentração de biomassa máxima de cerca de 25 g L⁻¹, verificando-se que a fonte de carbono foi totalmente consumida ao fim de 57 horas, um consumo cerca de 24 horas mais rápido que no ensaio cuja concentração inicial de L-Fe foi apenas de 4 g L⁻¹. Relativamente ao precursor, não foi totalmente consumido, tendo sido observado um decréscimo acentuado até às 57 horas encontrando-se 0,2 g L⁻¹ de L-Fe no meio. Neste caso, o consumo demonstrou ser mais lento 33 horas devido também à maior quantidade de L-Fe no meio. No entanto, quando comparado este ensaio com o ensaio realizado em matraz com uma concentração de L-Fe inicial de 6 g L⁻¹ observou-se um consumo mais acentuado, como seria de esperar, tendo sido consumido 98,4% do aminoácido presente no meio.

Relativamente à concentração de 2-Fe foram obtidas 0,87 g L⁻¹ de 2-Fe, o que comparativamente ao ensaio em sistema fechado cuja concentração inicial de L-Fe foi de 4 g L⁻¹, corresponde a um aumento de 2,26 vezes. Já para o rendimento foi obtido um valor de 0,06 (2-Fe L-Fe⁻¹) e de 8,7 (mg L⁻¹ h⁻¹) para a produtividade. De forma semelhante, o aumento da concentração inicial de precursor em biorreator foi reportada por Lu *et al.* [44] na bioconversão de L-Fe por *C. glycerinogenes* WL2002-5. Neste estudo foram testadas concentrações de L-Fe de 3, 5, 7, 9 e 11 g L⁻¹, observando-se um aumento da produção de 2-Fe até às 7 g L⁻¹ de L-Fe. Neste caso, foi obtida uma concentração máxima de 2-Fe de cerca de 3,3 g L⁻¹ de 2-Fe. A utilização de concentrações de L-Fe superiores a 7 g L⁻¹ não apresentou melhorias na produção de 2-Fe [44].

Comparando a produtividade obtida neste ensaio com a produtividade do ensaio cuja concentração inicial de L-Fe foi de 4 g L⁻¹ verificou-se um aumento de 3,8 para 8,7 mg L⁻¹ h⁻¹ (2,3 vezes). Já no rendimento apenas se verificou uma diferença de 1,3 vezes. Visto que foi observado um

consumo praticamente total do precursor e uma melhoria na produção de 2-Fe comparativamente com os ensaios com uma concentração inicial de L-Fe de 4 g L⁻¹, optou-se por dar continuidade ao estudo da produção de 2-Fe em modo semi-contínuo com uma concentração inicial de L-Fe mais elevada. Assim, foram realizados dois ensaios em biorreator cuja concentração inicial de L-Fe foi de 8 g L⁻¹ com a adição de um pulso de 4 e 8 g L⁻¹ de L-Fe às 81 horas. Os valores obtidos para o crescimento celular, consumo de glicerol e L-Fe e a produção de L-Fe estão representados na Figura 16.

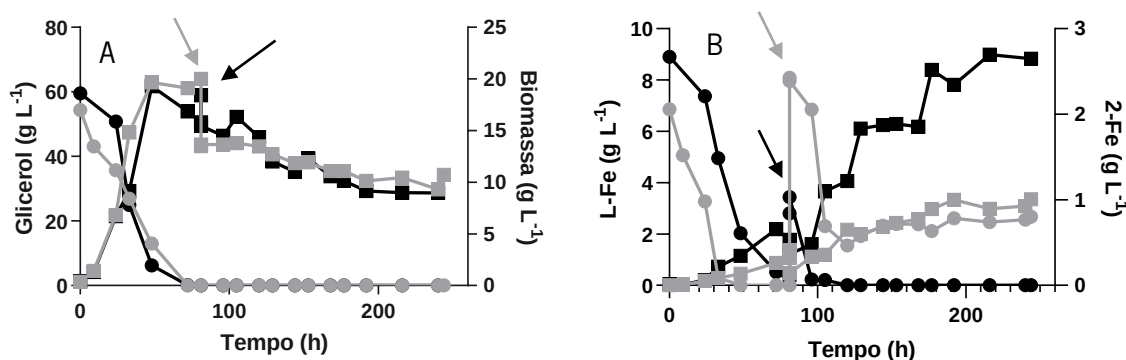


Figura 16. Crescimento celular (□), consumo de glicerol bruto (○) (A), consumo de L-Fe (□) e produção de 2-Fe (○) (B) por *Y. lipolytica* CH1/5 em biorreator com uma concentração inicial de L-Fe, 8 g L⁻¹, tendo sido dado um pulso de 8 g L⁻¹ (a cinzento) e 4 g L⁻¹ (a preto) de L-Fe, 81 horas após o início do ensaio. As setas representam o momento da adição do pulso de L-Fe.

Relativamente ao crescimento celular verificou-se que valor máximo foi cerca de 20 g L⁻¹ às 58 horas de ensaio para ambos os casos, sendo que às 72 horas já não se encontrava fonte de carbono no meio. Em relação ao precursor, este foi totalmente consumido ao fim de cerca de 65 horas. Relativamente ao consumo da L-Fe adicionada nos pulsos, verificou-se que o pulso de 8 g L⁻¹ não foi totalmente consumido. Neste caso observou-se um consumo acentuado do precursor entre as 96 e as 105 horas, sendo que a partir deste ponto, a concentração de L-Fe estabilizou até ao fim do ensaio onde foram detetadas cerca de 2 g L⁻¹ de L-Fe no meio. O mesmo não se verificou com o ensaio cujo pulso de L-Fe foi de 4 g L⁻¹. Neste caso o precursor foi consumido na sua totalidade ao fim de 24 horas.

