



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**FERNANDO KAHRIN CARDOSO DA COSTA**

**AVALIAÇÃO DA BIOSÍNTESE DE 2-FENILETANOL POR *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 EM SUCO DE CAJU**

**FORTALEZA**

**2018**

FERNANDO KAHRIN CARDOSO DA COSTA

AVALIAÇÃO DA BIOSÍNTESE DE 2-FENILETANOL POR *Kluyveromyces marxianus*  
ATCC 36907 EM SUCO DE CAJU

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Desenvolvimento de Processos químicos e bioquímicos.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Luciana Rocha Barros Gonçalves

Coorientador: Prof. Dr. André Casimiro de Macedo

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

C872a Costa, Fernando Kahrin Cardoso da.  
Avaliação da biossíntese de 2-feniletanol por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 em suco de caju /  
Fernando Kahrin Cardoso da Costa. – 2019.  
100 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-  
Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2019.  
Orientação: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.  
Coorientação: Prof. Dr. André Casimiro de Macedo.

1. Composto Aromático. 2. Bioprocesso. 3. Leveduras. 4. Caju. I. Título.

CDD 660

---

FERNANDO KAHRIN CARDOSO DA COSTA

AVALIAÇÃO DA BIOSÍNTESE DE 2-FENILETANOL POR *Kluyveromyces marxianus*  
ATCC 36907 EM SUCO DE CAJU

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Desenvolvimento de Processos químicos e bioquímicos.

Aprovada em: 09/03/2018.

BANCA EXAMINADORA

---

Professora Dr<sup>a</sup>. Luciana Rocha Barros Gonçalves  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Professor Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Professor Dr. Jonas Luiz Almada da Silva  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte,

Aos meus pais, João Batista da Costa e Madalena Cardoso da Silva, e a minha Avó Maria Gomes Pureza, Dona Mariquinha, (*in memoriam*), pelos sacrifícios que fizeram para que eu pudesse ser tudo que sou. Minha infinda gratidão e minha eterna saudade.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais João Batista da Costa, Madalena Cardoso da Silva e Maria Eliane da Costa por terem me dado educação, valores, por todo esforço empenhado e por toda confiança depositada em mim durante todo esse tempo de estudo e de vida.

Aos meus irmãos Francisco de Assis e Felipe Gonzalez pelo apoio e paciência de me aturar nos meus dias difíceis.

A todos os meus familiares, primos, tios, cunhada e ao meu sobrinho querido, que de alguma forma me incentivaram a seguir em frente, especialmente a minha avó paterna Maria Gomes Pureza (*in memoriam*), amor incondicional, que sempre me ensinou o bom da vida e que nunca deixou de acreditar que eu conseguiria alcançar meus objetivos.

Aos meus amigos mais próximos Morgana, Iara, Tamyres, Sâmia, Filipe, Rômulo, Robsdean, Paulinha, Maria, Diana Pio, aqueles que a Engenharia de Alimentos e a vida me proporcionaram, que estiveram comigo em todos os momentos bons e ruins.

Expresso minha gratidão ao grupo GPBio pelo acolhimento e ensinamentos nesses dois anos de mestrado. E gostaria de agradecer, em especial, algumas pessoas que me acompanharam e foram fundamentais para a realização deste trabalho, Layanne, Tiago, Juliana, Renata Débora, Jéssyca, Maisa, Rayanne, Ravena, Carla, Natan, Ítalo, Eva, Lorena, Gabriel, Marina, Kamilly, Nathalia, Magno, Brenda, que me ajudaram com uma equação, um café, uma conversa, um colchão, um conselho, uma mão, um ombro, um sermão, uma carona.

Aos meus outros amigos Virgínia, Bruna Santana, Camila Mota, Ailton, José Romero, Rafael, Tiago, Erika Patrícia, Regiane pela disposição para me ouvir e prontidão para me ajudar.

Ao Prof. Dr. André Casimiro e a Prof. Dr<sup>a</sup> Maria Valderez, pelo auxílio, paciência e por todo trabalho sugerido, obrigado. Manifesto minha gratidão aos Professores e funcionários do DEQ/UFC, em especial a Prof. Dr<sup>a</sup>. Luciana e Prof. Dr. Hosiberto, pelas disponibilidades, simpatias e gentilezas.

Aos membros que compuseram as minhas bancas do exame de qualificação e defesa, meus sinceros agradecimentos pelas contribuições significativas no meu trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”. Agradeço a UFC por me proporcionar conhecimento técnico e científico durante esses oito anos e meio de estudo.

Ninguém vence sozinho, agradeço a todos.

*“Faites que le rêve dévore votre vie, afin que la  
vie ne dévore pas votre rêve”*

(Antoine de Saint-Exupéry)

## RESUMO

O caju (*Anacardium occidentale L.*) é uma fruta nativa da América tropical, cujo processamento para obtenção da castanha gera um desperdício de cerca de 90 % de pedúnculos, os quais são descartados como subproduto agrícola. Tendo em vista a rica composição nutricional, o pedúnculo do caju pode ser utilizado como substrato para a produção de biomoléculas, como o 2-feniletanol (2-FE), por exemplo. O 2-FE é um composto aromático que possui um odor característico de rosas e pode ser utilizado como aditivo nas indústrias de alimentos, cosméticos e perfumarias. Esse aroma pode ser produzido a partir de extratos naturais de rosas e por síntese química, no entanto, essas duas rotas de produção trazem problemas quanto ao custo de extração e quanto aos subprodutos tóxicos formados pela síntese química. Devido a esses obstáculos, a via biotecnológica para a produção de 2-FE vem sendo estudada pela comunidade científica e tem se mostrado uma rota promissora. A bioconversão do 2-FE é fortemente influenciada pelas condições de operação, principalmente pela suplementação do meio com L-fenilalanina (L-Phe) e pela composição do meio de cultivo. Nesse contexto, este estudo teve como objetivo avaliar a biossíntese de 2-FE por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 utilizando o suco de caju extraído dos pedúnculos. Neste trabalho, o suco de caju *in natura* na concentração de  $131 \pm 5,7$  g.L<sup>-1</sup> de glicose + frutose, e duas concentrações do suco diluído de  $106 \pm 1,2$  g.L<sup>-1</sup> e  $74 \pm 2,8$  g.L<sup>-1</sup>, foram avaliadas para produção de 2-FE. Foi também realizado um estudo de batelada alimentada com adição de 50 g.L<sup>-1</sup> de glicose em 12; 24 e 48 horas. Os melhores resultados ocorreram quando o cultivo foi conduzido utilizando o suco *in natura* ( $131 \pm 5,7$  g.L<sup>-1</sup> de glicose + frutose), no qual foi possível obter uma máxima produção de 0,84 g.L<sup>-1</sup> de 2-FE, rendimento do produto ( $Y_{P/S}$ ) de 0,0066 g.g<sup>-1</sup> e uma produtividade volumétrica de ( $Q_P$ ) 0,0116 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. No estudo de batelada alimentada, a produção de 2-FE foi de 0,86 g.L<sup>-1</sup>, a qual não apresentou diferença significativa em relação ao estudo anterior. Em seguida, utilizando o suco *in natura*, foi realizado um estudo sobre o efeito da suplementação com diferentes concentrações de L-Phe (1,0; 3,0; 4,0 e 10,0 g.L<sup>-1</sup>). Nesta fase do estudo, os resultados foram semelhantes para as concentrações de 3,0; 4,0 e 10,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe no meio, não apresentando diferenças significativas na produção do metabólito ( $p > 0,05$ ). Diante dos resultados, a concentração de açúcares no suco de caju demonstrou ser importante na produção de 2-FE, assim como a concentração inicial de L-Phe. Os resultados mostram que o suco de caju é um meio de cultivo, não convencional, apropriado para a bioprodução de 2-FE por *K. marxianus* ATCC 36907.

**Palavras-chave:** Composto aromático. Bioprocesso. Leveduras. Caju.

## ABSTRACT

Cashew (*Anacardium occidentale L.*) is a native fruit from tropical America, which processing to obtain the cashew apple nuts produces a waste of about 90 % of the cashew apple, which is discarded as an agricultural byproduct. Considering the rich nutritional composition, the cashew apple can be used as a substrate for the production of biomolecules, such as 2-phenylethanol (2-PE). 2-PE is an aromatic compound that has a characteristic rose odor and can be used as an additive in the food, cosmetics and perfumery industries. This aroma can be obtained by natural extracts from roses and by chemical synthesis, however, these two production routes bring problems as extraction cost and the toxic by-products formed by the chemical synthesis. Due to these obstacles, biotechnology pathway for 2-PE production has been studied by the scientific community and has shown a promising route. The bioconversion of 2-PE is strongly influenced by the operating conditions, mainly by the supplementation of the medium with L-phenylalanine (L-Phe) and the composition of the culture medium. In this context, the aim of this study is to evaluate the biosynthesis of 2-PE by *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 using cashew apple juice as a substrate. In this work, fresh cashew apple juice at the concentration of  $131 \pm 5.7 \text{ g.L}^{-1}$  of glucose + fructose, and two diluted concentrations of cashew apple juice of  $106 \pm 1.2 \text{ g.L}^{-1}$  and  $74 \pm 2.8 \text{ g.L}^{-1}$  were evaluated for 2-PE production. It was also carried out a fed-batch study with the addition of  $50 \text{ g.L}^{-1}$  of glucose in 12; 24 and 48 hours. The best results occurred when the culture was conducted using fresh cashew apple juice ( $131 \pm 5.7 \text{ g.L}^{-1}$  of glucose and fructose), with a maximum 2-PE production of  $0.84 \text{ g.L}^{-1}$ , product yield ( $Y_{P/S}$ ) of  $0.0066 \text{ g.g}^{-1}$  and productivity of ( $Q_P$ )  $0.0116 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . In the fed-batch study, the 2-PE production was  $0.86 \text{ g.L}^{-1}$ , which did not present significant difference in relation to the previous study. Furthermore, the effect of supplementation with different L-Phe concentrations (1.0; 3.0; 4.0 and  $10.0 \text{ g.L}^{-1}$ ) was evaluated using fresh cashew apple juice. In this study stage, the results were similar for 3.0; 4.0 and  $10.0 \text{ g.L}^{-1}$  of L-Phe concentration in the medium, showing no significant differences in the metabolite production ( $p > 0.05$ ). Considering these results, sugar concentration in the cashew apple juice was shown to be important in 2-PE production, as well as the initial concentration of the precursor L-Phe. Finally, these results show that cashew juice is an unconventional culture medium suitable for the bioproduction of 2-PE by *K. marxianus* ATCC 36907.

**Keywords:** Aromatic compound. Bioprocess. Yeasts. Cashew apple.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplos de compostos aromáticos produzidos por métodos microbiológicos. ....	23
Figura 2 - Fórmula estrutural do 2-FE.....	25
Figura 3 - Reação de <i>Friedel-Craft</i> para a síntese de 2-FE (A). Redução de óxido de estireno para síntese de 2-FE (B). Oxidação de propileno com hidroperóxido de 2-feniletil (C).....	27
Figura 4 - Via de Ehrlich para a produção de 2-FE a partir da bioconversão da L-Phe.....	29
Figura 5 - Vias metabólicas microbianas associadas à L-fenilalanina. ....	30
Figura 6 - Vias metabólicas relacionadas à produção de 2-FE.....	31
Figura 7 - Área plantada de caju em hectares em alguns estados do Nordeste do Brasil. Brasil (■); Nordeste (■); Maranhão (■); Piauí (■); Ceará (■); Rio Grande do Norte (■); Paraíba (■); Pernambuco (■); Alagoas (■); Bahia (■). ....	38
Figura 8 - Perfil de crescimento e consumo de substrato durante a preparação do inóculo da levedura <i>K. marxianus</i> ATCC36907 a 35 °C, 180 rpm usando suco de caju como meio de cultivo. Concentração de Biomassa (■) e Concentração de Glicose mais Frutose (●). ....	51
Figura 9 - Influência da concentração inicial de açúcar no crescimento celular (A) produção de 2-FE (B) e consumo de açúcar total (C) para os cultivos realizados a 35 °C, 250 rpm, aeração de 2 L.min <sup>-1</sup> e 3,0 g.L <sup>-1</sup> de L-fenilalanina, utilizando suco de caju nas concentrações de açúcar total (glicose + frutose) de 131 ± 5,7 g.L <sup>-1</sup> (■); 106 ± 1,2 g.L <sup>-1</sup> (■); 74 ± 2,8 g.L <sup>-1</sup> (■). ....	53
Figura 10 - Velocidades específicas de crescimento ( $\mu_X$ ), consumo de substrato ( $\mu_S$ ) e produção de 2-FE ( $\mu_P$ ) para os cultivos realizados a 35 °C, 250 rpm, aeração de 2 L.min <sup>-1</sup> e 3,0 g.L <sup>-1</sup> de L-Phe, utilizando suco de caju nas concentrações de açúcar (glicose + frutose) de 131 ± 5,7 g.L <sup>-1</sup> (■); 106 ± 1,2 g.L <sup>-1</sup> (■); 74 ± 2,8 g.L <sup>-1</sup> (■). ....	56
Figura 11 - Perfil das velocidades específicas de crescimento $\mu_X$ (■), consumo de substrato $\mu_S$ (■) e produção de 2-FE $\mu_P$ (■) para os cultivos realizados a 35 °C, 250 rpm, aeração de 2 L.min <sup>-1</sup> e 3,0 g.L <sup>-1</sup> de L-Phe, utilizando suco de caju nas concentrações de açúcar (glicose + frutose) de 131 ± 5,7 g.L <sup>-1</sup> (A); 106 ± 1,2 g.L <sup>-1</sup> (B); 74 ± 2,8 g.L <sup>-1</sup> (C).....	57
Figura 12 - Máxima concentração de biomassa $X_{m\acute{a}x}$ (■) e produção $P_{m\acute{a}x}$ (■) para as concentrações de açúcar total (glicose + frutose) de 131 ± 5,7 g.L <sup>-1</sup> , 106 ± 1,2 g.L <sup>-1</sup> , 74 ± 2,8 g.L <sup>-1</sup> . ....	58

- Figura 13 – Perfis da produção de 2-FE representados em termos de concentração (A) e em massa (B) do sistema de batelada alimentada a 35 °C, 250 rpm, aeração de 2 L.min<sup>-1</sup> utilizando suco de caju suplementado com 3,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe e adicionado de glicose (50 g.L<sup>-1</sup>) em tempos pré-estabelecidos. (♦) 2-FE; (■) Biomassa e (●) Glicose + Frutose. .... 63
- Figura 14 - Efeito da concentração de L-Phe no crescimento celular (A), produção de 2-FE (B) e consumo de açúcar total (C), para os cultivos realizados a 35 °C, 250 rpm, aeração de 2 L.min<sup>-1</sup> utilizando suco de caju nas concentrações de açúcar total (glicose + frutose) de 133 ± 2,4 g.L<sup>-1</sup>. Concentrações de L-fenilalanina de 1,0 g.L<sup>-1</sup> (■); 3,0 g.L<sup>-1</sup> (■); 4,0 g.L<sup>-1</sup> (■) e 10,0 g.L<sup>-1</sup> (■). .... 68
- Figura 15 - Velocidades específicas de crescimento ( $\mu_X$ ), consumo de substrato ( $\mu_S$ ) e produção de 2-FE ( $\mu_P$ ) para os cultivos realizados a 35 °C, 250 rpm, aeração de 2 L.min<sup>-1</sup> para as concentrações de 1,0 (■), 3,0 (■), 4,0 (■) e 10,0 (■) g.L<sup>-1</sup> de L-fenilalanina, utilizando suco de caju integral. .... 70
- Figura 16 - Perfil das velocidades específicas de crescimento  $\mu_X$  (■), consumo de substrato  $\mu_S$  (■) e produção de 2-FE  $\mu_P$  (■) para os cultivos realizados a 35 °C, 250 rpm, aeração de 2 L.min<sup>-1</sup>, utilizando suco de caju nas concentrações de açúcar (glicose + frutose) de 133 ± 2,4 g.L<sup>-1</sup>, para concentrações de 1,0 g.L<sup>-1</sup> (A); 3,0 g.L<sup>-1</sup> (B); 4,0 g.L<sup>-1</sup> (C) e 10,0 g.L<sup>-1</sup> (D) de L-Phe. .... 71
- Figura 17 - Máxima concentração de biomassa  $X_{m\acute{a}x}$  (■) e produção  $P_{m\acute{a}x}$  (■) para os cultivos a 35 °C, 250 rpm, aeração de 2 L.min<sup>-1</sup>, realizados com suco integral (133 ± 2,4 g.L<sup>-1</sup>) nas concentrações de 1,0, 3,0, 4,0 e 10 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe. .... 73
- Figura 18 - Fluxo metabólico de L-Phe no meio intracelular da *K. marxianus*. .... 77
- Figura 19 - Massa de 2-FE produzida no reator mais a massa 2-FE arrastada pela corrente de ar do reator (frasco) para os cultivos realizado a 35 °C e 250 rpm com aeração de 4,0 L.min<sup>-1</sup> e 8,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe (A); cultivo realizado a 35 °C e 250 rpm com aeração de 5,0 L.min<sup>-1</sup> e 10,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe (B). 2-FE no reator (♦) e 2-FE no frasco (♦). .... 79
- Figura 20 - Perfis dos cultivos em diferentes concentrações de açúcares (glicose e frutose). 131 g, L<sup>-1</sup> (A); 106 g.L<sup>-1</sup> (B) e 74 g.L<sup>-1</sup> (C). Biomassa (■), glicose (●) e 2-FE (♦). .... 88
- Figura 21 - Perfis dos cultivos realizados para as variações de L-Phe. 1,0 g, L<sup>-1</sup> (A); 3,0 g.L<sup>-1</sup> (B); 4,0 g.L<sup>-1</sup> (C) e 10,0 g.L<sup>-1</sup>. Biomassa (■), glicose (●) e 2-FE (♦). .... 89