Relativamente à concentração de 2-Fe, rendimento e produtividade (Tabela 11) pode-se observar um aumento de 2,65 vezes quando o pulso adicionado tem uma concentração de 4 g L⁻¹. O mesmo aumento verificou-se na produtividade. No que diz respeito ao rendimento verificou-se um aumento de 4 vezes comparativamente com o ensaio com a adição de 8 g L⁻¹ de L-Fe. Assim, uma concentração inicial de L-Fe mais elevada, garante a fonte de azoto necessária ao crescimento celular e também precursor que será convertido em 2-Fe pela via de Ehrlich. Com a adição de um pulso mais reduzido de L-Fe a levedura é capaz de consumir o aminoácido e dar continuidade à biotransformação. Já quando o pulso é mais elevado, 66,7% da L-Fe entra no meio intracelular no entanto observa-se uma

possível inibição pelo substrato da via de produção do 2-Fe [14], [116]. Dado estes resultados, verificou-se ser mais vantajoso fazer ensaios com uma concentração inicial de L-Fe mais elevado e, posteriormente, adicionar pulsos ao longo do ensaio com concentrações mais baixas.

Tabela 11. Concentração de 2-Fe, rendimento e produtividade obtidos ao fim de 249 horas no ensaio de biotransformação por *Y. lipolytica* CH1/5 com uma concentração inicial de L-Fe de 8 g L⁻¹ com a adição de um pulso de 8 e 4 g L⁻¹ de L-Fe.

Concentração inicial de L-Fe	Pulso de L-Fe	Concentração de 2-Fe (g L ⁻¹)	Rendimento mássico (2-Fe L-Fe ⁻¹)	Produtividade (mg L ⁻¹ h ⁻¹)
8 g L⁻¹	8 g L ⁻¹	1,0	0,05	4,13
	4 g L ⁻¹	2,65	0,20	10,6

Comparando o ensaio em semi-contínuo com a adição de 4 g L⁻¹ de L-Fe com o ensaio em sistema descontínuo, observou-se um aumento da concentração de 2-Fe de 8,5 vezes. Comparativamente com os ensaios em matraz também se verificou um aumento de cerca de 1,3 vezes desta concentração. A produção de 2-Fe em modo semi-contínuo já foi descrita na literatura utilizando vários microrganismos, Martínez *et al.* [123] reportou a produção de 2-Fe por *K. marxianus* utilizando bagaço de cana-de-açúcar com suplemento de L-Fe, neste estudo utilizou uma estratégia de alimentação semi-contínua com a adição de dois pulsos de 100 g de L-Fe. Comparativamente ao ensaio em sistema descontínuo, onde foram adicionados 300 g de L-Fe no início do ensaio, verificou-se um aumento de 11,6% na produção de 2-Fe [123].

4. CONCLUSÕES

A biotransformação da L-Fe em 2-Fe por microrganismos é uma forma vantajosa de produzir este álcool superior, além de serem considerados compostos naturais também é uma forma de valorizar subprodutos de várias indústrias como é o caso do glicerol. Assim, é essencial estudar a produção deste composto por via biotecnológica de forma a melhorar as concentrações já obtidas para que processo seja competitivo e aplicável à escala industrial.

Este trabalho permitiu o desenvolvimento de uma estratégia de produção de 2-Fe pela biotransformação de L-Fe por *Y. lipolytica*. Inicialmente estudou-se o efeito inibitório deste álcool superior em duas estirpes desta levedura, a W29 e a CH1/5. Observou-se que, concentrações iguais ou superiores a 2 g L⁻¹ inibem totalmente o crescimento celular em ambos os casos.

Após o estudo do efeito inibitório do 2-Fe, foi estudada a capacidade de ambas as estirpes produzirem 2-Fe pela via *de novo* síntese, usando glucose como fonte de carbono, tendo sido possível verificar que ambas as estirpes foram capazes de produzir este aroma sem suplementação da L-Fe.

Validada a capacidade destas estirpes produzirem 2-Fe pela via *de novo* síntese, foram realizados ensaios em matraz, usando glucose como fonte de carbono e L-Fe como única fonte de azoto. Nestes ensaios foi obtida uma concentração máxima de 2-Fe de 1 g L⁻¹, não se tendo verificado diferenças estatisticamente significativas no que diz respeito às concentrações de 2-Fe obtidas para as duas estirpes. Assim, selecionou-se a estirpe CH1/5 para os ensaios seguintes, uma vez que esta estirpe não se encontra tão explorada como a W29. Comprovou-se ainda que o glicerol poderia ser utilizado como fonte de carbono alternativa neste processo permitindo obter concentrações de 2-Fe semelhantes às obtidas com glucose.

De forma a estudar o efeito da concentração inicial de L-Fe, foram feitos dois ensaios com 4 e 6 g L⁻¹ de L-Fe, e foi possível verificar que o aumento da concentração do precursor diminuiu a concentração de 2-Fe, assim como o rendimento e a produtividade.

Após selecionada a fonte de carbono e a concentração de precursor a utilizar, foram realizados ensaio com remoção *in situ* do produto utilizando como fase adsorvente a resina XAD-4, e tal como era esperado, a utilização de uma técnica ISPR permitiu aumentar em 1,3 vezes o rendimento de 2-Fe em relação ao ensaio sem resina, apesar de não serem observadas diferenças estatisticamente significativas entre a concentração máxima de 2-Fe obtida assim como da produtividade.