Figura 22 - Perfis dos cultivos realizados sob aeração de 4,0 L.min <sup>-1</sup> e 8,0 g.L <sup>-1</sup> de L-Phe (A); cultivo realizado sob aeração de 5,0 L.min <sup>-1</sup> e 10,0 g.L <sup>-1</sup> de L-Phe (B). Biomassa (■), glicose (●) e 2-FE (◆). .....	91
Figura 23 - Perfis cinético dos cultivos realizado sob aeração de 4,0 L.min <sup>-1</sup> e 8,0 g.L <sup>-1</sup> de L-Phe (A) e cultivo realizado sob aeração de 5,0 L.min <sup>-1</sup> e 10,0 g.L <sup>-1</sup> de L-Phe (B). Velocidades específicas de crescimento $\mu_X$ (■), consumo de substrato $\mu_S$ (■) e produção de 2-FE $\mu_P$ (■). .....	92

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Compostos aromáticos agrupados por classes químicas. ....	21
Tabela 2 - Compostos de aroma de impacto produzidos por micro-organismos.....	24
Tabela 3 - Propriedades físico-químicas do 2-FE.....	26
Tabela 4 - Produção de 2-FE por <i>K. marxianus</i> a partir de excedentes da agroindústria.....	35
Tabela 5 - Características e composição do suco de caju. ....	39
Tabela 6 - Conteúdo de aminoácidos do suco de caju. ....	39
Tabela 7- Rendimento em biomassa, $Y_{X/S}$ ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), rendimento de 2-FE, $Y_{P/S}$ ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), produtividade de 2-FE $Q_P$ ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ), produtividade de biomassa $Q_X$ ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) e máxima velocidade específica de crescimento $\mu_{X\text{máx}}$ ( $\text{h}^{-1}$ ) para as concentrações de açúcar total (glicose + frutose) de $131 \pm 5,7$ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; $106 \pm 1,2$ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; $74 \pm 2,8$ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ nos cultivos realizados a $35$ °C, 250 rpm, aeração de $2$ $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ e $3,0$ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de L-Phe..	60
Tabela 8 - Taxas específicas e consumo total de consumo de oxigênio em 60 horas de cultivo para as concentrações de açúcar total (glicose + frutose) de $131 \pm 5,7$ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; $106 \pm 1,2$ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; $74 \pm 2,8$ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ nos cultivos realizados a $35$ °C, 250 rpm, aeração de $2$ $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ e $3,0$ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de L-Phe.....	62
Tabela 9- Rendimento em biomassa, $Y_{X/S}$ ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), rendimento de 2-FE, $Y_{P/S}$ ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), produtividade de 2-FE $Q_P$ ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ), produtividade de biomassa $Q_X$ ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) e máxima velocidade específica de crescimento $\mu_{X\text{máx}}$ ( $\text{h}^{-1}$ ) para as concentrações de $1,0$ ; $3,0$ ; $4,0$ e $10,0$ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de L-Phe para os cultivos realizados com suco integral ( $133 \pm 2,4$ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), $35$ °C, 250 rpm e aeração de $2$ $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ .....	74
Tabela 10 - Estequiometria da reação de conversão da L-Phe a 2-FE para as concentrações de $1,0$ ; $3,0$ ; $4,0$ e $10,0$ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de L-Phe nos cultivos realizados com suco integral ( $133 \pm 2,4$ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), $35$ °C, 250 rpm e aeração de $2$ $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ .....	76
Tabela 11 - Taxas específicas de consumo de oxigênio e consumo total de oxigênio em 60 horas de cultivo para as concentrações de $1,0$ ; $3,0$ ; $4,0$ e $10,0$ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de L-Phe nos cultivos realizados com suco integral ( $133 \pm 2,4$ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), $35$ °C, 250 rpm e aeração de $2$ $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ .....	78

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FE	Feniletanol
FEA	Fenilacetato
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ISPR	<i>In Situ Product Removal</i>
L-Phe	L-fenilalanina
pH	Potencial hidrogeniônico
Rpm	Rotação por minuto
TCA	<i>Tricarboxylic Acid Cycle</i>
UV	Ultravioleta
Vvm	Volume de ar por volume de meio, por minuto

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>20</b>
<b>2.1</b>	<b>Compostos Aromáticos .....</b>	<b>20</b>
<b>2.2</b>	<b>Produção de aromas por métodos microbiológicos .....</b>	<b>22</b>
2.2.1	<i>Compostos primários e secundários.....</i>	22
2.2.2	<i>Métodos microbiológicos.....</i>	22
<b>2.3</b>	<b>Álcool 2-Feniletílico .....</b>	<b>25</b>
2.3.1	<i>Produção de 2-FE.....</i>	26
2.3.1.1	<i>Extração natural de 2-FE.....</i>	26
2.3.1.2	<i>Produção de 2-FE por síntese química .....</i>	27
2.3.1.3	<i>Produção Biotecnológica de 2-FE .....</i>	28
2.3.1.4	<i>Produção de 2-FE pela Via de Ehrlich.....</i>	28
2.3.1.5	<i>Produção de 2-FE pela Via Xikimato .....</i>	29
<b>2.4</b>	<b>Fatores que influenciam na produção de 2-FE .....</b>	<b>32</b>
<b>2.5</b>	<b>Micro-organismos produtores de 2-FE.....</b>	<b>33</b>
2.5.1	<i>Kluyveromyces marxianus.....</i>	34
<b>2.6</b>	<b>A cultura do Caju .....</b>	<b>36</b>
2.6.1	<i>Aplicações do caju em bioprocessos.....</i>	39
<b>2.7</b>	<b>Remoção do produto <i>in situ</i> (ISPR) .....</b>	<b>42</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
<b>3.1</b>	<b>Micro-organismo.....</b>	<b>43</b>
<b>3.2</b>	<b>Meio de cultivo .....</b>	<b>44</b>
<b>3.3</b>	<b>Preparo do inóculo.....</b>	<b>44</b>
<b>3.4</b>	<b>Condições gerais para a produção de 2-FE .....</b>	<b>44</b>
<b>3.5</b>	<b>Métodos analíticos .....</b>	<b>45</b>
3.5.1	<i>Concentração de biomassa.....</i>	45
3.5.2	<i>Concentração dos açúcares (glicose e frutose).....</i>	45
3.5.3	<i>Concentração do produto (2-FE).....</i>	45
3.5.4	<i>Parâmetros cinéticos e rendimentos estudados no processo.....</i>	46
3.5.4.1	<i>Taxas específicas de crescimento celular, produção e consumo de açúcar total ..</i>	46
3.5.4.2	<i>Rendimento de Biomassa e produto.....</i>	46
3.5.4.3	<i>Máxima concentração de biomassa e de 2-FE.....</i>	47

3.5.4.4	<i>Produtividade volumétrica de 2-FE e de células.....</i>	47
3.5.4.5	<i>Produtividade de Biomassa .....</i>	47
3.5.5	<i>Cálculo da máxima taxa específica de consumo de oxigênio e consumo total .....</i>	47
3.5.6	<i>Análise dos dados.....</i>	48
4	<b>EFEITO DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE AÇÚCAR (GLICOSE E FRUTOSE) DO SUCO DE CAJU PARA PRODUÇÃO DE 2-FE .....</b>	48
4.1	<b>Introdução .....</b>	48
4.2	<b>Material e Métodos .....</b>	49
4.2.1	<i>Curva de crescimento da <i>K. marxianus</i> ATCC 36907.....</i>	49
4.2.2	<i>Análise do efeito da concentração inicial de açúcar (glicose e frutose) do suco de caju na produção de 2-FE.....</i>	50
4.2.3	<i>Efeito da produção de 2-FE em batelada alimentada.....</i>	50
4.2.4	<i>Métodos analíticos .....</i>	50
4.3	<b>Resultados e Discussão .....</b>	51
4.3.1	<i>Curva de crescimento da <i>K. marxianus</i> ATCC 36907.....</i>	51
4.3.2	<i>Influência da concentração inicial de açúcar (glicose e frutose).....</i>	52
4.3.3	<i>Efeito da produção de 2-FE em batelada alimentada.....</i>	62
4.4	<b>Conclusão .....</b>	65
5	<b>INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE L-PHE NO SUCO DE CAJU PARA PRODUÇÃO DE 2-FE.....</b>	65
5.1	<b>Introdução .....</b>	65
5.2	<b>Material e Método.....</b>	66
5.2.1	<i>Influência da concentração de L-fenilalanina (L-Phe) no suco de caju para a produção de 2-FE .....</i>	66
5.2.2	<i>Massa de 2-FE no meio e massa arrastada pela corrente gasosa .....</i>	67
5.2.3	<i>Métodos analíticos .....</i>	67
5.3	<b>Resultados e Discussão .....</b>	68
5.3.1	<i>Influência da concentração de L-Phe no suco de caju para a produção de 2-FE .....</i>	68
5.3.2	<i>Massa de 2-FE no meio e massa arrastada pela corrente gasosa .....</i>	78
5.4	<b>Conclusão .....</b>	80
6	<b>CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	80
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	81

<b>ANEXO A – PERFIS COMPLETO DOS CULTIVOS REALIZADOS.....</b>	<b>88</b>
<b>ANEXO B – PERFIS DAS CINÉTICAS DOS CULTIVOS REALIZADOS PARA AS VARIAÇÕES DE O<sub>2</sub> E L-PHE .....</b>	<b>92</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os aromas são compostos que atribuem características sensoriais a diversos produtos da indústria de alimentos, de cosméticos e perfumes. Além de conferir aroma, esses compostos também podem ser utilizados como emolientes, surfactantes, antioxidantes na formulação de produtos farmacêuticos, como shampoos e cremes antienvhecimento (GUPTA; PRAKASH; GUPTA, 2015; SÁ *et al.*, 2017).

Esses compostos aromáticos podem ser produzidos por síntese química, a partir da extração de plantas superiores, bem como podem ser produzidos por meio de micro-organismos durante processos de fermentação (TYLEWICZ; INCHINGOLO; RODRIGUEZ-ESTRADA, 2017).

Dentre os aromas produzidos por processo microbiológico, como a vanilina, cumarina, pirazina, o 2-feniletanol (2-FE) apresenta um grande interesse industrial (XU; HUA; MA, 2007). O 2-FE é um álcool aromático que apresenta um odor característico de rosas e representa uma das substâncias voláteis mais significativas comercialmente (MEI; MIN; LÜ, 2009). Esse composto pode ser utilizado como aditivo na indústria de alimentos, cosméticos e perfumaria (GUPTA; PRAKASH; GUPTA, 2015).

A produção natural de 2-FE ocorre a partir da extração do óleo essencial de flores, mas principalmente de rosas. Porém, os rendimentos não são favoráveis e não justificam o elevado custo de extração (ETSCHMANN; SELL; SCHRADER, 2004; OLIVEIRA, 2010). No mercado mundial, a maior parte do 2-FE é sintetizado quimicamente por meio de reações catalíticas que utilizam compostos tóxicos e poluentes, e sua pureza nem sempre é elevada (MEI; MIN; LÜ, 2009). Apesar disso, a síntese química apresenta vantagens no custo de produção sendo 250 vezes menos onerosa que a produção natural (ETSCHMANN; SELL; SCHRADER, 2004).

Tendo em vista essas questões, a produção do 2-FE por vias biotecnológicas tem se mostrado um processo alternativo e promissor, e é uma forma de minimizar os custos, uma vez que a produção de 2-FE por extração natural tem um valor em torno de US\$ 1000 / kg (XU; HUA; MA, 2007).

A síntese de 2-FE por métodos microbiológicos pode ocorrer a partir de duas rotas independentes, sendo uma delas a síntese *de novo*, utilizando a via do xikimato, porém a produção por essa via é geralmente muito baixa. A outra via utilizada para a produção de 2-FE é a via de Ehrlich, que em condições aeróbicas é mais eficiente quando o aminoácido L-fenilalanina é adicionado ao meio de cultivo e, portanto, mais atraente industrialmente. Nessa

rota, os micro-organismos são capazes de metabolizar a L-fenilalanina pela transaminação do aminoácido a fenilpiruvato, seguida da descarboxilação em fenilacetaldeído e a redução em 2-FE (ETSCHMANN *et al.*, 2002).

Algumas espécies de fungos já demonstraram ter potencial para a produção de 2-FE, como *Geotrichum penicillatum*, *Phellinus ignarius*, *P. laevigatus* e *P. tremulae* (ETSCHMANN *et al.*, 2002), mas as leveduras são mais conhecidas pelo seu papel na produção desse aroma. Algumas espécies de leveduras como *Kluyveromyces marxianus*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia fermentans* são capazes de produzir quantidades relevantes 2-FE, dependendo da composição do meio e das condições do cultivo (ANGELOV; GOTCHEVA, 2012).

Dentre as leveduras produtoras de 2-FE, a cepa *K. marxianus* apresenta um bom desempenho para a elaboração desse composto, pois é uma cepa reconhecida como segura, ou seja, não patogênica (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1985). Essa levedura mostra uma capacidade de metabolizar um amplo espectro de substratos, possui um efeito Crabtree-negativo, que é uma vantagem, pois implica na reduzida produção de etanol em condições aeróbias, diminuindo assim a inibição do crescimento do micro-organismo e conseqüentemente não interferindo na produção de 2-FE (FONSECA *et al.*, 2008). Diante disso, vários estudos foram realizados utilizando a cepa *K. marxianus* para a produção de 2-FE (ETSCHMANN; SELL; SCHRADER, 2003; GARAVAGLIA *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2013b; GÜNEŞER *et al.*, 2016; CONDE-BÁEZ *et al.*, 2017; PALITOT, 2017).

Apesar da produção de 2-FE por bioprocessos representar uma alternativa para evitar os problemas causados na produção química, ainda são apresentados baixos rendimentos, provavelmente pelas condições operacionais que influenciam na produção de 2-FE. Essas condições de processo, como a temperatura, pH do meio, agitação, aeração, a fonte carbono utilizada, têm sido avaliadas para aumentar a produção de 2-FE, além da extração do produto *in situ* para evitar o efeito inibitório sobre o micro-organismo. A remoção do produto pode ocorrer por métodos de adsorção, extração de duas fases, imobilização de solvente e pervaporação organofílica, cuja aplicação depende principalmente da natureza do produto (PEREZ, 2001; ETSCHMANN; SELL; SCHRADER, 2004; FLAGFELDT *et al.*, 2009; HUA; XU, 2011).

Os custos dos processos biotecnológicos dependem dos preços dos substratos, reagentes, equipamentos e purificação do produto final. Para minimizar os custos da produção, fontes alternativas de carbono devem ser testadas. Uma diversidade de matérias-primas oriundas da agroindústria pode ser utilizada como fonte de carbono para o desenvolvimento de

tecnologias de bioprocessos. Em resumo, essas matérias-primas são agrupadas em função de sua estrutura e complexidade molecular, por exemplo, algumas encontram-se na sua forma polimérica e é necessário hidrolisar para que o agente biológico possa utilizá-las (JÚNIOR; BON; FERRARA, 2008).

De fato, é oportuno utilizar subprodutos remanescentes da agroindústria como fonte de carbono para síntese de metabólitos, visando minimizar os custos de produção, bem como o aproveitamento desses subprodutos para adição de valor. Além disso, a produção microbiológica não constitui uma fonte importante de poluição e, conseqüentemente é preferível para superar os problemas ambientais decorrentes de métodos químicos (SINGH *et al.*, 2017).

O caju (*Anacardium occidentale* L.) é uma cultura agrícola economicamente disponível em muitos países. O caju é composto pela amêndoa da castanha que representa o real fruto e pelo pedúnculo denominado pseudofruto, o qual representa 90 % do caju em termos de massa. A castanha do caju é o principal produto explorado e o pedúnculo ainda é pouco aproveitado, o qual representa cerca de 10 a 15 toneladas de subproduto agrícola para cada tonelada de castanha de caju produzida (DAS; ARORA, 2017). Apenas 12 % do total dos pedúnculos obtidos, a partir da extração da castanha, pode ser consumido fresco ou processado em outros produtos (KAPRASOB *et al.*, 2017). O suco extraído a partir do pedúnculo é rico em açúcares redutores, vitaminas, minerais e aminoácidos (SILVEIRA *et al.*, 2012).

O desenvolvimento de diversos estudos utilizando o pedúnculo de caju como matéria-prima tem sido alvo nos últimos anos do Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos (GPBio). Por exemplo, na produção de etanol de segunda geração (ROCHA *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2015; BARROS *et al.*, 2017), produção de xilitol (ROCHA *et al.*, 2014; ALBUQUERQUE *et al.*, 2015), biossurfactante (ROCHA *et al.*, 2006; ROCHA, 2007) e mais recentemente a produção de 2-FE a partir do suco de caju (PALITOT, 2017).

Embora a produção de 2-FE utilizando meio de cultura convencional tenha sido amplamente estudada, poucas são as pesquisas sobre a produção desse aroma em diferentes fontes renováveis de carbono (ETSCHMANN; SELL; SCHRADER, 2003; GARAVAGLIA *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2013b; GÜNEŞER *et al.*, 2016).

Nesse contexto, os objetivos deste trabalho visam avaliar a biossíntese de 2-FE por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 utilizando o suco de caju em diferentes concentrações dos açúcares redutores (glicose e frutose), bem como estudar o efeito das concentrações de L-fenilalanina no meio de produção. Além disso, analisar a biossíntese de 2-FE em batelada alimentada e calcular a massa de 2-FE arrastada pela corrente de gás, com o objetivo de

umentar o rendimento da produção. Para isso, os principais parâmetros cinéticos e de conversão foram avaliados para identificar as melhores condições para a produção de 2-FE.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Compostos Aromáticos

Os compostos aromáticos se apresentam como uma das principais características sensoriais dos alimentos, os quais afetam a preferência e aceitação do consumidor. Tais compostos podem estar naturalmente presentes em certos alimentos por consequência de processos fisiológicos e/ou enzimáticos, ou podem ser formados por micro-organismos durante processos de fermentação de produtos lácteos, bebidas alcoólicas e produtos de panificação (TYLEWICZ; INCHINGOLO; RODRIGUEZ-ESTRADA, 2017). Os aromas também podem ser produzidos por síntese química ou por extração de plantas superiores (GUPTA; PRAKASH; GUPTA, 2015).

Os compostos aromáticos são moléculas orgânicas presentes em fase fluida, caracterizadas por apresentar baixo peso molecular ( $< 400$  Da), alta volatilidade e capacidade de interação com receptores olfativos. As principais classes desses compostos são; os alcoóis, aldeídos, cetonas, ésteres, terpenos e lactonas (BUZZINI *et al.*, 2005; TYLEWICZ; INCHINGOLO; RODRIGUEZ-ESTRADA, 2017). Esses compostos apresentam propriedades emolientes, surfactantes, antioxidantes e podem ser empregados como aditivos no aprimoramento sensorial de alimentos e bebidas, ou na formulação de cosméticos, detergentes e produtos farmacêuticos (GUPTA; PRAKASH; GUPTA, 2015). Algumas classes desses compostos aromáticos são apresentadas na Tabela 1.

Os primeiros processos de obtenção de aromas eram realizados a partir da extração de fontes naturais (biomassa vegetal) e por meio de fermentação, e esses métodos foram os únicos realizados por muitos séculos. Com o desenvolvimento da química orgânica e com a melhoria do conhecimento analítico, iniciou-se a produção de aromas por síntese química, de modo que a cumarina (1868) e a vanilina (1874) foram os primeiros compostos sintéticos de fragrâncias produzidos (SERRA; FUGANTI; BRENNNA, 2005).

Com o progresso da produção sintética de aromas, o mercado anual teve um forte avanço, e no ano de 2015 a produção foi avaliada em torno de US\$ 26,0 bilhões. Estima-se que esse mercado apresente um aumento para US\$ 37,0 bilhões até 2021, com uma taxa de crescimento de 6,4% ao ano (MARTÍNEZ *et al.*, 2017; SÁ *et al.*, 2017).

Tabela 1 - Compostos aromáticos agrupados por classes químicas.

<b>Classes Químicas</b>	<b>Compostos</b>
<b>Cetonas</b>	acetona, 2-butanona, 2-pentanona, 3-pentanona, 2-hexanona, 2-heptanona, 2-octanona, 2-nonanona, 2-undecanona, 2-tridecanona, acetofenona, 2,3-butanodiona, 2,3-pentandiona, 3-hidroxi-2-butanona, 3-metil-2-butanona, 4-metil-2-pentanona, 2,5-dimetil-4-hidroxi-3 (2H)-furanona.
<b>Aldeídos</b>	acetaldeído, propanal, butanal, pentanal, hexanal, isohexanal, heptanal, octanal, nonanal, decanal, 2-metilpropanal, 2-metilbutanal, 3-metilbutanal, propenal, 2-hexenal, (Z)-4-heptenal, (Z)-2-nonenal, (E)-2-nonenal, (E, E) - 2,4-nonadienal.
<b>Ésteres</b>	acetato de metila, acetato de etila, acetato de 3-octila, acetato de pentila, acetato de feniletila, acetato de 2-metil-1-butila, acetato de 3-metil-1-butila,
<b>Alcoóis</b>	etanol, feniletanol, 2-feniletanol, 2-metilpropanol, 2-butanol, isobutanol, 2-metilbutanol, 3-metilbutanol, 2-etilbutanol, 1,2-butanodiol, 2,3-butanodiol, 1-pentanol, 1-hexanol, 2-heptanol, 2-octanol, 1-nonanol, 2-nonanol, 1-octen-3-ol, (Z)-1,5-octadien-3-ol.
<b>Terpenos</b>	$\alpha$ -Pinenos, $\beta$ -pinenos, limoneno, carvonas, carveolos, dihidrocarvonas, dihidrocarveóis, perilaldeído, álcool perílico, $\alpha$ -metil-cinamaldeído, myrtenal, geraniol, nerol.

Fonte: Adaptado de Forti *et al.* (2018).

Na síntese química dos aromas as quantidades produzidas são mais elevadas e de forma menos onerosa, mas esse substituto do natural geralmente não apresenta a mesma qualidade. Além disso, atualmente, os consumidores apresentam uma preferência por produtos naturais e isso incentivou uma parte crescente das comunidades científicas a desenvolver novos processos para produzir essas moléculas aromatizantes (MARTÍNEZ *et al.*, 2017).

Na produção de aroma por extração direta de materiais botânicos, o custo é dispendioso e está sujeito a alguns problemas, como o lento crescimento dos tecidos vegetais, a baixa concentração dos compostos desejados, a influência das condições climáticas e doenças nas plantas. Portanto, esses compostos extraídos a partir de fontes naturais podem não satisfazer o mercado e por isso fontes alternativas são necessárias (XU; HUA; MA, 2007).

Uma via de substituição do processo por síntese química é a produção do aroma a partir da biossíntese microbiana ou bioconversão de nutrientes, como açúcares e aminoácidos. Os compostos de aroma são resultantes, principalmente, do metabolismo secundário dos microorganismos durante o bioprocessamento (MARTÍNEZ *et al.*, 2017). A biossíntese de aromas durante a fermentação garante uma produção com qualidade, a qual independe das condições climáticas ou fatores ambientais (GUPTA; PRAKASH; GUPTA, 2015).

## 2.2 Produção de aromas por métodos microbiológicos

### 2.2.1 Compostos primários e secundários

A síntese microbiana está se tornando um processo que cada vez mais substitui os processos de síntese química. Os produtos do metabolismo microbiano incluem vitaminas, aminoácidos, ácidos orgânicos, metabólitos importantes para agricultura, enzimas, agentes aromatizantes, corantes e produtos farmacêuticos (DEMAIN, 2007).

Conforme as células microbianas crescem durante o cultivo, elas quebram fontes complexas de carbono por meio de enzimas catabólicas, e os produtos finais do catabolismo são agrupados para formar intermediários primários. Os compostos e enzimas do metabolismo primário desempenham papéis fisiológicos durante a fase exponencial do micro-organismo, ou seja, esses compostos são produzidos associados ao crescimento (DREW; DEMAIN, 1977)

Certos micro-organismos possuem genes responsáveis para a produção de metabólitos secundários, além dos necessários para o crescimento. Sob estresse metabólico, quando a taxa de crescimento diminui, os intermediários primários podem induzir vias para formar metabólitos secundários (DREW; DEMAIN, 1977). A diversidade estrutural dos metabólitos secundários é estabelecida por conversões de moléculas precursoras adicionadas ao meio de cultivo e, às vezes, por condensação com outros intermediários derivados de rotas metabólicas centrais. A introdução de oxigênio, nitrogênio, cloro ou enxofre, e mudanças no nível de oxidação também podem alterar o tipo de metabólito produzido (MALIK, 1980).

Geralmente esses compostos secundários são resultados da desintoxicação que as células desenvolvem por lidar com condições desfavoráveis ao ambiente de cultivo, por exemplo, alta concentração de nutrientes ou outros metabólitos (SERRANO-CARREÓN, 2003).

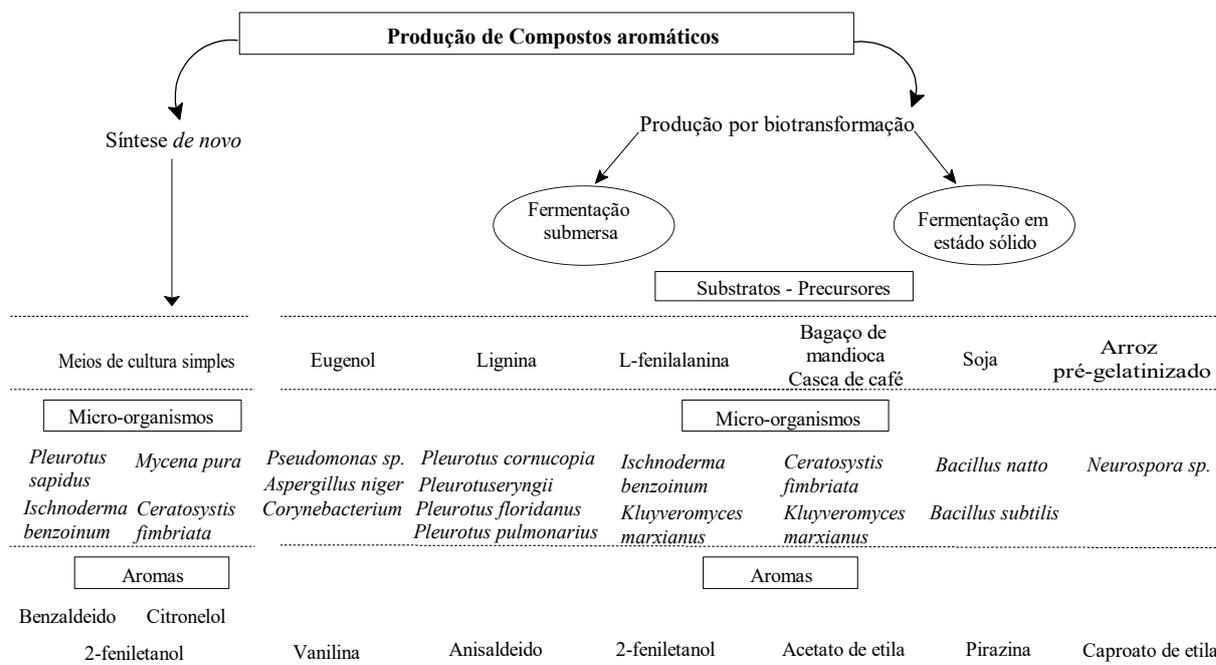
Os metabólitos secundários são compostos que se formam moderadamente durante o crescimento logarítmico, mas que tem melhor produção na fase estacionária e não estão diretamente associados ao crescimento, desenvolvimento e replicação do micro-organismo (DEMAIN, 1999).

### 2.2.2 Métodos microbiológicos

Os métodos microbiológicos utilizados na síntese de aromas podem ser divididos em síntese *de novo* e biotransformação. Na síntese *de novo* a produção do aroma ocorre a partir da metabolização de meios de culturas simples, enquanto na biotransformação o micro-

organismo selecionado deve ser cultivado sob condições que beneficiem a produção do aroma pretendido, ou seja, é necessário adicionar um precursor para a biossíntese da molécula. (BEN AKACHA; GARGOURI, 2015). A Figura 1 ilustra alguns exemplos de aromas produzidos.

Figura 1 - Exemplos de compostos aromáticos produzidos por métodos microbiológicos.



Fonte: Adaptado de Ben Akacha e Gargouri (2015).

Provavelmente, mais de 1000 micro-organismos foram relatados por produzir compostos aromáticos. Estima-se que existam mais de 100 compostos de aroma impactantes produzidos por bioprocessos no mercado (BEN AKACHA; GARGOURI, 2015). A Tabela 2 apresenta alguns componentes aromáticos produzidos por micro-organismos.

Tabela 2 - Compostos de aroma de impacto produzidos por micro-organismos.

<b>Micro-organismos</b>	<b>Compostos aromáticos</b>
<b>Bactérias</b>	
<i>Amycolatopsis, Pseudomonas</i>	Vanilina, guaiacol (baunilha)
<i>Brevibacterium, Micrococcaceae</i>	Tioestéres
<i>Lactobacillus lactis, Streptococcus diacetylactis</i>	Butanediona
<i>Leuconostoc citrovorum, Enterobacter</i>	Ácidos graxos de cadeia curta
<i>Acetobacter aceti, Gluconobacter oxydans,</i>	
<i>Propionibacterium, Clostridium, Lactococcus</i>	Geosmina
<i>Streptomyces citreus</i>	Pirazinas
<i>Bacillus, Pseudomonas, Streptomyces</i>	2-acetil-1-pirrolina
<i>Bacillus cereus</i>	Álcool cinamílico
<i>Escherichia coli (recombinant)</i>	Ácido perílico
<i>Pseudomonas, Bacillus</i>	
<b>Leveduras</b>	
<i>Candida, Pichia, Saccharomyces, Geotrichum,</i>	Ácidos carboxílico, ésteres
<i>Saccharomycopsis, Rhodotorula, Yarrowia, Hansenula</i>	Metilbutanois, fenilacetaldeído
<i>Kluyveromyces</i>	Feniletanol e ésteres de feniletilo
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Citronelol, geraniol, linalool
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Furaneol
<b>Fungos</b>	
<i>Ceratocystis</i>	Monoterpenóis
<i>Bjerkandera, Trametes, Polyporus</i>	Benzaldeído
<i>Ischnoderma benzoinum</i>	4-Metoxibenzaldeído
<i>Pycnoporous cinnabarinus</i>	Antranilato de metilo, vanilina
<i>Nidula niveo-tomentosa</i>	4-(4-Hidroxifenil) -2-butanona
<i>Phellinus</i>	Salicilato de metilo
<i>Pleurotus euosmus</i>	Cumarinas
<i>Trichoderma harzianum</i>	6-Pentil- $\alpha$ -pirona
<i>Aspergillus, Penicillium</i>	Metil cetonas

Fonte: Adaptado de Berger e Krings (2014).

Os fungos filamentosos, especialmente basidiomicetos, possuem características de produzir compostos aromatizados quimicamente idênticos aos encontrados nas plantas superiores. Esses fungos já comprovaram serem capazes de produzir aromas usando a síntese *de novo* e a biotransformação de precursores específicos. *Ceratocystis fimbriata* e *Ceratocystis moniliformis* são conhecidos por produzirem uma ampla gama de aromas complexos, tais como: aromas de pêssego, banana, pera, rosa ou citros. Os fungos filamentosos já demonstraram ter habilidade para a valorização de subprodutos da agroindústria na produção de compostos aromáticos (BOSSE; FRAATZ; ZORN, 2013). Bosse, Fraatz e Zorn (2013) utilizando bagaço

de maçã, conseguiram demonstrar que os produtos de biotransformação mais potentes formados pelo fungo *Tyromyces chioneus* foram: 3-fenilpropanal, 3-fenil-1-propanol e álcool benzílico.