O efeito da taxa de transferência de oxigênio e do pH na produção de 2-Fe foi ainda estudada em biorreator. Para valores de k_La superiores (89,1 e 124) foi possível observar uma transição dimórfica da levedura para a forma de hifa. Além disso, as concentrações de 2-Fe não apresentaram diferenças estatisticamente significativas para a gama de taxas de transferência de oxigênio estudadas. Observou-se ainda que um ambiente mais ácido (pH 5,5) teve um efeito positivo na produção de 2-Fe, uma vez que foi obtida uma concentração de 2-Fe superior ($0,31 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$) nos ensaios realizados a pH 5,5 quando comparado com as concentrações obtidas a pH 7,5 ($0,152 \text{ g L}^{-1}$). Esses resultados demonstraram que a concentração e o rendimento máximos de 2-Fe foram obtidos a pH 5,5, com uma agitação de 600 rpm e um caudal de ar de 1 L min^{-1} . O aumento de escala para biorreator também permitiu aumentar a produtividade do processo. De forma a tentar aumentar a produção deste álcool, superior foram também realizados ensaios em modo semi-contínuo por pulsos. Inicialmente realizaram-se dois ensaios nos quais foi adicionado um pulso de 4 g L^{-1} de L-Fe 24 e 81 horas após o início do ensaio, tendo-se verificado que a adição de L-Fe depois de atingido o estado estacionário (às 81 h) era mais vantajosa. Avaliou-se ainda o efeito do aumento da concentração de L-Fe na fase descontínua, tendo-se observado que o aumento da concentração de L-Fe de 4 para 12 g L^{-1} permitiu aumentar a concentração de 2-Fe de $0,31$ para $0,70 \text{ g L}^{-1}$. Neste caso, e ao contrário do que se observou nos ensaios em matraz, toda a L-Fe foi consumida. Assim, testaram-se duas novas estratégias de alimentação por pulsos, com 4 e 8 g L^{-1} de L-Fe adicionadas às 81 horas, utilizando uma concentração de 8 g L^{-1} na fase descontínua. A utilização de uma concentração superior de L-Fe na fase descontínua, seguida de uma adição de L-Fe com uma concentração de 4 g L^{-1} permitiu aumentar a produção de 2-Fe tendo-se obtido uma concentração final de $2,65 \text{ g L}^{-1}$. Apesar de se ter conseguido um aumento considerável da produção de 2-Fe em biorreator, esta concentração é ainda reduzida quando comparada às concentrações reportadas para outros microrganismos e utilizando outras estratégias de operação.

5. PERSPETIVAS FUTURAS

O presente trabalho permitiu desenvolver e testar novas formas de aumentar a produção de 2-Fe utilizando a *Yarrowia lipolytica* CH1/5, tendo-se demonstrado o interesse biotecnológico desta levedura, no entanto e comparativamente com as concentrações reportadas na literatura, é ainda possível desenvolver outras estratégias que permitam aumentar ainda mais a produção deste álcool superior por esta levedura.

Primeiramente, e dada a versatilidade da *Y. lipolytica* no consumo de diversos substratos, seria interessante testar a sua capacidade para utilizar outros resíduos industriais como o mosto de uvas, resíduos da indústria do tabaco, como fonte de carbono, como já descrito para outros microrganismos, para valorizar estes resíduos, mas também de forma a tornar este processo de produção mais ecológico e económico.

O desenvolvimento de estratégias de imobilização celular também seria algo importante, uma vez que permite diminuir o efeito tóxico do 2-Fe nas células. Para tal seria necessário estudar quais os suportes mais adequados para a imobilização, bem como a otimização da composição e condições de cultura. Além da imobilização celular também seria vantajoso realizar ensaios com a remoção *in situ* de produto, que, para além de diminuir o efeito tóxico do 2-Fe, facilitaria a remoção e purificação do mesmo. Esta remoção do produto poderia ser acoplada aos ensaios em biorreator em semi-contínuo. Poderiam realizar-se ensaios mais longos com a adição de mais pulsos, ou ainda realização operar o biorreator em modo contínuo.

Por último, seria importante identificar e quantificar quais os intermediários envolvidos na produção deste álcool superior que poderão ajudar a elucidar as baixas concentrações de 2-Fe obtidas.

6. REFERÊNCIAS

- [1] M. A. Longo and M. A. Sanromán, "Production of food aroma compounds: Microbial and enzymatic methodologies," *Food Technol. Biotechnol.*, vol. 44, no. 3, pp. 335–353, 2006.
- [2] G. A. Burdock, *Fenaroli's handbook of flavor ingredients*, vol. 14, no. 2. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis Group, 1976.
- [3] A. Vilela, "Generation of aromas and flavours," in *Generation of Aromas and Flavours*, vol. 2, 2018, p. 64.
- [4] M. Carlquist *et al.*, "Process engineering for bioflavor production with metabolically active yeasts - a mini-review," *Yeast*, vol. 32, pp. 123–143, 2015.
- [5] R. G. Berger, "Biotechnology as a source of natural volatile flavours," *Curr. Opin. Food Sci.*, vol. 1, no. 1, pp. 38–43, 2015.
- [6] M. U. Krings, "Biotechnological production of flavours and fragrances," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 49, no. 1, pp. 1–8, 1998.
- [7] E. J. Vandamme and W. Soetaert, "Bioflavours and fragrances via fermentation and biocatalysis," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 77, no. 12, pp. 1323–1332, 2002.
- [8] N. Ben Akacha and M. Gargouri, "Microbial and enzymatic technologies used for the production of natural aroma compounds: Synthesis, recovery modeling, and bioprocesses," *Food Bioprod. Process.*, vol. 94, no. May, pp. 675–706, 2015.
- [9] "Global Fragrance Market to Hit \$70 Billion," 2018.
- [10] A. L. Carroll, S. H. Desai, and S. Atsumi, "Microbial production of scent and flavor compounds," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 37, pp. 8–15, 2016.
- [11] D. Hua and P. Xu, "Recent advances in biotechnological production of 2-phenylethanol," *Biotechnol. Adv.*, vol. 29, no. 6, pp. 654–660, 2011.
- [12] C. E. Fabre, P. J. Blanc, and G. Goma, "2-Phenylethyl alcohol: An aroma profile," *Perfum. Flavorist*, vol. 23, no. 3, pp. 43–45, 1998.
- [13] A. D. Angelov and V. Gotcheva, "Biosynthesis of 2-Phenylethanol by Yeast Fermentation," *Food Sci. Eng. Technol.*, pp. 490–495, 2012.
- [14] M. Etschmann, W. Bluemke, D. Sell, and J. Schrader, "Biotechnological production of 2-phenylethanol," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 59, no. 1, pp. 1–8, 2002.
- [15] S. Serra, C. Fuganti, and E. Brenna, "Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances," *Trends Biotechnol.*, vol. 23, no. 4, pp. 193–198, Apr. 2005.
- [16] H. Shaaban, K. Mahmoud, A. A. Amin, and H. A El Banna, *Application of Biotechnology to the Production of Natural Flavor and Fragrance Chemicals*, vol. 7. 2016.
- [17] "Regulation (EC) No 1334/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on flavourings and certain food ingredients with flavouring properties for use in and on foods and amending Council Regulation (EEC) No 1601/91, Regulations (EC)."
- [18] X. Qian *et al.*, "Current status and perspectives of 2-phenylethanol production through biological processes," *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 39, no. 2, pp. 235–248, 2019.