Diferentes leveduras (*Candida kefir* NCYC 143, *Candida utilis* CUM, *Kluyveromyces lactis* KL 71, *Saccharomyces bayanus* SB1, *Saccharomyces cerevisiae* EC 1118, *Saccharomyces chevalieri* CCICC 1028, *Candida famata*, *Torulopsis candida* CCICC 1041 e *Williopsis saturnus var. saturnus* CBS 254) foram selecionadas quanto à capacidade de produzir aroma 3-(Metiltiol)-1-propanol utilizando creme de coco como meio de cultivo, suplementado com 0,10 % de L-metionina (SEOW; ONG; LIU, 2010).

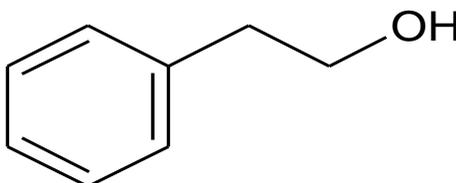
Mais recentemente, Braga e Belo (2015) estudaram a produção de  $\gamma$ -decalactona a partir de ácido ricinoleico por células de *Yarrowia lipolytica* em processo de batelada alimentada, e uma alta produtividade de  $\gamma$ -decalactona ( $215 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) foi encontrada nesse trabalho.

Dentre os aromas produzidos por métodos microbiológicos, o 2-feniletanol é considerado um componente importante na elaboração de vários produtos e tem recebido um grande destaque (XU; HUA; MA, 2007).

### 2.3 Álcool 2-Feniletílico

O 2-feniletanol (2-FE) é uma substância que possui um aroma característico de rosas e é amplamente utilizado na indústria de cosmético, perfumaria e de alimentos (MEI; MIN; LÜ, 2009). O 2-FE pode ser conhecido também como álcool feniletílico, álcool 2-feniletílico, álcool  $\beta$ -feniletílico, benzil carbinol,  $\beta$ -hidroxi-etil-benzeno (GARAVAGLIA, 2006). A Figura 2 mostra a fórmula estrutural do 2-FE e a Tabela 3 apresenta as propriedades físico-químicas.

Figura 2 - Fórmula estrutural do 2-FE.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 3 - Propriedades físico-químicas do 2-FE.

<b>Propriedades</b>	<b>Descrição</b>
Coloração	Não apresenta
Ponto de Ebulição (101.3 kPa)	219,8°C
Ponto de Fusão	-27°C
Peso Molecular	122
Densidade a 20 °C	10,202
Índice de Refração a 20 °C	15,325
Solubilidade	19 g.L <sup>-1</sup> em água a 20°C. Solúvel em álcoois, ésteres, aldeídos, benzil benzoato, óleo mineral.
Limiar de percepção de odor	12-24 ng.L <sup>-1</sup> no ar 1000 µg.L <sup>-1</sup> em água (ortonasal)

Fonte: Garavaglia (2006).

### **2.3.1 Produção de 2-FE**

O 2-FE pode ser obtido por extração natural de rosas, bem como por síntese química. No mercado mundial, a maior parte do 2-FE é sintetizado por três vias químicas; a partir da reação de *Friedel-Craf*, pela redução do óxido de estireno ou por meio da oxidação de propileno. No entanto, essas reações de síntese química do 2-FE estão associadas com a formação de subprodutos indesejados, os quais são tóxicos ao ambiente e também dificultam a purificação do produto esperado (MEI; MIN; LÜ, 2009), mesmo possuindo a vantagem de ter baixo custo, com um valor de 250 vezes menor que a produção por extração natural (ETSCHMANN; SELL; SCHRADER, 2004).

A produção de 2-FE também ocorre por processos biotecnológicos a partir das vias de síntese *de novo* e da via de Ehrlich (ETSCHMANN *et al.*, 2002).

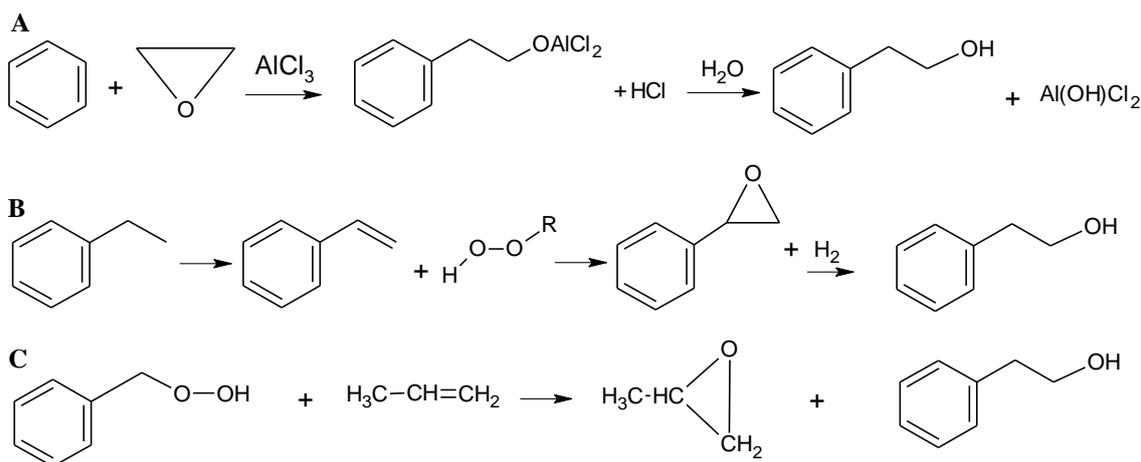
#### **2.3.1.1 Extração natural de 2-FE**

O 2-FE pode ser extraído do óleo essencial de flores como rosas, jacintos, jasmim, narcisos e lírios, mas nesses casos, os rendimentos de 2-FE não são favoráveis e não justificam os custos da extração (ETSCHMANN; SELL; SCHRADER, 2004; OLIVEIRA, 2010). Apesar do óleo essencial de rosa conter 60 % (v/v) de 2-FE, dependendo da variedade, ainda se torna uma matéria-prima de alto custo para ser utilizada na produção natural desse aroma (SCHRADER *et al.*, 2004).

### 2.3.1.2 Produção de 2-FE por síntese química

As reações de síntese química do 2-FE ocorrem por meio da oxidação de etileno com benzeno na presença de quantidades molares de cloreto de alumínio. A adição do cloreto de alumínio gera uma hidrólise liberando o 2-FE a partir da reação de *Friedel-Craft*. O 2-FE também pode ser sintetizado, a baixas temperaturas, pela redução do óxido de estireno usando níquel de *Raney* como catalisador e pequenas quantidades de hidróxido de sódio. O 2-FE pode ser também produzido como um subproduto da oxidação de propileno com hidroperóxido de 2-feniletil (ETSCHMANN *et al.*, 2002; MARTÍNEZ-AVILA *et al.*, 2018). Os detalhes das reações são apresentados na Figura 3

Figura 3 - Reação de *Friedel-Craft* para a síntese de 2-FE (A). Redução de óxido de estireno para síntese de 2-FE (B). Oxidação de propileno com hidroperóxido de 2-feniletil (C).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Em 2010, a produção anual de 2-FE no mundo foi estimada em cerca de 10.000 toneladas, cuja a maior quantidade do 2-FE produzido foi obtido por síntese química a um valor de US\$ 5 / kg, enquanto que o mesmo obtido por processo de extração natural, custa cerca de US\$ 1000 / kg (HUA; XU, 2011).

Uma alternativa aos processos químicos é a produção de 2-FE por via biotecnológica, pois não envolve o uso de reagentes tóxicos, os quais apresentam subprodutos que diminuem a qualidade final do 2-FE.

### 2.3.1.3 Produção Biotecnológica de 2-FE

A abordagem da produção biotecnológica, em geral, traz algumas vantagens, tais como condições de reação relativamente brandas, alta especificidade de substratos, redução dos problemas ambientais, e é considerada uma estratégia promissora para a produção de compostos de alto valor (XU; HUA; MA, 2007).

A produção de 2-FE por bioprocessos se torna mais eficiente por meio da bioconversão da L-fenilalanina (L-Phe) a 2-FE, utilizando as leveduras como biocatalizadores. Esta rota da bioconversão da L-Phe foi descoberta por Ehrlich (1907) e, portanto, chamada de via de Ehrlich. Dessa forma, o 2-FE produzido por via biológica pode ser rotulado como natural, tornando esse processo cada vez mais interessante (ETSCHMANN *et al.*, 2002).

### 2.3.1.4 Produção de 2-FE pela Via de Ehrlich

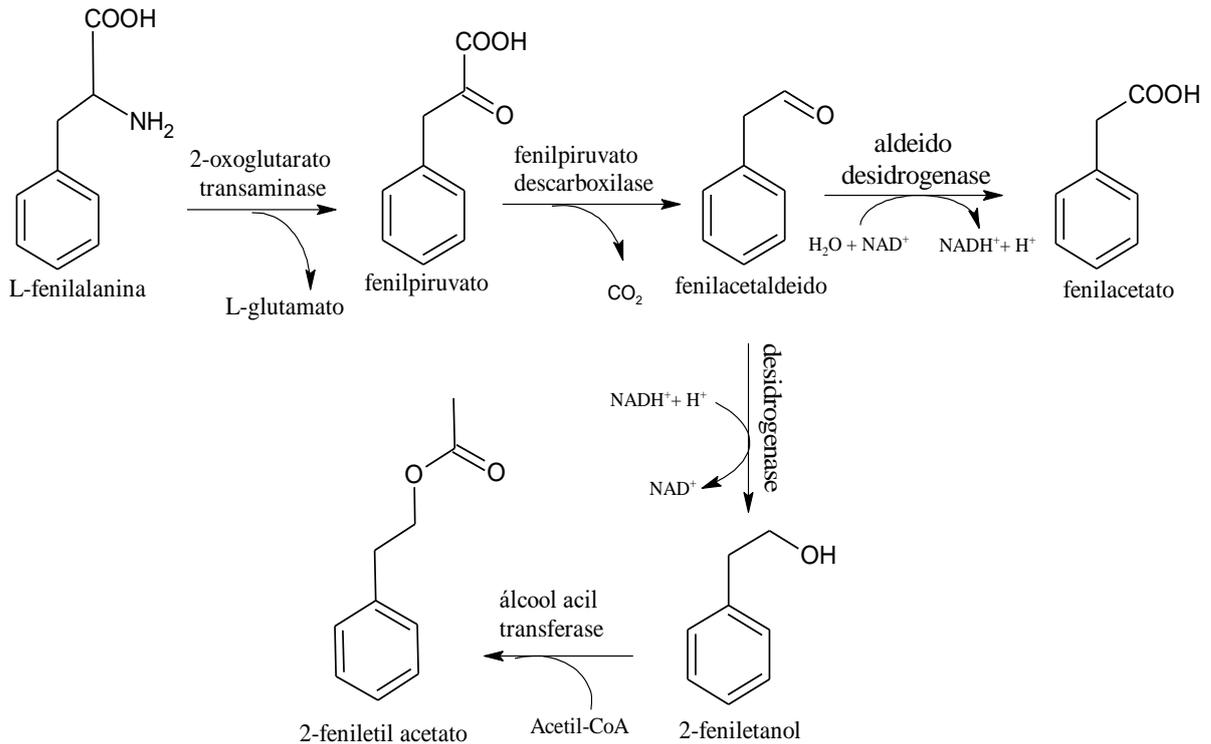
Embora os micro-organismos, especialmente leveduras, sejam capazes de produzir 2-FE, a concentração final desse aroma no meio de cultura continua sendo muito baixa. No entanto, a produção pode ser melhorada adicionando L-fenilalanina (L-Phe) no meio, a qual é convertida em 2-FE a partir do caminho de Ehrlich (HUA; XU, 2011). São necessárias concentrações relevantes de L-Phe, bem como a ausência de outras fontes de nitrogênio, para fazer com que o metabolismo das leveduras se desvie para rota de Ehrlich (WITTMANN; HANS; BLUEMKE, 2002; ESHKOL *et al.*, 2009).

Na biossíntese de 2-FE, a glicose contribui com fenilpiruvato a partir da glicólise, seguido da transformação em fenilacetaldeído, que é posteriormente convertido em 2-FE (MARTÍNEZ-AVILA *et al.*, 2018).

No entanto, quando a L-Phe está disponível no meio de cultura, a biotransformação em 2-FE segue preferencialmente por meio da rota de Ehrlich. A L-Phe é transaminada para fenilpiruvato por uma transaminase, descarboxilada a fenilacetaldeído por fenilpiruvato descarboxilase, e em seguida reduzida a 2-FE por uma desidrogenase. O fenilacetaldeído pode ser também transformado em fenilacetato em uma reação catalisada por uma desidrogenase (HUA; XU, 2011). A via de Ehrlich pode ser observada na Figura 4.

O fenilpiruvato realiza o papel principal, ele é o metabólito utilizado na rota da biossíntese da L-fenilalanina pela célula da levedura, e também na produção de 2-FE (*vide* Figura 6) (GARAVAGLIA, 2006).

Figura 4 - Via de Ehrlich para a produção de 2-FE a partir da bioconversão da L-Phe.

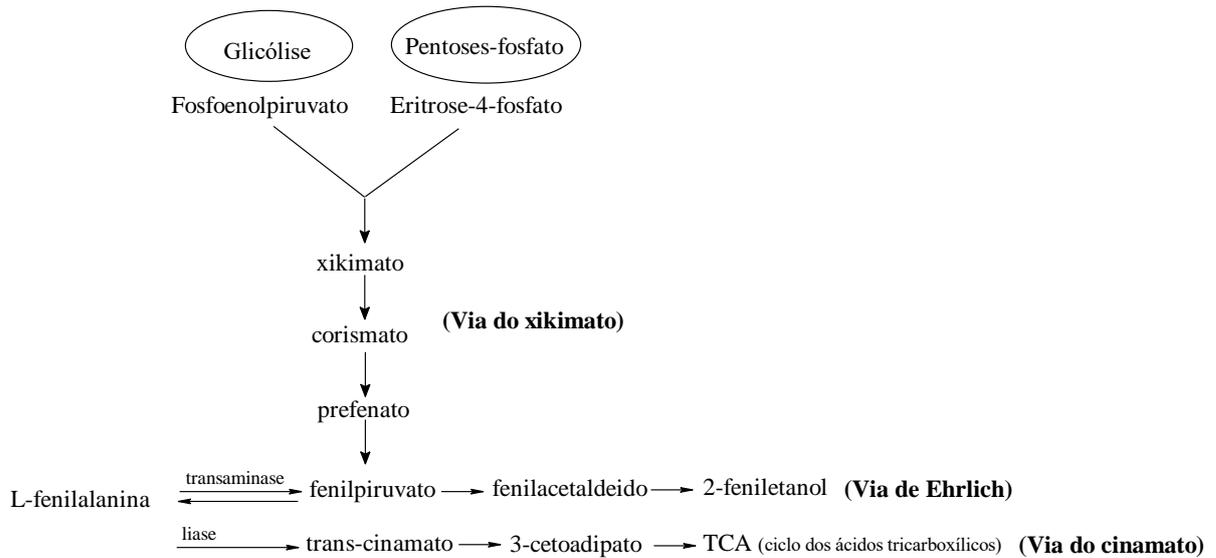


Fonte: Elaborada pelo autor.

### 2.3.1.5 Produção de 2-FE pela Via Xikimato

Outra rota para a produção de 2-FE é a partir da síntese *de novo* pela via xikimato, onde açúcares simples podem ser convertidos em 2-FE. Conforme ilustrado na Figura 5, a Eritrose-4-fosfato a partir do caminho das pentoses-fosfato e o fosfoenolpiruvato da glicólise são respectivamente condensados com o corismato e prefenato, como intermediários que conduzem ao fenilpiruvato e finalmente a 2-FE (ETSCHMANN *et al.*, 2002).

Figura 5 - Vias metabólicas microbianas associadas à L-fenilalanina.



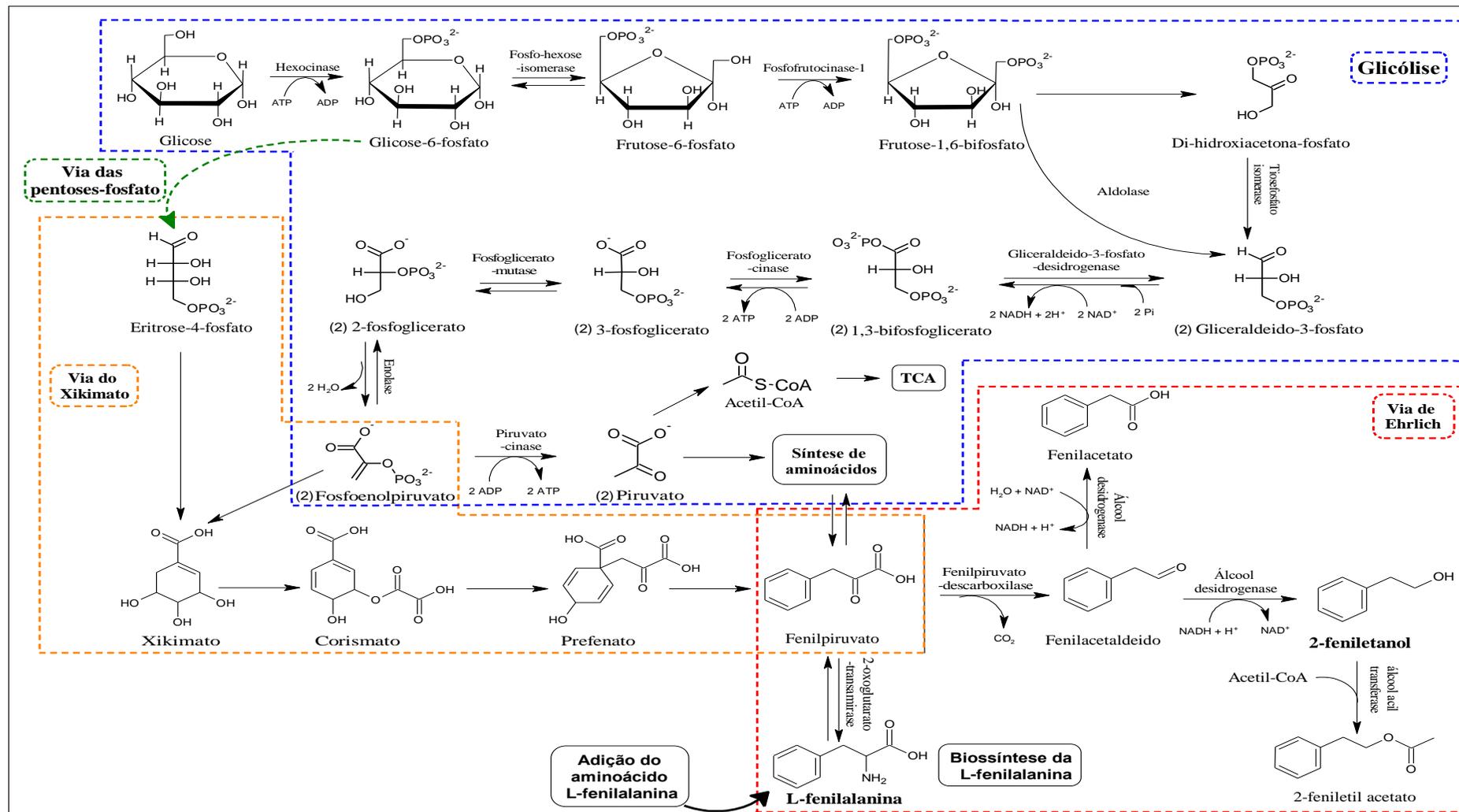
Fonte: Adaptado de Etschmann *et al.* (2002).

A principal desvantagem da síntese *de novo* na biossíntese de 2-FE é que a glicólise e a via das pentoses-fosfato são utilizadas, principalmente, para o crescimento celular, razão pela qual as quantidades relatadas de 2-FE produzidas por síntese *de novo* são muito baixas (ANGELOV; GOTCHEVA, 2012).

A L-Phe além de ser convertida em 2-FE, ela também pode ser degradada por uma liase, a partir da via do cinamato, onde é convertida em 3-cetoadipato até o ciclo dos ácidos tricarbóxicos (Figura 5). Esta via de utilização da L-Phe não é dirigida para a produção de 2-FE, o que não é desejável, então mesmo se for adicionado concentrações elevadas de L-Phe no meio, não ocorrerá a bioconversão completa da L-Phe em 2-FE (ANGELOV; GOTCHEVA, 2012).

O caminho preferencial para a produção de 2-FE irá depender da fonte de nitrogênio no meio. Quando os aminoácidos representarem a única fonte de nitrogênio, a via de Ehrlich será predominante, mas se tiver disponível fontes de nitrogênio mais facilmente digeríveis, a L-Phe será também metabolizada a partir da via cinamato, o que limitará a produção de 2-FE (ETSCHMANN *et al.*, 2002). Uma representação mais detalhada das rotas para a biossíntese de 2-FE pode ser observada na Figura 6.

Figura 6 - Vias metabólicas relacionadas à produção de 2-FE.



Fonte: Elaborada pelo autor.

## 2.4 Fatores que influenciam na produção de 2-FE

Os níveis de 2-FE produzidos durante o processo dependem de fatores fundamentais para se obter os rendimentos esperados (ETSCHMANN; SELL; SCHRADER, 2004; OLIVEIRA, 2010).

Esses fatores como, a cepa de levedura, temperatura, pH, oxigênio dissolvido, concentração inicial de L-Phe, bem como a fonte de carbono do meio de cultivo agem em conjunto sendo necessário defini-los bem para realizar a conversão de 2-FE pretendida.

Já é de conhecimento na literatura que existem valores ótimos de pH e temperatura para o crescimento de micro-organismos. Sabe-se também que as fontes mais frequentes de carbono utilizadas são glicose, sacarose e frutose. Como fonte de nitrogênio os sais de amônia, aminoácidos ou ureia são os mais regularmente usados em bioprocessos. Para cultivos que envolvem células aeróbias existe a necessidade de um adequado sistema de transferência de oxigênio, ou seja, a dissolução do oxigênio contido na fase gasosa para a fase líquida (SCHMIDELL *et al.*, 2001). Diante disso, um método para otimização das condições de cultivo envolve mudar uma variável mantendo as demais fixadas. Assim, muitos autores fizeram uso de planejamentos experimentais com o intuito de estabelecer as melhores condições para a produção de 2-FE.

Oliveira *et al.* (2015) avaliaram a produção de 2-FE por *S. cerevisiae* em resíduo líquido de fecularia (água residuária da indústria de fécula de mandioca). A fim de obter as melhores condições, os autores realizaram uma otimização variando as concentrações de carbono (glicose e frutose) e L-Phe no meio, na qual a maior concentração de 2-FE de 1,33 g.L<sup>-1</sup> foi obtida com a suplementação do meio com 20,0 g.L<sup>-1</sup> de glicose e 5,5 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe, contendo 50 mL de meio de resíduo de fecularia, em agitador regulado a 150 rpm e 24 ± 1°C.

Para a produção de 2-FE, Garavaglia *et al.* (2007) estudaram diferentes condições de pH, temperatura e concentração do aminoácido L-Phe, bem como condições de aeração e agitação. Os autores conseguiram produzir 0,77 g.L<sup>-1</sup> de 2-FE nas condições ótimas de 37 °C, concentração de 3,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe, pH 7,0, sob aeração de 1 vvm e agitação de 250 rpm por *K. marxianus* CBS 6556.

Um efeito positivo na produção de 2-FE é mais pronunciado em temperaturas na faixa de 30 °C a 35 °C (ETSCHMANN; SELL; SCHRADER, 2004). Existe uma correlação positiva entre o rendimento de 2-FE e a velocidade de agitação e aeração no meio. Nesse contexto, Palitot (2017) avaliou a aeração e a temperatura para a produção de 2-FE em suco de

caju por *K. marxianus* CCA 510, em que a melhor produção de 2-FE foi obtida nas condições ótimas de 35 °C, aeração de 2 L.min<sup>-1</sup> com uma agitação de 250 rpm.

Em relação ao micro-organismo, esse não deve exigir condições de processo muito complexas, deve-se levar em consideração as exigências para o crescimento e também os aspectos econômicos do meio de cultura.

## 2.5 Micro-organismos produtores de 2-FE

Apesar de bactérias e fungos terem demonstrado serem produtores de 2-FE, os resultados não parecem ser viáveis para ampliação em escala industrial. As leveduras, por outro lado, são bem conhecidas pelo seu papel na produção de aromas. Algumas espécies de leveduras como *Kluyveromyces marxianus*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia fermentans* são capazes de produzir 2-FE em concentrações relevantes (ANGELOV; GOTCHEVA, 2012).

Um trabalho conduzido com quinze micro-organismos, incluindo cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Clavispora lusitaniae*, *Pichia anomala*, *Pichia membranaefaciens*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromuyes marxianus* e *Zygosaccharomyces rouxii*, todas cultivadas em meio de melaço de beterraba, apresentou quatro cepas de *Kluyveromuyes marxianus* e uma cepa de *Zygosaccharomyces rouxii* como as cinco principais produtoras de 2-FE. Foi possível obter uma produção máxima de 0,89 g.L<sup>-1</sup> de 2-FE após 41 horas de cultivo pela *Kluyveromyces marxianus* CBS 600 (ETSCHMANN; SELL; SCHRADER, 2003).

Mais recentemente, a levedura *Candida glycerinogenes* WL 2002-5 foi testada quanto ao estresse causado pela acumulação de 2-FE e mostrou ser capaz de produzir 5,0 g.L<sup>-1</sup> de 2-FE em meio convencional adicionado de 7,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe (LU *et al.*, 2016).

Tian *et al.* (2015) conduziram um estudo com adição de ácido ascórbico no meio de cultivo para suprimir a geração de subprodutos durante o bioprocessamento, visando melhorar a qualidade final do 2-FE. Os autores conseguiram produzir uma concentração de 3,24 g.L<sup>-1</sup> de 2-FE usando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, e um meio convencional dispendido de 8,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe como precursor do produto.

Celińska *et al.* (2013) realizaram um estudo com a cepa *Yarrowia lipolytica* NCYC 3825 para produzir 2-FE utilizando 8,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe no meio. Os autores conseguiram obter uma produção de 2,0 g.L<sup>-1</sup> de 2-FE.

Eshkol *et al.* (2009) testaram cepas de *Saccharomyces cerevisiae* termotolerantes e resistentes a múltiplos estresses para a produção de 2-FE. Em condições ideais de processo, foi

produzido 0,9 g.L<sup>-1</sup> de 2-FE em frascos agitados e 4,5 g.L<sup>-1</sup> em biorreator. Neste estudo foi utilizado um meio convencional suplementado com 10,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe.

A toxicidade do 2-FE no meio limita sua alta produção por micro-organismos. Concentrações de 2-FE entre 2,0 g.L<sup>-1</sup> e 3,0 g.L<sup>-1</sup> reprime o crescimento de algumas espécies de bactérias, fungos e leveduras. Por exemplo, a taxa de crescimento de *S. cerevisiae* diminui em 75% quando uma concentração de 2,5 g.L<sup>-1</sup> de 2-FE está presente no meio. Portanto, as concentrações de 2-FE obtidas nos processos biotecnológicos são geralmente abaixo de 4,0 g.L<sup>-1</sup>. Para melhorar a produção são necessárias novas técnicas, que incluem mutagênese das células ou tentativa de isolamento de cepas resistentes para atingir um rendimento considerável na produção de 2-FE (HUA; XU, 2011).

A cepa *Kluyveromyces marxianus* apresenta um bom desempenho na produção de 2-FE e tem sido a cepa alvo dos estudos envolvendo a biossíntese desse aroma (ETSCHMANN; SELL; SCHRADER, 2003; GARAVAGLIA *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2013b; CONDE-BÁEZ *et al.*, 2017).

### 2.5.1 *Kluyveromyces marxianus*

Indicada pelo FDA (*Food and Drug Administration*) como micro-organismo geralmente reconhecido como seguro GRAS (*Generally Recognized as Safe*), a cepa *Kluyveromyces marxianus* é uma levedura que possui uma característica metabólica denominada respiro-fermentativa, que significa que pode gerar energia por respiração e fermentação. As vias fermentativa ou respiratória podem ser favorecidas dependendo da concentração de oxigênio e carboidrato no meio de cultivo. Essa capacidade conjunta é comum em leveduras hemiascomicetos e parece mais ordenada em *Saccharomyces cerevisiae* (LANE *et al.*, 2011).

As leveduras *K. marxianus* são caracterizadas como micro-organismos unicelulares, nucleados, que não possuem motilidade, são capazes de se reproduzir sexualmente ou assexualmente. Elas podem ser esféricas, elipsoidais, cilíndricas ou alongadas (FONSECA *et al.*, 2008). Essas leveduras são capazes de produzir compostos aromáticos, tais como ésteres de frutos, ácidos carboxílicos, cetonas, furanos, álcoois, álcoois monoterpênicos e acetato de isoamilo, sendo o 2-FE o álcool comercialmente mais importante (FONSECA *et al.*, 2008).

O processo biotecnológico envolvendo a cepa *K. marxianus* tem sido motivado por diversas vantagens que favorece a aplicação industrial. As principais vantagens são; a alta taxa

de crescimento, termotolerância, ausência de metabolismo fermentativo no excesso de açúcar e também essas cepas podem utilizar um amplo espectro de substratos, tais como: lactose, xilose, rafinose e sacarose (FONSECA *et al.*, 2008).

As cepas *K. marxianus* possuem um efeito Crabtree-negativo, que é um fenômeno no qual a levedura tende a produzir baixas concentrações de etanol sob condições aeróbias. Esse efeito reduz a inibição do crescimento da levedura, que é uma vantagem para a produção de aromas (FONSECA *et al.*, 2008; FLAGFELDT *et al.*, 2009).

*Kluyveromyces marxianus* podem ainda ser utilizadas para metabolizar substratos de baixo custo, excedentes de processos industriais como exemplo, o soro de queijo, resíduos da fruticultura, que são constituídos por matéria orgânica rica em açúcares e fibras (FONSECA; CARVALHO; GOMBERT, 2013). Essa versatilidade é um ponto significativamente positivo, porque possibilita o aproveitamento de substratos com menor valor agregado, facilitando a aplicação a nível industrial. A Tabela 4 apresenta alguns autores que utilizaram *K. marxianus* para produzir 2-FE a partir de material remanescente da agroindústria.

Tabela 4 - Produção de 2-FE por *K. marxianus* a partir de excedentes da agroindústria.

Referências	2-FE	Meio	Levedura	Condições	L-Phe (g.L <sup>-1</sup> )
(ETSCHMANN; SELL; SCHRADER, 2003)	0.89 g.L <sup>-1</sup>	Melaço de beterraba	<i>K. marxianus</i> CBS 600	180 rpm, 35 °C, 60,0 g.L <sup>-1</sup> de Sacarose	7,0
(GARAVAGLIA <i>et al.</i> , 2007)	0.77 g.L <sup>-1</sup>	Mosto de uva	<i>K. marxianus</i> CBS 6556	250 rpm, 37 °C, 186.2 g.L <sup>-1</sup> açúcares redutores	3,0
(OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2013b)	0.19 g.L <sup>-1</sup>	Resíduo líquido de fecularia	<i>K. marxianus</i> ATCC 36907	150 rpm, 24 °C, 100.57 g.L <sup>-1</sup> açúcares redutores	3,0
(GÜNEŞER <i>et al.</i> , 2016)	167.9 µg.kg <sup>-1</sup>	Soro de leite	<i>K. marxianus</i> LOCK 0024	120 rpm, 25 °C, 56,37 g.L de lactose e 0,67 de glicose	-
(GÜNEŞER <i>et al.</i> , 2016)	63.36 µg.kg <sup>-1</sup>	Bagaço de pimenta	<i>K. marxianus</i> LOCK 0024	120 rpm, 25 °C, 3,45 g.L de açúcares redutores	-
(GÜNEŞER <i>et al.</i> , 2016)	39.60 µg.kg <sup>-1</sup>	Bagaço de tomate	<i>K. marxianus</i> LOCK 0024	120 rpm, 25 °C, 1,92 g.L de açúcares redutores	-

Fonte: Elaborada pelo autor.

Com base na Tabela 4, pode-se observar que a influência da composição do meio e condições de cultivo refletem significativamente na produção de 2-FE por *Kluyveromyces marxianus*.

Um estudo sobre a produção de 2-FE por *Kluyveromyces marxianus* geneticamente modificada, mostrou que a cepa foi capaz de produzir 1,3 g.L<sup>-1</sup> de 2-FE a partir de 20 g.L<sup>-1</sup> de glicose sem adição de L-Phe no meio (KIM; LEE; OH, 2014).

No trabalho realizado por Gao e Daugulis (2009) foi utilizado um sistema de biorreator de partição de duas fases sólido-líquido para reduzir a concentração aquosa de 2-FE a níveis não inibitórios. Os autores conseguiram com esse sistema obter uma concentração final de 2-FE de 20,4 g.L<sup>-1</sup> utilizando um meio estabelecido com 26,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe e a levedura *K. marxianus* CBS 600.