- [19] G. Molina, J. Bicas, É. Moraes, M. Maróstica-JR, and G. Pastore, "Recent developments and industrial perspectives in the microbial production of bioflavors," in *Applications of Microbial Engineering*, 1st ed., CRC Pres, Ed. Maria G . Tuohy, 2013, pp. 122–157.
- [20] M. Mik, M. Zoglowek, G. Buron-moles, and J. Forster, "Microbial production of flavors and fragrances," in *Consequences of Microbial Interactions with Hydrocarbons, Oils, and Lipids: Production of Fuels and Chemicals*, S. Y. Lee, Ed. Cham: Springer International Publishing, 2017, pp. 1–19.
- [21] L. Janssens, H. L. De Pooter, N. M. Schamp, and E. J. Vandamme, "Production of flavours by microorganisms," *Process Biochem.*, vol. 27, no. 4, pp. 195–215, 1992.
- [22] M. Carlquist *et al.*, "Process engineering for bioflavour production with metabolically active yeasts - a mini-review," *Yeast*, vol. 32, no. 1, pp. 123–143, 2015.
- [23] J. P. Morrissey, M. M. W. Etschmann, J. Schrader, and G. M. de Billerbeck, "Cell factory applications of the yeast *Kluyveromyces marxianus* for the biotechnological production of natural flavour and fragrance molecules," *Yeast*, vol. 32, no. 1, pp. 3–16, 2015.
- [24] D. Stark, T. Münch, B. Sonnleitner, I. W. Marison, and U. von Stockar, "Extractive bioconversion of 2-phenylethanol from L-phenylalanine by *Saccharomyces cerevisiae*," *Biotechnol. Prog.*, vol. 18, no. 3, pp. 514–23, 2002.
- [25] R. Seward, J. C. Willetts, M. G. Dinsdale, and D. Lloyd, "The effects of ethanol, hexan-1-ol, and 2-phenylethanol on cider yeast growth, viability, and energy status; synergistic inhibition," *J. Inst. Brew.*, vol. 102, no. 6, pp. 439–443, 1996.
- [26] K. Chreptowicz and J. Mierzejewska, "Enhanced bioproduction of 2-phenylethanol in a biphasic system with rapeseed oil," *N. Biotechnol.*, vol. 42, pp. 56–61, 2018.
- [27] C. E. Fabre, P. J. Blanc, and G. Goma, "Production of 2-phenylethyl alcohol by *Kluyveromyces marxianus*," *Biotechnol. Prog.*, vol. 14, no. 2, pp. 270–274, Apr. 1998.
- [28] E. Abdullah, A. Idris, and A. Saparon, "Screening of yeasts for the production of 2-phenylethanol (rose aroma) in organic waste-based media," *ARPJ. Eng. Appl. Sci.*, vol. 12, no. 10, pp. 3218–3221, 2017.
- [29] E. M., B. W., S. D., and S. J., "Biotechnological production of 2-phenylethanol," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 59, no. 1, pp. 1–8, Jun. 2002.
- [30] H. Zhang *et al.*, "De-novo synthesis of 2-phenylethanol by *Enterobacter* sp. CGMCC 5087.," *BMC Biotechnol.*, vol. 14, p. 30, Apr. 2014.
- [31] D. Guo, L. Zhang, H. Pan, and X. Li, "Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of 2-Phenylethylacetate from L-phenylalanine," *Microbiologyopen*, vol. 6, no. 4, p. e00486, Aug. 2017.
- [32] T. Chantasuban, "Assessing the Wine Yeast *Metschnikowia pulcherrima* for the Production of 2-Phenylethanol," 2016.
- [33] J. P. Morrissey, M. M. W. Etschmann, J. Schrader, and G. M. de Billerbeck, "Cell factory applications of the yeast *Kluyveromyces marxianus* for the biotechnological production of natural flavour and fragrance molecules," *Yeast*, vol. 32, no. 1, pp. 3–16, 2015.
- [34] J. Schrader, M. M. Etschmann, D. Sell, J. M. Hilmer, and J. Rabenhorst, "Applied biocatalysis