A resistência da cepa *K. marxianus* à toxicidade do 2-FE é menor que a da *S. cerevisiae*, e cerca de 2,0 g.L<sup>-1</sup> de 2-FE pode causar inibição completa do crescimento de *K. marxianus* (GAO; DAUGULIS, 2009). Isso ressalta a relevância das técnicas de remoção do produto *in situ* como um recurso que permite a escolha da cepa melhor produtora, diminuindo a importância da tolerância à inibição pelo produto (ANGELOV; GOTCHEVA, 2012).

De fato, a fonte de carbono influencia fortemente a produção de aroma. Com o melaço de beterraba como meio de cultivo, Etschmann, Sell e Schrader (2004) realizaram um estudo no qual foi possível obter uma concentração de 2-FE muito maior do que com a glicose pura. Enquanto a cepa *K. marxianus* CBS 600 conseguiu produzir 0,21 g.L<sup>-1</sup> a 35 °C em meio convencional, no meio com a sacarose do melaço de beterraba, a produção foi de 0,89 g.L<sup>-1</sup> de 2-FE, uma vez que esse subproduto da refinação da beterraba açucarada fornece também uma variedade de minerais e oligoelementos que auxiliam na produção.

Apesar dos estudos já realizados ainda é necessário aprimorar e elevar os rendimentos da produção de 2-FE, para tal fim é importante buscar alternativas econômicas utilizando meios de cultivo não convencionais, como o suco de caju como fonte de carbono para a conversão do aroma 2-FE, visando reduzir os custos de produção.

## 2.6 A cultura do Caju

O caju (*Anacardium occidentale L.*), nativo da América Tropical e disponível em muitos países da Ásia, África e América Central, é uma cultura agrícola economicamente significativa (DARAMOLA, 2013).

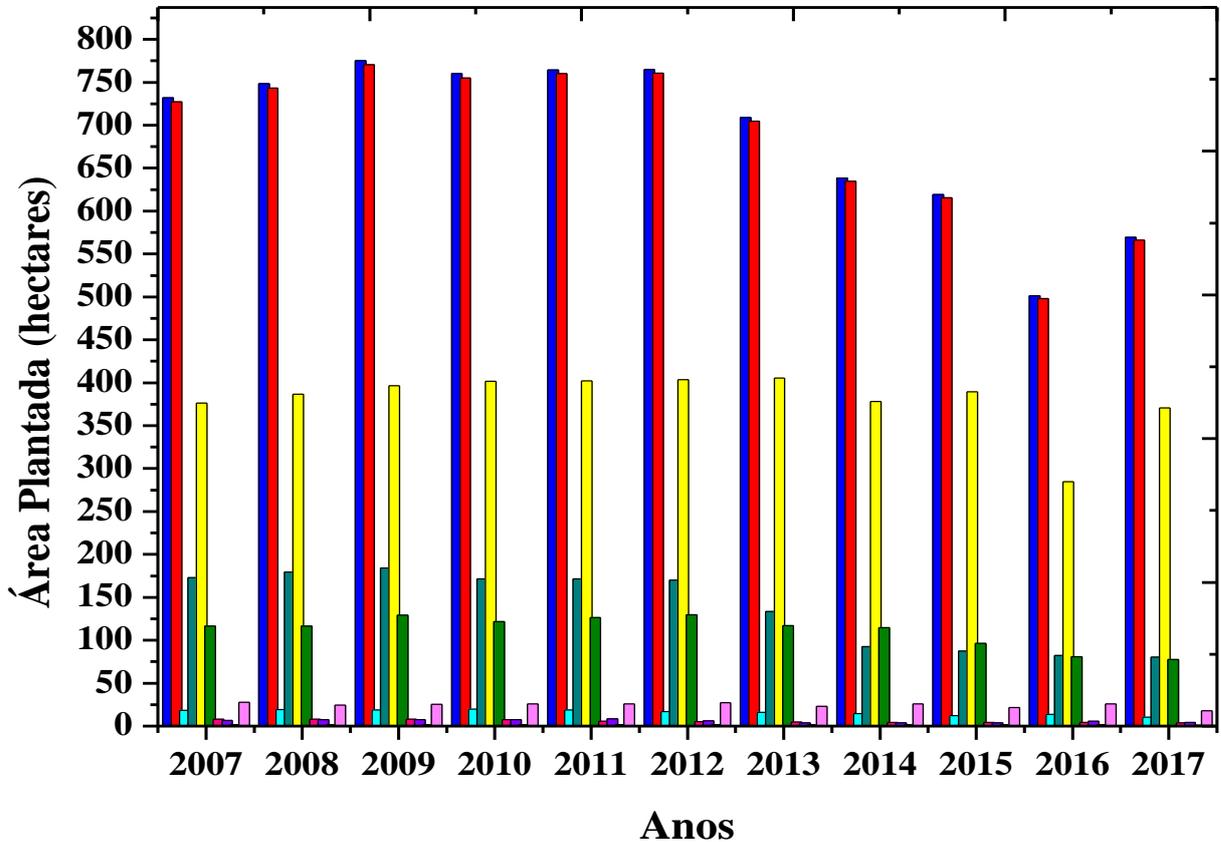
O caju apresenta um aspecto fibroso com formas alongadas, redondas ou semelhante a uma pera. Essa fruta pode ser encontrada nas cores amarelo, laranja e vermelho, possuem uma massa entre 40 g a 80 g e um comprimento de 60 mm a 100 mm. O caju é formado pela amêndoa da castanha (fruto) e pelo pedúnculo (pseudofruto), constituindo em peso 10% de castanha e 90% de pedúnculo. A castanha do caju destaca-se como o principal produto explorado do cultivo do caju, sendo o pedúnculo ainda pouco aproveitado. Geralmente, são

obtidas cerca de 10 a 15 toneladas de pedúnculo como subproduto agrícola para cada tonelada de castanha de caju produzida (DAS; ARORA, 2017).

A área plantada para a castanha de caju no Brasil foi de aproximadamente 569.382 hectares na safra de novembro de 2017, com um aumento de 13,6 % em relação ao ano de 2016. Essa área forneceu uma produção de 104,713 toneladas de castanha de caju, onde o Nordeste do país se apresenta como o maior produtor, abrangendo uma área de 99 % de toda a lavoura de castanha de caju. A produção de castanha de caju no Nordeste alcançou um total de 103,161 toneladas em 2017. No Ceará, a lavoura de castanha de caju foi estimada em 370,753 hectares, sendo o estado de maior produção, dispondo de um rendimento médio em torno de 148 kg por hectare (IBGE, 2017). Estima-se que 90 % do pedúnculo do caju ainda seja desperdiçado na região, onde o principal produto da cajucultura nordestina continua sendo a amêndoa de castanha de caju (VIDAL, 2016).

Embora a cultura do caju seja de grande importância para a economia regional, o setor deparou-se com alguns fatores que debilitou toda a cadeia de produção de caju, tais como: cajueiros antigos de baixa produtividade (a maior parte dos pomares está em fase de declínio natural de produção), baixos preços da castanha ao produtor, impossibilidade de tratamentos culturais adequados como controle químico de pragas, doenças e fatores climáticos desfavoráveis. De acordo com a Figura 7, pode-se observar que entre os anos de 2007 a 2009, a área plantada de caju no Nordeste do Brasil se expandiu, mesmo que lentamente. Com o estabelecimento da seca a partir de 2012, ocorreu um declínio considerável da área plantada no Nordeste. No Ceará, houve uma leve expansão da área do cajueiro até 2013, somente em 2014 a perda de área superou as novas áreas implantadas (VIDAL, 2016). Em 2017, a área do plantio do cajueiro no Ceará tornou a crescer.

Figura 7 - Área plantada de caju em hectares em alguns estados do Nordeste do Brasil. Brasil (■); Nordeste (■); Maranhão (■); Piauí (■); Ceará (■); Rio Grande do Norte (■); Paraíba (■); Pernambuco (■); Alagoas (■); Bahia (■).



Fonte: Adaptado de IBGE (2017).

Apenas 12% do total de pedúnculos de caju obtidos após a extração da castanha pode ser consumido fresco ou pode ser processado em vários produtos, tais como: suco, geléia, gelatina, xarope e outros produtos alimentares. O pedúnculo possui um forte sabor e aroma exótico de constituintes voláteis, como ésteres, álcoois, aldeídos, cetonas e éteres. Ele também possui uma concentração de ácido ascórbico cerca de quatro a dez vezes maior do que o encontrado em sucos de laranja e abacaxi. Contém também compostos fenólicos como leucodelfinidina, ácido anacárdico, cardol, taninos e terpenoides, como carotenoides que são antioxidantes com potencial benéfico para a saúde (KAPRASOB *et al.*, 2017). O suco de caju é rico em açúcares redutores (glicose e frutose), vitaminas, minerais e alguns aminoácidos (SILVEIRA *et al.*, 2012).

Tabela 5 - Características e composição do suco de caju.

<b>Componentes</b>	<b>Média</b>	<b>Região</b>	<b>Referências</b>
Umidade (%)	90,4	Brasil	(AZOUBEL <i>et al.</i> , 2005)
pH	4,47	Brasil	(ROCHA, 2007)
Ácido ascórbico (g.L <sup>-1</sup> )	1,12	África do Sul	(DEENANATH <i>et al.</i> , 2015)
	1,59	Brasil	(SOUSA; DE BRITO, 2013)
Açúcares totais (g.L <sup>-1</sup> )	102	Brasil	(AZOUBEL <i>et al.</i> , 2005)
	168	Costa do Marfim	(ADOU <i>et al.</i> , 2012)
	162,4	Costa do Marfim	(ADOU <i>et al.</i> , 2012)
Açúcares redutores (g.L <sup>-1</sup> )	97,62	África do Sul	(DEENANATH <i>et al.</i> , 2015)
	90,59	Brasil	(HONORATO; RODRIGUES, 2010)
	91,2	Brasil	(ROCHA, 2007)
Proteínas (%)	0,92	Brasil	(MATIAS <i>et al.</i> , 2005)
	0,52	Costa do Marfim	(ADOU <i>et al.</i> , 2012)
	1,72	África do Sul	(DEENANATH <i>et al.</i> , 2015)
Taninos (g.L <sup>-1</sup> )	2,23	Costa do Marfim	(ADOU <i>et al.</i> , 2012)
	0,72	Nigéria	(BETIKU; EMEKO; SOLOMON, 2016)

Fonte: Elaborada pelo autor.

Rocha (2007) realizou um estudo sobre a produção de biossurfactante utilizando o suco de caju como meio de cultivo. Nesse estudo, o suco de caju foi caracterizado e a Tabela 6 apresenta um perfil dos aminoácidos presentes no suco.

Tabela 6 - Conteúdo de aminoácidos do suco de caju.

<b>Aminoácidos</b>	<b>Concentração (µmol.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Aminoácidos</b>	<b>Concentração (µmol.L<sup>-1</sup>)</b>
Ácido aspártico	128,94	Tirosina	81,76
Ácido glutâmico	181,45	Valina	27,94
Serina	172,42	Metionina	7,38
Glicina	224,34	Cisteína	9,74
Histidina	33,10	Isoleucina	39,00
Treonina	371,47	Leucina	99,44
Alanina	284,75	Fenilalanina	12,86
Prolina	152,13	Lisina	13,09

Fonte: Rocha (2007).

### 2.6.1 Aplicações do caju em bioprocessos

Tendo em vista os fatos apresentados, a rica composição e o baixo custo, o pedúnculo do caju pode ser utilizado como substrato para biotransformações de produtos de valor agregado, como biossurfactante, ácido láctico, ácido hialurônico (ROCHA *et al.*, 2007;

SILVEIRA *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2013a). Nesse contexto, o pedúnculo de caju foi estudado como substrato em processos fermentativos e enzimáticos para várias aplicações.

Betiku, Emeko e Solomon (2016) investigaram o potencial do suco de caju utilizando a cepa *Aspergillus niger* para a produção de ácido oxálico por processo de fermentação. Nesse trabalho foram analisadas as interações entre a concentração do suco de caju, o pH, tempo, concentração de NaNO<sub>3</sub> e a concentração de metanol, utilizando um modelo de composto central empregado para produção de ácido oxálico. A maior concentração de ácido oxálico observada no 9º dia de fermentação foi de 106,75 g.L<sup>-1</sup>. Os autores do trabalho verificaram que a concentração de 122,68 g.L<sup>-1</sup> poderia ser alcançada utilizando a otimização do projeto estatístico.

Um estudo conduzido por Albuquerque *et al.* (2015) demonstrou a capacidade da cepa de *Kluyveromyces marxianus* CCA510 para a produção de xilitol a partir de bagaço de caju hidrolisado. Nessa pesquisa, avaliou-se a desintoxicação do hidrolisado com carvão ativado e a influência da suplementação por várias fontes de nitrogênio. Os autores verificaram a produção máxima de 12,73 g.L<sup>-1</sup> de xilitol no meio hidrolisado que apresentou as maiores concentrações de glicose e xilose. Mostrando também que a suplementação e a remoção de interferentes não foram significativas na produção de xilitol.

Rocha *et al.* (2014) estudaram condições de pré-tratamento de bagaço de caju para liberação de açúcares a serem utilizados na produção de etanol e xilitol por *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus* CCA 510. A concentração máxima de etanol obtida nesse estudo por *S. cerevisiae* foi de 9,59 ± 1,74 g.L<sup>-1</sup> e utilizando a *K. marxianus* CCA 510 a produção de etanol e xilitol foram de 11,89 ± 0,34 g.L<sup>-1</sup> e 6,76 ± 0,28 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente, durante 96 horas de processo.

Foi estudado o uso de suco de caju diluído, contendo 37,5 g.L<sup>-1</sup> de açúcares redutores (frutose e glicose) suplementado com 6 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de amônio como fonte de nitrogênio exógeno, para a produção de manitol por duas cepas de *Leuconostoc* (*L. citreum* B-742 e *L. mesenteroides* B-512F). Os autores avaliaram o pH, no qual a *L. mesenteroides* B-512F foi a melhor produtora com pH ideal de 5,0, rendimento de manitol de 95 % e produtividade de 1,6 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> alcançando uma concentração de 19 g.L<sup>-1</sup> de manitol em 16 horas de fermentação (FONTES *et al.*, 2013).

O hidrolisado do bagaço de caju foi usado como substrato para a produção de etanol por *Kluyveromyces marxianus* CE025. Nesse estudo foi avaliado a temperatura durante o processo que resultou numa produção de 12,36 ± 0,06 g.L<sup>-1</sup> de etanol (ROCHA *et al.*, 2011).

Honorato e Rodrigues (2010) avaliaram a produção e estabilidade da enzima dextranasacarase utilizando o suco de caju como meio de fermentação. Os autores provaram a estabilidade da enzima bruta a 30 °C com pH variando de 4,5 a 5,5 durante 30 horas. Dextranasacarase apresentou alta estabilidade no suco de caju, o que torna este substrato adequado para aplicação industrial.

Pinheiro *et al.* (2008) utilizaram uma cepa comercial de *S. cerevisiae* para produção de etanol utilizando o suco de caju como meio de cultura, em diferentes concentrações dos açúcares redutores (glicose e frutose). A concentração máxima de etanol,  $44,4 \pm 4 \text{ g.L}^{-1}$ , foi obtida quando foram utilizados  $103,1 \text{ g.L}^{-1}$  da concentração inicial de açúcar após 6 horas de fermentação; no entanto, uma maior produtividade,  $9,71 \pm 0,3 \text{ g.L}^{-1}$ , foi alcançada com  $87,7 \text{ g.L}^{-1}$  da concentração inicial de substrato.

Barros *et al.* (2014) isolaram uma levedura do suco de caju pertencente ao gênero *Hanseniaspora* para a produção de etanol de primeira e segunda geração, utilizando o suco de caju e o hidrolisado enzimático do bagaço de caju, respectivamente. Os autores obtiveram uma produção de  $42 \text{ g.L}^{-1}$  de etanol com eficiência de 96 % e  $24,37 \text{ g.L}^{-1}$  de etanol com uma eficiência de 80,23 % utilizando, respectivamente, o suco de caju e o hidrolisado enzimático do bagaço.

É importante considerar as variações da composição de substrato não convencionais para meio de cultura, pois essas diferem de acordo com sua fonte (ROCHA, 2007). Por isso, é interessante selecionar micro-organismos adaptados e capazes de assimilar esses tipos de substratos. Nesse sentido, o suco de caju, rico em açúcares redutores, macro e micronutrientes, mostra ser um substrato promissor para cultivo de micro-organismos.