- for the synthesis of natural flavour compounds—current industrial processes and future prospects,” *Biotechnol Lett*, vol. 26, no. 6, pp. 463–472, 2004.
- [35] J. Mierzejewska, A. Tymoszevska, K. Chreptowicz, and K. Krol, “Mating of 2 laboratory *Saccharomyces cerevisiae* strains resulted in enhanced production of 2-phenylethanol by biotransformation of L -phenylalanine,” *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 27, no. 2, pp. 81–90, 2017.
 - [36] H. Zhang *et al.*, “De-novo synthesis of 2-phenylethanol by *Enterobacter* sp. CGMCC 5087,” *BMC Biotechnol.*, vol. 14, 2014.
 - [37] B. Kim, B. Cho, J. Hahn, and B. Engineering, “Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of 2-phenylethanol via Ehrlich pathway.,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 111, no. 1, pp. 115–124, 2014.
 - [38] F. Gao and A. J. Daugulis, “Bioproduction of the aroma compound 2-phenylethanol in a solid-liquid two-phase partitioning bioreactor system by *Kluyveromyces marxianus*,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 104, no. 2, pp. 332–339, Oct. 2009.
 - [39] S. Masuo, L. Osada, S. Zhou, T. Fujita, and N. Takaya, “*Aspergillus oryzae* pathways that convert phenylalanine into the flavor volatile 2-phenylethanol,” *Fungal Genet. Biol.*, vol. 77, no. March, pp. 22–30, 2015.
 - [40] H. Chung, S. L. Lee, and C. C. Chou, “Production and molar yield of 2-phenylethanol by *Pichia fermentans* L-5 as affected by some medium components,” *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 90, no. 2, pp. 142–147, 2000.
 - [41] K. Chreptowicz, M. Wielechowska, J. Głównicz-Zubek, E. Rybak, and J. Mierzejewska, “Production of natural 2-phenylethanol: From biotransformation to purified product,” *Food Bioprod. Process.*, vol. 100, pp. 275–281, 2016.
 - [42] D. Hua *et al.*, “Enhanced 2-phenylethanol production from L-phenylalanine via in situ product adsorption,” *Biocatal. Biotransformation*, vol. 28, no. 4, pp. 259–266, 2010.
 - [43] K. Chreptowicz, M. K. Sternicka, and J. Kowalska, Patrycja Daria Mierzejewska, “Screening of yeasts for the production of 2-phenylethanol (rose aroma) in organic waste-based media,” *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 66, no. 2, pp. 153–160, 2018.
 - [44] X. Lu, Y. Wang, H. Zong, H. Ji, B. Zhuge, and Z. Dong, “Bioconversion of L-phenylalanine to 2-phenylethanol by the novel stress-tolerant yeast *Candida glycerinogenes* WL2002-5.,” *Bioengineered*, vol. 7, no. 6, pp. 418–423, Nov. 2016.
 - [45] E. Celińska, P. Kubiak, W. Białas, M. Dziadas, and W. Grajek, “*Yarrowia lipolytica*: The novel and promising 2-phenylethanol producer,” *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 40, no. 3–4, pp. 389–392, 2013.
 - [46] L. Conde-Báez, J. Castro-Rosas, J. R. Villagómez-Ibarra, J. B. Páez-Lerma, and C. Gómez-Aldapa, “Evaluation of Waste of the Cheese Industry for the Production of Aroma of Roses (Phenylethyl Alcohol),” *Waste and Biomass Valorization*, vol. 8, no. 4, pp. 1343–1350, 2017.
 - [47] E. Albertazzi, R. Cardillo, S. Servi, and G. Zucchi, “Biogeneration of 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate important aroma components,” *Biotechnol. Lett.*, vol. 16, no. 5, pp. 491–496, 1994.

- [48] V. Tzin, G. Galili, and A. Aharoni, "Shikimate Pathway and Aromatic Amino Acid Biosynthesis," *eLS*, no. December 2017, pp. 1–10, 2012.
- [49] T. Äyräpää, "The formation of phenethyl alcohol from 14C-labelled phenylalanine," *J. Inst. Brew.*, vol. 71, no. 4, pp. 341–347, 1965.
- [50] J. Zhang *et al.*, "Acetate ester production by Chinese yellow rice wine yeast overexpressing the alcohol acetyltransferase-encoding gene ATF2," *Genet. Mol. Res.*, vol. 13, no. 4, pp. 9735–9746, Nov. 2014.
- [51] D. Koma, H. Yamanaka, K. Moriyoshi, T. Ohmoto, and K. Sakai, "Production of aromatic compounds by metabolically engineered *Escherichia coli* with an expanded shikimate pathway," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 78, no. 17, pp. 6203–6216, 2012.
- [52] G. Barth and C. Gaillardin, "Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*," *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 19, no. 4, pp. 219–237, Apr-1997.
- [53] F. Darvishi, M. Ariana, E. R. Marella, and I. Borodina, "Advances in synthetic biology of oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for producing non-native chemicals," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 102, no. 14, pp. 5925–5938, 2018.
- [54] L. Hu-Hu, J. Xiao-Jun, and H. He, "Biotechnological applications of *Yarrowia lipolytica*: Past, present and future," *Biotechnol. Adv.*, vol. 33, no. 8, pp. 1522–1546, 2015.
- [55] O. Csutak, V. Corbu, I. Stoica, R. Ionescu, and T. Vassu, "Biotechnological Applications of *Yarrowia lipolytica* CMGB32," *Agric. Agric. Sci. Procedia*, vol. 6, pp. 545–553, 2015.
- [56] E. Celińska and J.-M. Nicaud, "Filamentous fungi-like secretory pathway strayed in a yeast system: peculiarities of *Yarrowia lipolytica* secretory pathway underlying its extraordinary performance," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. in press, pp. 1–14, 2018.
- [57] J. M. Nicaud, "*Yarrowia lipolytica*," *Yeast*, vol. 29, no. 10, pp. 409–418, Oct. 2012.
- [58] J. M. N. A. Beopoulos, T. Desfougeres, J. Sabirova, S. Zinjarde, C. Neuvéglise, "The hydrocarbon-degrading oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*," in *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, K. N. Timmis, Ed. Springer, Berlin, Heidelberg, 2010, pp. 2111–2121.
- [59] C. Madzak, "*Yarrowia lipolytica*: recent achievements in heterologous protein expression and pathway engineering," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 99, no. 11, pp. 4559–4577, 07-Jun-2015.
- [60] M. Egermeier, H. Russmayer, M. Sauer, and H. Marx, "Metabolic flexibility of *Yarrowia lipolytica* growing on glycerol," *Front. Microbiol.*, vol. 8, no. JAN, pp. 1–9, 2017.
- [61] Q. Zhu and E. N. Jackson, "Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for industrial applications," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 36, pp. 65–72, 2015.
- [62] R. Ledesma-Amaro *et al.*, "Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* to produce chemicals and fuels from xylose," *Metab. Eng.*, vol. 38, pp. 115–124, 2016.
- [63] E. Cavallo, H. Charreau, P. Cerrutti, and M. L. Foresti, "*Yarrowia lipolytica*: A model yeast for citric acid production," *FEMS Yeast Res.*, vol. 17, no. 8, pp. 1–16, 2017.
- [64] C. Madzak, C. Gaillardin, and J. M. Beckerich, "Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: A review," *J. Biotechnol.*, vol. 109, no. 1–2, pp.

63–81, 2004.

- [65] K. A. Markham and H. S. Alper, "Synthetic biology expands the industrial potential of *Yarrowia lipolytica*," *Trends Biotechnol.*, vol. 36, no. 10, pp. 1085–1095, 2018.
- [66] R. Ledesma-Amaro and J. M. Nicaud, "Yarrowia lipolytica as a biotechnological chassis to produce usual and unusual fatty acids," *Progress in Lipid Research*, vol. 61. Pergamon, pp. 40–50, 01-Jan-2016.
- [67] F. A. G. Gonçalves, G. Colen, and J. A. Takahashi, "Yarrowia lipolytica and its multiple applications in the biotechnological industry," *The Scientific World Journal*, vol. 2014. Hindawi Limited, 2014.
- [68] Z. Lazar, N. Liu, and G. Stephanopoulos, "Holistic Approaches in Lipid Production by *Yarrowia lipolytica*," *Trends Biotechnol.*, vol. 36, no. 11, pp. 1157–1170, 2018.
- [69] K. H. Wolfe, D. Armisen, E. Proux-wera, and S. S. Óhéigeartaigh, "L-Phenylalanine catabolism and 2-phenylethanol synthesis in *Yarrowia lipolytica*-mapping molecular identities through whole-proteome quantitative mass spectrometry analysis," *FEMS Yeast Res.*, vol. 15, no. 5, pp. 1–24, 2015.
- [70] Q. Wang *et al.*, "Biosynthesis of 2-phenylethanol using tobacco waste as feedstock," *Biocatalysis and Biotransformation*, vol. 31, no. 6. pp. 292–298, 2013.
- [71] L. Mu, H. XianGang, L. XiaoWei, Y. Zhao, and Y. Xu, "Production of 2-phenylethanol by microbial mixed cultures allows resource recovery of cane molasses wastewater.," *Fresenius Environ. Bull.*, vol. 23, no. 6, pp. 1356–1365, 2014.
- [72] O. Martínez, A. Sánchez, X. Font, and R. Barrena, "Enhancing the bioproduction of value-added aroma compounds via solid-state fermentation of sugarcane bagasse and sugar beet molasses: Operational strategies and scaling-up of the process," *Bioresour. Technol.*, vol. 263, pp. 136–144, Sep. 2018.
- [73] S. M. M. de Oliveira *et al.*, "Production of 2-phenylethanol by *Geotrichum fragrans*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* in cassava wastewater," *J. Food, Agric. Environ.*, vol. 11, no. 2, pp. 158–163, 2013.
- [74] O. Güneşer, A. Demirkol, Y. Karagül Yüceer, S. Özmen Toğay, M. İşleten Hoşoğlu, and M. Elibol, "Bioflavour production from tomato and pepper pomaces by *Kluyveromyces marxianus* and *Debaryomyces hansenii*," *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 38, no. 6, pp. 1143–1155, 2015.
- [75] S. K. Brar, G. S. Dhillon, and C. R. Soccol, "Biotransformation of waste biomass into high value biochemicals," *Biotransformation waste biomass into high value Biochem.*, vol. 9781461480, pp. 1–504, 2014.
- [76] O. Martínez, A. Sánchez, X. Font, and R. Barrena, "Bioproduction of 2-phenylethanol and 2-phenethyl acetate by *Kluyveromyces marxianus* through the solid-state fermentation of sugarcane bagasse," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 102, no. 11, pp. 4703–4716, 2018.
- [77] J. Mierzejewska, K. Dąbkowska, K. Chreptowicz, and A. Sokołowska, "Hydrolyzed corn stover as a promising feedstock for 2-phenylethanol production by nonconventional yeast," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2018.
- [78] K. Chreptowicz and J. Mierzejewska, "Enhanced bioproduction of 2-phenylethanol in a biphasic

- system with rapeseed oil," *N. Biotechnol.*, vol. 42, pp. 56–61, 2018.
- [79] A. Makri, S. Fakas, and G. Aggelis, "Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeated batch cultures," *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 7, pp. 2351–2358, 2010.
 - [80] E. Celińska and W. Grajek, "A novel multigene expression construct for modification of glycerol metabolism in *Yarrowia lipolytica*," *Microb. Cell Fact.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–16, 2013.
 - [81] L. A. Hazelwood, J. M. Daran, A. J. A. Van Maris, J. T. Pronk, and J. R. Dickinson, "The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: A century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 74, no. 8, pp. 2259–2266, 2008.
 - [82] N. Gomes, Y. Waché, J. A. Teixeira, and I. Belo, "Oil-in-water emulsions characterization by laser granulometry and impact on γ -decalactone production in *Yarrowia lipolytica*," *Biotechnol. Lett.*, vol. 33, no. 8, pp. 1601–1606, Aug. 2011.
 - [83] C. J. Huang, S. L. Lee, and C. C. Chou, "Production of 2-phenylethanol, a flavor ingredient, by *Pichia fermentans* L-5 under various culture conditions," *Food Res. Int.*, vol. 34, no. 4, pp. 277–282, 2001.
 - [84] S. Ghosh, B. W. Kebaara, A. L. Atkin, and K. W. Nickerson, "Regulation of aromatic alcohol production in *Candida albicans*," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 74, no. 23, pp. 7211–7218, 2008.
 - [85] N. Gomes, J. A. Teixeira, and I. Belo, "Fed-batch versus batch cultures of *Yarrowia lipolytica* for γ -decalactone production from methyl ricinoleate," *Biotechnol. Lett.*, vol. 34, no. 4, pp. 649–654, Apr. 2012.
 - [86] M. Mihal, L. Krištofiková, and J. Markoš, "Production of 2-phenylethanol in hybrid system using airlift reactor and immersed hollow fiber membrane module," *Chem. Eng. Process. Process Intensif.*, vol. 72, pp. 144–152, 2013.
 - [87] H. Wang, Q. Dong, A. Guan, C. Meng, X. Shi, and Y. Guo, "Synergistic inhibition effect of 2-phenylethanol and ethanol on bioproduction of natural 2-phenylethanol by *Saccharomyces cerevisiae* and process enhancement," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 112, no. 1, pp. 26–31, Jul. 2011.
 - [88] T. Chantasuban *et al.*, "Elevated production of the aromatic fragrance molecule, 2-phenylethanol, using *Metschnikowia pulcherrima* through both de novo and ex novo conversion in batch and continuous modes," *J Chem Technol Biotechnol*, vol. 93, no. 8, pp. 2118–2130, 2018.
 - [89] J. Garavaglia, S. H. Flôres, T. M. Pizzolato, M. D. C. Peralba, and M. A. Z. Ayub, "Bioconversion of L-phenylalanine into 2-phenylethanol by *Kluyveromyces marxianus* in grape must cultures," *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 23, no. 9, pp. 1273–1279, 2007.
 - [90] M. M. W. Etschmann and J. Schrader, "An aqueous-organic two-phase bioprocess for efficient production of the natural aroma chemicals 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate with yeast," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 71, no. 4, pp. 440–443, 2006.
 - [91] T. Chantasuban *et al.*, "Elevated production of the aromatic fragrance molecule , 2-phenylethanol , using *Metschnikowia pulcherrima* through both de novo and ex novo conversion in batch and continuous modes," *J Chem Technol Biotechnol*, vol. 93, no. 8, pp. 2118–2130, 2018.