Palitot (2017) utilizou o suco de caju como meio de cultivo para produção de 2-FE por *K. marxianus* CCA 510. Nesse estudo, foram avaliadas as condições de operação como, a temperatura, aeração e a suplementação da L-Phe. Nas melhores condições de 35 °C, aeração de  $2 \text{ L.min}^{-1}$ , sob agitação de 250 rpm e uma suplementação de  $3,0 \text{ g.L}^{-1}$  de L-Phe, foi possível produzir  $1,04 \text{ g.L}^{-1}$  de 2-FE, provando que o suco de caju é um substrato não convencional adequado para a produção do metabólito.

No entanto, vale salientar que a *K. marxianus* apresenta inibição completa de crescimento numa concentração de aproximadamente  $2,6 \text{ g.L}^{-1}$  de 2-FE, porém, a  $0,89 \text{ g.L}^{-1}$  de 2-FE no meio a sua taxa de crescimento já é reduzida em torno de 20 % (ETSCHMANN; SELL; SCHRADER, 2003). Dessa forma, são necessárias novas técnicas para aumentar a produção de 2-FE no suco de caju como, a otimização do processo variando a concentração do precursor

e/ou a concentração dos açúcares redutores presentes no suco, avaliar a produção por novas cepas de *K. marxianus*, bem como abordagens de alimentação e a extração do produto *in situ*.

## 2.7 Remoção do produto *in situ* (ISPR)

Uma atenção vem sendo direcionada para a fermentação extrativista, que é conhecida como uma tecnologia promissora capaz de aliviar o estresse do micro-organismo causado pela inibição do produto final e com isso aumentar a produtividade (SERRANO-CARREÓN, 2003).

Para evitar esse problema de inibição, as técnicas ISPR (*In situ Product Removal*) que significa a remoção contínua *in situ* do produto no sistema de reação, são amplamente utilizadas (HUA; XU, 2011).

Em relação a inibição por compostos de aroma, o principal motivo dos baixos níveis de produtividade é devido ao acúmulo desses compostos hidrofóbicos. Esses inibidores devem ser removidos da vizinhança das células, porque uma vez produzidos eles influenciam negativamente na fisiologia das células, afetando a fluidez da membrana e, conseqüentemente, a perda da viabilidade celular. A remoção do produto *in situ* pode superar esse problema, além disso, a remoção contribui para a recuperação do produto, minimização das perdas por evaporação e redução do número de etapas do processamento *downstream* (BEN AKACHA; GARGOURI, 2015).

De acordo com as diferentes ferramentas de separação empregadas, os métodos podem ser divididos em extração de duas fases, adsorção, imobilização em solvente e pervaporação organofílica, cuja aplicação depende principalmente da natureza do produto (PEREZ, 2001). A extração em duas fases é um sistema simples, barato, fácil de aplicar e ampliar. Um solvente orgânico adequado é adicionado ao sistema e o produto desejado é extraído para a fase orgânica. Dessa forma, a fase aquosa do sistema apresenta baixos níveis de inibição e a biotransformação pode ser mantida. Uma das técnicas ISPR é a adsorção do produto *in situ*, que usa resinas ou outros meios de adsorventes para facilitar a recuperação do produto. Essa técnica tem sido aplicada com sucesso na fabricação de muitos bioprodutos (HUA; XU, 2011).

No caso da pervaporação organofílica, várias membranas de pervaporação foram investigadas. O polidimetilsiloxano pode ser considerado como material de referência para o método de recuperação *in situ* de butanol. Embora tenha sido considerado um método promissor

na fermentação de butanol, ainda são desejáveis melhorias para diminuir os custos de capital e de operação (VAN HECKE; DE WEVER, 2017).

Várias técnicas de recuperação de produto *in situ* (ISPR) foram aplicadas para remover 2-FE da suspensão de fermentação após a sua produção. Assim, a concentração de 2-FE permanece abaixo do nível inibitório e a levedura continua a produzir (MEI; MIN; LÜ, 2009).

Um projeto de fermentação integrado com extração por membrana foi desenvolvido para a produção de 2-FE e 2-fenilacetato por *K. marxianus* CBS 600, a partir de um meio microbiológico convencional, suplementado com 9,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe. Foi possível obter uma produção de 4,0 g.L<sup>-1</sup> de 2-feniletanol mais 2-feniletacetato utilizando a técnica de extração, e uma concentração 1,4 g.L<sup>-1</sup> dos mesmos metabólitos na fermentação sem extração. A remoção *in situ* por pervaporação permitiu um aumento considerável nos rendimentos da produção do aroma (ADLER *et al.*, 2011).

No intuito de melhorar a produção de 2-FE, Hua *et al.* (2010) utilizaram uma resina macroporosa, escolhida entre várias testadas, como artifício para adsorção do produto *in situ*. Nesse estudo, os autores obtiveram uma produção de 6,6 g.L<sup>-1</sup> de 2-FE utilizando a *Saccharomyces cerevisiae* e 12 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe adicionada ao meio.

Mei, Min e Lu (2009) utilizaram a técnica de adsorção *in situ* do produto para aumentar a produção de 2-FE por *Saccharomyces cerevisiae* BD. Foi usado 2 g de uma resina macroporosa para 30 mL de meio. A resina apresentou alta capacidade de adsorver 2-FE e baixa para a L-Phe. A concentração total de 2-FE alcançada foi de 6,17 g.L<sup>-1</sup> em 24 h de cultivo.

Uma estratégia de recuperação do produto *in situ* usando polipropileno glicol 1200 como extrator, ocasionou a produção de 26,5 g.L<sup>-1</sup> de 2-FE utilizando a *Kluyveromyces marxianus* CBS 600 e 50,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe (ETSCHMANN; SCHRADER, 2006).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Micro-organismo

O micro-organismo, *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 (*American Type Culture Collection*), utilizado para a produção de 2-FE, foi adquirido da Coleção de Culturas Tropicais - CCT na Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia - André Tosello. A cultura foi mantida a 4 °C em Ágar inclinado YEPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*) constituído de 10 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 20 g.L<sup>-1</sup> de peptona, 20 g.L<sup>-1</sup> de dextrose e 20 g.L<sup>-1</sup> de Ágar, sendo

esta repicada a cada 3 meses em placa de Petri para manutenção da viabilidade celular. A cepa foi também preservada a - 80 °C em caldo YEPD contendo 50% de glicerol. As placas repicadas a partir do Ágar inclinado foram estocadas a 4 °C para posterior uso na preparação do inóculo.

### 3.2 Meio de cultivo

Foi utilizado como meio de cultivo para produção do 2-FE o suco de caju *in natura*, obtido a partir da prensagem do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale L.*) com uma média de concentração de 133,08 g.L<sup>-1</sup> de glicose + frutose. O suco *in natura* foi diluído com água destilada para obtenção de diferentes concentrações. As diluições foram de 1:1 (suco *in natura*: água) e 3:1 (suco *in natura*: água). Em seguida, o meio foi centrifugado, para remoção dos sólidos suspensos, a 4500 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Posteriormente, o meio foi filtrado a vácuo em papel de filtro qualitativo, o pH foi ajustado para 5,5 utilizando NaOH 1 M, em seguida esterilizado em autoclave a 110 °C por 10 minutos.

### 3.3 Preparo do inóculo

O suco de caju *in natura* com pH ajustado para 5,0 utilizando NaOH 1 M, foi utilizado como meio de inóculo, o qual foi esterilizado em autoclave a 110 °C por 10 minutos. A cultura da levedura *K. marxianus* foi repicada em placas de Petri contendo Ágar YEPD, anteriormente ao início do cultivo. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 30 °C por 60 horas. Após o período de incubação, 3 colônias da cultura foram transferidas para 100 mL do meio de inóculo, o qual foi mantido em agitador orbital (Tecnal – TE 422) a 30 °C e 180 rpm por 24 horas em frasco Erlenmeyer de 250 mL.

### 3.4 Condições gerais para a produção de 2-FE

Todos os ensaios foram conduzidos em Biorreator de bancada (Tec-Bio, Model 1.5-1L, Tecnal, SP, Brazil), equipado com monitoramento e controle de pressão, agitação, temperatura, oxigênio dissolvido, pH e CO<sub>2</sub>, com condensador de refluxo de aço inox, dois conjuntos de impelidores com pás do tipo planas, sistema de amostragem baseado em seringa livre de contaminação. Os cultivos foram realizados com um volume reacional de 750 mL, agitação de 250 rpm a 35 °C, utilizando 75 mL da suspensão de células do inóculo numa concentração média de 0,5 ± 0,08 g.L<sup>-1</sup> de biomassa. Os dados operacionais de partida foram obtidos das melhores condições utilizadas no estudo de Palitot (2017). As amostras foram

retiradas em tempos pré-definidos durante 72 horas de cultivo e centrifugadas a 6000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi posteriormente filtrado em filtro acetato de celulose com tamanho de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  e utilizado para determinação da concentração dos açúcares e produto.

Nesse estudo, foram avaliadas a curva de crescimento da *K. marxianus* ATCC 36907, as concentrações iniciais de açúcares redutores (glicose e frutose) do suco de caju e a concentração inicial de L-Phe na produção de 2-FE. Também foi avaliado a produção de 2-FE por batelada alimentada, bem como a razão de L-Phe e aeração no meio para cálculo da massa de 2-FE arrastada pela corrente gasosa.

### **3.5 Métodos analíticos**

#### ***3.5.1 Concentração de biomassa***

Alíquotas de 3 mL do meio de cultivo foram retiradas para realização das análises, na qual 1 mL foi utilizado para determinar a concentração de biomassa por densidade óptica (DO) em espectrofotômetro (Biochrom Libra S11), no comprimento de onda de 600 nm. A concentração da biomassa foi quantificada utilizando uma curva de calibração que relaciona a massa de biomassa seca ( $\text{g.L}^{-1}$ ) com a densidade óptica.

#### ***3.5.2 Concentração dos açúcares (glicose e frutose)***

As concentrações dos açúcares foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando um cromatógrafo (Waters, Milford, MA, E.U.A.) equipado com um detector de índice de refração Waters e com a coluna Aminex® Fermentation Monitor (150 mm x 7,8 mm, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) a 65 °C. O eluente utilizado foi 1 mmol. L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em água deionizada (MiliQ Simplicity 185, Millipore, Billerica, MA) com uma vazão de 0.4 mL.min<sup>-1</sup> e um volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ . As concentrações de cada componente foram obtidas por meio de curvas de calibração que correlacionam concentrações dos padrões com as respectivas áreas dos cromatogramas.

#### ***3.5.3 Concentração do produto (2-FE)***

A concentração de 2-FE foi determinada usando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência CLAE (Finnigan Suveyor Plus HPLC System, Thermo Scientific, CA, EUA),

operando com detector UV/Visível (PDA Detector Surveyor, Thermo Scientific, CA, EUA) a 254 nm de absorção óptica, utilizando a coluna Nova-Pak® C18 (5µ, 4.6mm x 150mm, Waters, Irlanda) a 35 °C e um volume de injeção de 20 µL. Uma solução de Acetonitrila : água ultrapura (40:60 v/v) foi utilizada como fase móvel a uma vazão de 0,8 mL.min<sup>-1</sup>. O 2-FE foi identificado comparando o tempo de retenção da amostra com o tempo de retenção de uma solução padrão de 2-FE. As concentrações das amostras foram calculadas a partir da equação linear obtida da curva de calibração do 2-FE utilizando as áreas dos cromatogramas.

### 3.5.4 Parâmetros cinéticos e rendimentos estudados no processo

Os dados experimentais obtidos no cultivo do suco de caju por *K. marxianus* ATCC 36907 para produção de 2-FE, foram utilizados para analisar os parâmetros cinéticos e de rendimentos do processo.

#### 3.5.4.1 Taxas específicas de crescimento celular, produção e consumo de açúcar total

As taxas específicas de crescimento celular ( $\mu_X$ . h<sup>-1</sup>), de produção de 2-FE ( $\mu_P$ . h<sup>-1</sup>) e de consumo de açúcar total ( $\mu_S$ . h<sup>-1</sup>), são definidas pelas equações de 1 a 3, respectivamente.

$$\mu_X = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (1)$$

$$\mu_P = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \quad (2)$$

$$\mu_S = -\frac{1}{X} \frac{dS}{dt} \quad (3)$$

Onde  $X$  é a concentração celular (g.L<sup>-1</sup>),  $P$  é a concentração de 2-FE (g.L<sup>-1</sup>) e  $S$  a concentração de açúcar total (glicose e frutose) (g.L<sup>-1</sup>).

#### 3.5.4.2 Rendimento de Biomassa e produto

Também foram calculados os rendimentos de biomassa ( $Y_{X/S}$ ) e de produto ( $Y_{P/S}$ ) baseados no consumo de açúcar total, e o desvio metabólico para a produção de 2-FE em relação a síntese de biomassa ( $Y_{P/X}$ ). Esse parâmetro representa a relação entre a conversão de açúcares em biomassa, e o quanto desta fonte de carbono foi desviada para a produção do metabólito de interesse. Esses rendimentos são calculados pelas Equações de 4 a 6, respectivamente.

$$Y_{X/S} = \frac{dX}{dS} \quad (4)$$

$$Y_{P/S} = \frac{dP}{dS} \quad (5)$$

$$Y_{P/X} = \frac{dP}{dX} \quad (6)$$

#### 3.5.4.3 Máxima concentração de biomassa e de 2-FE

A concentração máxima de biomassa  $X_{máx}$  (g.L<sup>-1</sup>) e de 2-FE  $P_{máx}$  (g.L<sup>-1</sup>) equivale ao maior valor de biomassa e produto obtido durante o processo.

#### 3.5.4.4 Produtividade volumétrica de 2-FE e de células

As produtividades  $Q_P$  (g.L.h<sup>-1</sup>) e  $Q_X$  (g.L.h<sup>-1</sup>) são definidas pela razão da máxima concentração de produto e células pelo tempo total do processo, respectivamente (Equações 7 e 8).

$$Q_P = \frac{P_{máx}}{t} \quad (7)$$

#### 3.5.4.5 Produtividade de Biomassa

$$Q_X = \frac{X_{máx}}{t} \quad (8)$$

#### 3.5.5 Cálculo da máxima taxa específica de consumo de oxigênio e consumo total

A máxima taxa específica de consumo de oxigênio ( $q_{O_2}$  mmol.g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) e o consumo cumulativo de oxigênio (QO<sub>2</sub> mmol) foram calculados tomando como base os dados fornecidos pela leitura do sensor de oxigênio do biorreator ao longo do processo (Equações 9 e 10). O consumo de oxigênio cumulativo foi obtido a partir da integral numérica da taxa de oxigênio consumido (QO<sub>2</sub> mmol.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) em 0,75 L de meio reacional por 60 horas de cultivo.

$$QO_2 = \frac{dO_2}{dt} \quad (9)$$

$$qO_2 = \frac{1}{X} \frac{dO_2}{dt} \quad (10)$$

Onde,  $O_2$  é a concentração de oxigênio consumido ( $\text{mmol.L}^{-1}$ ) em 60 horas de processo e  $X$  é a concentração celular ( $\text{g.L}^{-1}$ ).

### 3.5.6 Análise dos dados

Todos os dados do processo de produção de 2-FE foram analisados utilizando o programa OriginPro versão 8. Com o mesmo software, realizou-se análises de variância de um único fator (ANOVA) e teste de *Tukey* a um nível de 95 % de confiança para comparação das médias experimentais dos processos.

## 4 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE AÇÚCAR (GLICOSE E FRUTOSE) DO SUCO DE CAJU PARA PRODUÇÃO DE 2-FE

### 4.1 Introdução

As necessidades nutricionais dos micro-organismos são diversas, porém é comum a todos a demanda por água, fontes de carbono, nutrientes e elementos naturais para sintetizar os constituintes celulares. A grande maioria dos micro-organismos utilizados industrialmente são capazes de catabolizar substratos orgânicos, como os açúcares, para obtenção de energia, desde que estes apresentem a complexidade enzimática e transportadores adequados para metabolizar cada fonte de nutriente (JÚNIOR; BON; FERRARA, 2008).

Um elemento crítico para a sobrevivência celular é manter uma fonte de energia viável. A glicose é a fonte de carbono preferida pelas leveduras, sendo amplamente utilizada, seguida por frutose, manose e galactose (JÚNIOR; BON; FERRARA, 2008). Em termos de desenvolvimento de bioprocessos, os parâmetros de maior importância são os que afetam o nível de expressão do produto desejado e a estabilidade do micro-organismo (HOHMANN; MAGER, 2003). Por exemplo a fonte de carbono, o pH e a temperatura específica de crescimento do micro-organismo.