- [92] M. M. W. Etschmann, D. Sell, and J. Schrader, "Production of 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate from L-phenylalanine by coupling whole-cell biocatalysis with organophilic pervaporation," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 92, no. 5, pp. 624–634, 2005.
- [93] A. A. Pérez, "Enhanced Microbial Production of Natural Flavors via *In-situ* Product Adsorption," Swiss Federal Institute of Technology Zurich, Zurich, Switzerland, 2001.
- [94] M. O. R. Sendovski, N. Nir, and A. Fishman, "Bioproduction of 2-Phenylethanol in a Biphasic Ionic liquid Aqueous system," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 58, no. 4, pp. 2260–2265, 2010.
- [95] X. Qian *et al.*, "Current status and perspectives of 2-phenylethanol production through biological processes," *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 0, no. 0, pp. 1–14, 2018.
- [96] M. Królikowski, J. Pachla, D. Ramjugernath, P. Naidoo, and U. Domańska, "Extraction of 2-phenylethanol (PEA) from aqueous phases using tetracyanoborate-based ionic liquids," *J. Mol. Liq.*, vol. 224, pp. 1124–1130, 2016.
- [97] P. Okuniewska, U. Domańska, M. Więckowski, and J. Mierzejewska, "Recovery of 2-phenylethanol from aqueous solutions of biosynthesis using ionic liquids," *Sep. Purif. Technol.*, vol. 188, pp. 530–538, 2017.
- [98] D. Serp, U. Von Stockar, and I. W. Marison, "Enhancement of 2-phenylethanol productivity by *Saccharomyces cerevisiae* in two-phase fed-batch fermentations using solvent immobilization," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 82, no. 1, pp. 103–110, 2003.
- [99] J. Mei, H. Min, and Z. Lü, "Enhanced biotransformation of l-phenylalanine to 2-phenylethanol using an in situ product adsorption technique," *Process Biochem.*, vol. 44, no. 8, pp. 886–890, 2009.
- [100] C. E. Fabre, J. S. Condoret, and A. Marty, "Extractive fermentation of aroma with supercritical CO₂," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 64, no. 4, pp. 392–400, 1999.
- [101] D. L. Hua *et al.*, "Extractive bioconversion of l-phenylalanine to 2-phenylethanol using polypropylene glycol 1500," *Asian J. Chem.*, vol. 25, no. 11, pp. 5951–5954, 2013.
- [102] D. Stark, H. Kornmann, T. Münch, B. Sonnleitner, I. W. Marison, and U. Von Stockar, "Novel type of in situ extraction: Use of solvent containing microcapsules for the bioconversion of 2-phenylethanol from L-phenylalanine by *Saccharomyces cerevisiae*," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 83, no. 4, pp. 376–385, 2003.
- [103] H. Wang, Q. Dong, C. Meng, X. ai Shi, and Y. Guo, "A continuous and adsorptive bioprocess for efficient production of the natural aroma chemical 2-phenylethanol with yeast," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 48, no. 4–5, pp. 404–407, 2011.
- [104] Y. Achmon, J. Goldshtein, S. Margel, and A. Fishman, "Hydrophobic microspheres for in situ removal of 2-phenylethanol from yeast fermentation," *J. Microencapsul.*, vol. 28, no. 7, pp. 628–638, 2011.
- [105] E. Nagy, M. Niss, D. Dlauchy, N. Arneborg, D. S. Nielsen, and G. Péter, "*Yarrowia divulgata* f.a., sp. nov., a yeast species from animal-related and marine sources," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 63, no. PART 12, pp. 4818–4823, 2013.
- [106] Z. Cui, X. Yang, Q. Shen, K. Wang, and T. Zhu, "Optimisation of biotransformation conditions for production of 2-phenylethanol by a *Saccharomyces cerevisiae* CWY132 mutant," *Nat. Prod.*

- Res.*, vol. 25, no. 7, pp. 754–759, 2011.
- [107] A. Braga, A. Oliveira, B. Freitas, E. Nagy, D. Q. Nguyen, and I. Belo, “*Yarrowia lipolytica* as a potential producer of 2-phenylethanol from L-phenylalanine biotransformation,” *CHEMPOR 2018 - 13th Int. Chem. Biol. Eng. Conf. (b. Ext. Abstr.)*, vol. 0, pp. 41–42, 2018.
 - [108] R. Collins, “The production of volatile compounds by filamentous fungi,” *Dev Ind Microbiol*, no. 20, pp. 239–245, 1978.
 - [109] C. Fabre, P. Blanc, and G. Goma, “Production of benzaldehyde by several strains of *Ischnoderma benzoinum*,” *Sci Aliment.*, no. 16, pp. 61–68, 1996.
 - [110] L. Janssens, de P. HL, V. EJ, and S. NM, “Bio-synthesis of esters by *Geotrichum penicillatum*,” *Schreier P Bioflavour*, pp. 453–463, 1988.
 - [111] A. Lomascolo *et al.*, “Evaluation of the potential of *Aspergillus niger* species for the bioconversion of L-phenylalanine into 2-phenylethanol,” *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 17, no. 1, pp. 99–102, 2001.
 - [112] D. T. Johnson and K. A. Taconi, “The glycerin glut: Options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production,” *Environ. Prog.*, vol. 26, pp. 338–348, 2007.
 - [113] S. Papanikolaou and G. Aggelis, “Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single,” vol. 82, no. July 2001, pp. 43–49, 2002.
 - [114] A. Rywińska *et al.*, “Glycerol as a promising substrate for *Yarrowia lipolytica* biotechnological applications,” *Biomass and Bioenergy*, vol. 48, pp. 148–166, 2013.
 - [115] M. Spagnuolo, M. S. Hussain, L. Gambill, and M. Blenner, “Alternative substrate metabolism in *Yarrowia lipolytica*,” *Front. Microbiol.*, vol. 9, no. MAY, pp. 1–14, 2018.
 - [116] D. A. Sáenz, M. S. Chianelli, and C. A. Stella, “L-Phenylalanine Transport in *Saccharomyces cerevisiae*: Participation of GAP1, BAP2, and AGP1,” *J. Amino Acids*, vol. 2014, no. Cluster I, pp. 1–9, 2014.
 - [117] A. C. Oliveira, “Production of the flavor compound 2-phenylethanol by *Yarrowia lipolytica*,” University of Minho, 2018.
 - [118] D. Gómez-Díaz, J. M. Navaza, and B. Sanjurjo, “Interfacial area evaluation in a bubble column in the presence of a surface-active substance. Comparison of methods,” *Chem. Eng. J.*, vol. 144, no. 3, pp. 379–385, 2008.
 - [119] P. Ferreira, M. Lopes, M. Mota, and I. Belo, “Oxygen mass transfer impact on citric acid production by *Yarrowia lipolytica* from crude glycerol,” *Biochem. Eng. J.*, vol. 110, pp. 35–42, 2016.
 - [120] S. Bellou, A. Makri, I. E. Triantaphyllidou, S. Papanikolaou, and G. Aggelis, “Morphological and metabolic shifts of *Yarrowia lipolytica* induced by alteration of the dissolved oxygen concentration in the growth environment,” *Microbiol. (United Kingdom)*, vol. 160, no. PART 4, pp. 807–817, 2014.
 - [121] B. Zieniuk and A. Fabiszewska, “*Yarrowia lipolytica*: a beneficial yeast in biotechnology as a rare opportunistic fungal pathogen: a minireview,” *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 35, no. 1, p. 0, 2019.

- [122] A. Braga, D. P. Mesquita, A. L. Amaral, E. C. Ferreira, and I. Belo, "Aroma production by *Yarrowia lipolytica* in airlift and stirred tank bioreactors: Differences in yeast metabolism and morphology," *Biochem. Eng. J.*, vol. 93, pp. 55–62, 2015.
- [123] O. Martínez-Avila, A. Sánchez, X. Font, and R. Barrena, *Fed-Batch and Sequential-Batch Approaches to Enhance the Bioproduction of 2-Phenylethanol and 2-Phenethyl Acetate in Solid-State Fermentation Residue-Based Systems*, vol. 67, no. 12. 2019.

ANEXOS

Anexo I – Curva de calibração da biomassa

A quantificação da biomassa, em g L⁻¹, foi efetuada através da reta de calibração obtida pelo método de peso seco para cada microrganismo em estudo. Na Tabela A.1. está representada a expressão representativa da reta de calibração para a concentração celular.

Tabela A 1. Reta de calibração da biomassa para a estirpe de *Y. lipolytica* CH1/5 e W29

Microrganismo	Limite de detecção (g L ⁻¹)	Equação
		$A_{600\text{ nm}} = (m \pm S_m) \times C + (b \pm S_b)$
CH1/5	0,55	$A_{600\text{ nm}} = (0,86 \pm 0,06) C - (0,013 \pm 0,16)$
W29	0,49	$A_{600\text{ nm}} = (1,04 \pm 0,07) C - (0,03 \pm 0,17)$

Sendo:

$A_{600\text{ nm}}$, a absorvância lida a 600 nm

m, o declive da reta

S_m , o erro padrão associado ao declive

b, a ordenada na origem da reta

S_b , o erro padrão associado à ordenada na origem

C, a concentração celular, em g L⁻¹

Anexo II – Curva de calibração de glucose e glicerol

Tabela A 2. Reta de calibração para a glucose e glicerol

Composto	Limite de deteção (g L ⁻¹)	Equação
		Área (g L ⁻¹) = (m ± S _m) × C + (b ± S _b)
Glucose	0,05	Área (g L ⁻¹) = (10,9±1,7) C – (0,5±0,18)
Glicerol	0,1	Área (g L ⁻¹) = (1,76±0,4) C – (0,11±0,06)

Sendo:

Área, a área dos picos obtida por HPLC para cada um dos compostos

m, o declive da reta

S_m, o erro padrão associado ao declive

b, a ordenada na origem da reta

S_b, o erro padrão associado à ordenada na origem

C, a concentração de cada composto, em g L⁻¹