O suco de caju, contém isômeros de glicose e frutose como açúcares principais. A concentração total desses açúcares no suco varia de acordo com o cultivar (DAS; ARORA, 2017).

Segundo Wittmann, Hans e Bluemke (2002) a produção de 2-FE utilizando a L-Phe como precursor, assimila a glicose como fonte de energia a qual é direcionada para produção de biomassa e também de 2-FE, o que implica em uma competição da levedura tanto pela glicose como pela L-fenilalanina. De uma forma geral, a produção de 2-FE depende principalmente da suplementação de L-Phe no meio de cultura e do micro-organismo.

Nesse sentido, com a finalidade de obter mais informações sobre a produção de 2-FE a partir do suco de caju em diferentes concentrações iniciais dos açúcares redutores (glicose + frutose), foi investigado a curva de crescimento da levedura *K. marxianus* ATCC 36907, os efeitos causados pela concentração desses açúcares no metabolismo da levedura para a produção do aroma de interesse, bem como a alimentação do meio com glicose para avaliar a sensibilidade do micro-organismo à inibição pelo substrato ou um possível aumento na produção de 2-FE.

## **4.2 Material e Métodos**

Os experimentos empregados na avaliação da concentração inicial de açúcar no processo de produção do 2-FE seguiram as metodologias apresentadas nos tópicos 3.1 a 3.4 do capítulo 3.

### ***4.2.1 Curva de crescimento da K. marxianus ATCC 36907***

Foram avaliadas as fases de crescimento da *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 no inóculo utilizado no bioprocesso. O estudo ocorreu utilizando o suco de caju na concentração de  $137,3 \pm 2,67$  g.L<sup>-1</sup> de glicose + frutose, em frasco Erlenmeyer de 250 mL a 30 °C, sob agitação de 180 rpm em agitador orbital (Tecnal – TE 422) por 28 horas. O experimento foi realizado em triplicata.

#### ***4.2.2 Análise do efeito da concentração inicial de açúcar (glicose e frutose) do suco de caju na produção de 2-FE***

Avaliou-se o efeito da concentração inicial de açúcar total (glicose e frutose) do suco de caju na produção de 2-FE. O estudo foi conduzido nas concentrações de  $131 \pm 5,7 \text{ g.L}^{-1}$  (suco integral);  $106 \pm 1,2 \text{ g.L}^{-1}$  e  $74 \pm 2,8 \text{ g.L}^{-1}$  (sucos diluídos). As concentrações do suco foram obtidas a partir da diluição do suco integral em água destilada. Os ensaios foram realizados sob aeração de  $2 \text{ L.min}^{-1}$  na temperatura de  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ , e a concentração de L-Phe foi fixada em  $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ . Para cada concentração foram avaliadas as taxas específicas de crescimento celular ( $\mu_X$ ), taxa específica de consumo de açúcar ( $\mu_S$ ) e de produção de 2-FE ( $\mu_P$ ), concentração máxima de biomassa  $X_{m\acute{a}x}$  ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e de 2-FE  $P_{m\acute{a}x}$  ( $\text{g.L}^{-1}$ ), assim como os rendimentos de biomassa ( $Y_{X/S}$ ), de produto ( $Y_{P/S}$ ) e a relação do desvio de açúcar da síntese de biomassa para produção de 2-FE ( $Y_{P/X}$ ). Foram avaliados também a máxima taxa específica de consumo de  $\text{O}_2$  ( $q\text{O}_2$ ) e o consumo total de  $\text{O}_2$  ( $\text{QO}_2$ ) em 60 horas de cultivo, seguindo a metodologia exposta no tópico 3.5.5.

#### ***4.2.3 Efeito da produção de 2-FE em batelada alimentada***

O processo de batelada alimentada foi realizado utilizando soluções de  $50 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose previamente esterilizadas a  $110 \text{ }^\circ\text{C}$  por 10 minutos. Os volumes de alimentação foram inseridos assepticamente no biorreator nos tempos de 12, 24 e 48 horas de processo. O cultivo ocorreu utilizando o suco de caju integral suplementado com  $3,0 \text{ g.L}^{-1}$  de L-Phe, sob aeração de  $2 \text{ L.min}^{-1}$  na temperatura de  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ . Foram coletadas amostras antes e após a alimentação no biorreator para análise das concentrações de açúcares, biomassa e de 2-FE produzido.

#### ***4.2.4 Métodos analíticos***

As concentrações de biomassa, carboidratos, 2-FE, os parâmetros cinéticos e de conversão foram mensurados seguindo as metodologias apresentadas nos tópicos 3.5.1 a 3.5.4 do capítulo 3.

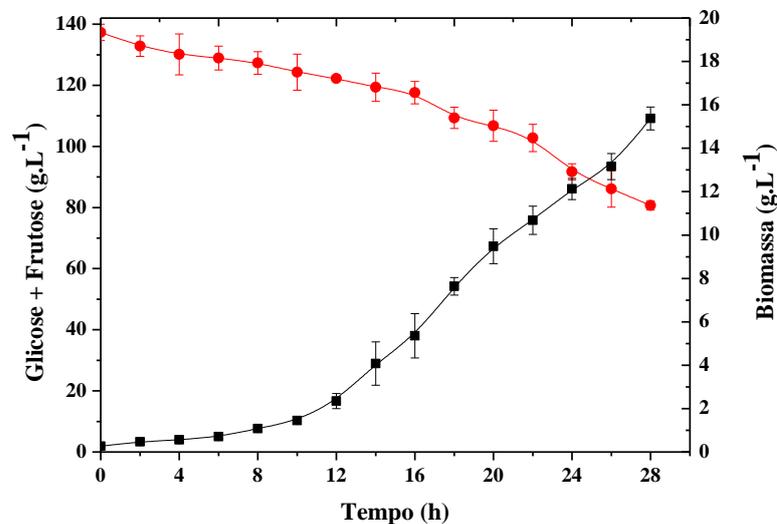
### 4.3 Resultados e Discussão

#### 4.3.1 Curva de crescimento da *K. marxianus* ATCC 36907

Para garantir que o volume de inóculo inserido no biorreator se apresentaria na fase de crescimento exponencial, foi realizado um estudo do crescimento da cepa *K. marxianus* ATCC 36907 por 28 horas e os resultados estão apresentados na Figura 8.

De acordo com o ilustrado na Figura 8 é possível observar claramente a fase *lag* do micro-organismo, ou seja, a fase em que a levedura sofre alterações intracelulares, onde novas enzimas ou componentes estruturais são sintetizados para adaptação da levedura ao meio. Essa fase ocorre até as 10 horas do cultivo. Depois desse período, a levedura entra na fase de crescimento exponencial (fase *log*).

Figura 8 - Perfil de crescimento e consumo de substrato durante a preparação do inóculo da levedura *K. marxianus* ATCC36907 a 35 °C, 180 rpm usando suco de caju como meio de cultivo. Concentração de Biomassa (■) e Concentração de Glicose mais Frutose (●).



Fonte: Elaborada pelo autor.

A levedura consumiu parte dos carboidratos presentes no suco de caju (glicose e frutose), assimilando 41,2 % em até 28 horas do crescimento do inóculo (*vide* Figura 8).

Os parâmetros de conversão foram analisados após as 28 horas de processo, obtendo-se uma máxima velocidade específica de crescimento ( $\mu_{Xm\acute{a}x}$ ) de 0,203 h<sup>-1</sup> e

alcançando uma concentração máxima de células de  $15,3 \text{ g.L}^{-1}$ , com um rendimento de biomassa ( $Y_{X/S}$ ) de  $0,267 \text{ g.g}^{-1}$ .

Portanto, os resultados mostram que o inóculo ainda se apresentava em fase de crescimento até as 28 horas de cultivo, logo foi estabelecido o tempo de 24 horas de crescimento da *K. marxianus* ATCC 36907 para transferência da cultura de inóculo ao biorreator para produção de 2-FE, visto que nesse tempo a levedura ainda se encontrava em fase de multiplicação relevante.

#### **4.3.2 Influência da concentração inicial de açúcar (glicose e frutose)**

Para investigar o comportamento cinético da *K. marxianus* ATCC 36907 e a produção de 2-FE, o suco de caju foi diluído com água destilada, para atingir diferentes concentrações iniciais de açúcares redutores (glicose e frutose) e suplementado com L-Phe ( $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ ). As Figuras 9 (A, B e C) apresentam os perfis de produção de biomassa, consumo de açúcares e produção de 2-FE por 72 horas de cultivo. Os perfis completos de biomassa, consumo de açúcar e de produção de cada avaliação podem ser observados no Anexo A.

No que se refere ao crescimento microbiano (Figura 9A), pode-se observar que não houve fase *lag*, visto que o meio de inóculo foi constituído do próprio suco de caju na fase de crescimento, com o intuito de minimizar ou até mesmo eliminar a fase *lag*. Ainda analisando a Figura 9A, percebe-se que a maior concentração de *K. marxianus* ATCC 36907 foi alcançada quando se utilizou o suco integral, ou seja, na maior concentração de açúcares ( $131 \pm 5,7 \text{ g.L}^{-1}$ ). Em contrapartida, nas demais concentrações de açúcares do suco de caju avaliadas não se observou uma produção de biomassa significativamente diferenciada ( $p > 0,05$ ).

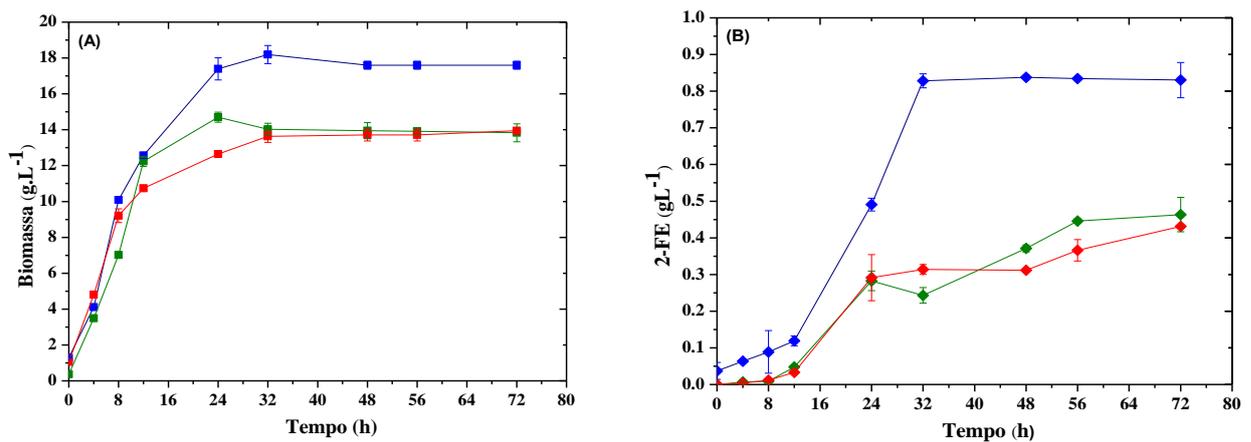
Analisando a Figura 9A, é possível perceber que a fase de crescimento exponencial da *K. marxianus* ATCC 36907 ocorre até as 12 horas de cultivo, depois dessa faixa de tempo, ocorre uma desaceleração no crescimento e a levedura entra na fase estacionária. No período entre 0 e 12 horas de processo, observa-se uma baixa produção de 2-FE (Figura 9B) enquanto há uma alta produção de células.

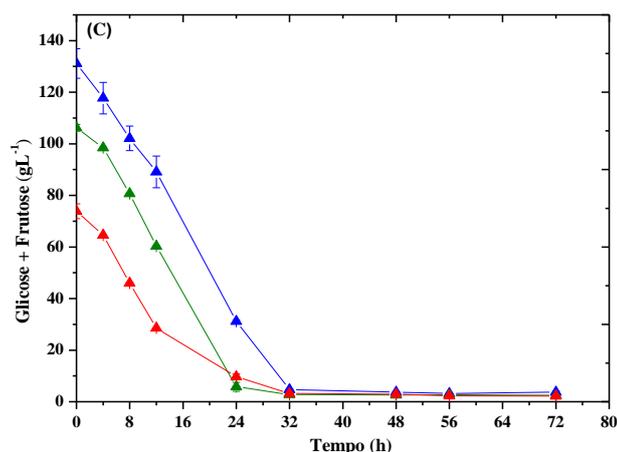
Observando a Figura 9B, entre 12 e 24 horas, a produção de 2-FE se torna mais acentuada para o cultivo com maior concentração de açúcar ( $131 \pm 5,7 \text{ g.L}^{-1}$ ), e após as 24 horas, quando a levedura entra na fase estacionária, é perceptível uma produção ainda elevada do metabólito. Essa fase, praticamente a fase final do cultivo, demonstra que a bioconversão da L-Phe ainda estava ativa.

Wittmann, Hans e Bluemke (2002) afirmaram que a produção de 2-FE é aumentada durante a fase estacionária. Isso mostra que a produção de 2-FE, pela *K. marxianus* ATCC 36907, não ocorre diretamente associada ao crescimento exponencial, visto que nessa fase a produção de 2-FE não foi relevante. Segundo esses autores, a levedura assimila a glicose como fonte de energia, a qual é direcionada tanto para a produção de biomassa como para a biossíntese de 2-FE. No entanto, existe uma competição da levedura pela glicose e pela L-Phe durante o cultivo. No momento em que a concentração da fonte de carbono diminui, as 24 h (Figura 9C), a competição da levedura por ambos os substratos também reduz, o que implica em uma maior assimilação da L-Phe pela levedura e, conseqüentemente, um aumento na produção de 2-FE na fase estacionária, portanto, a biossíntese de 2-FE é parcialmente associada ao crescimento da levedura.

Garavaglia *et al.* (2007), também observaram um comportamento semelhante utilizando *K. marxianus* CBS 6556 para a produção de 2-FE em biorreator a temperatura de 37 °C, usando mosto de uva como substrato suplementado com 3,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe. Os autores afirmaram que a produção de 2-FE foi mais elevada na fase estacionária.

Figura 9 - Influência da concentração inicial de açúcar no crescimento celular (A) produção de 2-FE (B) e consumo de açúcar total (C) para os cultivos realizados a 35 °C, 250 rpm, aeração de 2 L.min<sup>-1</sup> e 3,0 g.L<sup>-1</sup> de L-fenilalanina, utilizando suco de caju nas concentrações de açúcar total (glicose + frutose) de 131 ± 5,7 g.L<sup>-1</sup> (■); 106 ± 1,2 g.L<sup>-1</sup> (■); 74 ± 2,8 g.L<sup>-1</sup> (■).





Fonte: Elaborada pelo autor.

Em relação ao consumo de açúcar pela *K. marxianus* ATCC 36907 (Figura 9C), em todas as concentrações estudadas, observou-se que aproximadamente 97,0 % da concentração inicial de açúcares foi consumida em até 32 horas de cultivo. Não foi possível observar a preferência do micro-organismo pelos açúcares do suco de caju. Apesar disso, Fonseca, Carvalho e Gombert (2013) estudaram o crescimento da *K. marxianus* CBS 6556 em diferentes combinações de açúcares, e demonstraram que a glicose é mais preferida pela *K. marxianus* do que a frutose.

Além disso, a preferência por glicose pela *K. marxianus* CCA 510 também foi relatada por Palitot (2017). No estudo de Palitot (2017) as concentrações de frutose mantiveram-se com baixas variações ao longo do tempo, e as concentrações de glicose se esgotaram por completo em até 30 horas de cultivo. Embora os dois estudos tenham utilizado a levedura *K. marxianus*, as cepas específicas eram diferentes da cepa empregada no trabalho em questão.

Por outro lado, sabe-se que o transporte de açúcar nas leveduras pode ocorrer a partir de dois diferentes mecanismos, os quais são definidos como sistemas de cotransporte, que simultaneamente carregam dois solutos através da membrana. Quando os substratos se movem em sentidos opostos, o processo é denominado antiporte. No sistema simporte a passagem de duas substâncias ocorre no mesmo sentido, um exemplo desse sistema é o transportador de lactose da *Escherichia coli* (simporte lactose-H<sup>+</sup>) que é movido pela energia de um gradiente de prótons (NELSON; COX, 2014).

Em vista disso, uma explicação para o consumo de açúcares pelas leveduras, especificamente para *K. marxianus*, foi discutida por Gasnier (1987), que descreveu alguns mecanismos relacionados ao transporte de açúcares para a *K. marxianus* e concluiu que a

glicose pode atravessar a membrana celular através de dois transportadores funcionalmente distintos, sendo um transportador de glicose de alta afinidade que é o simporte glicose-próton e outro de baixa afinidade, no qual a atividade não está associada ao movimento do próton.

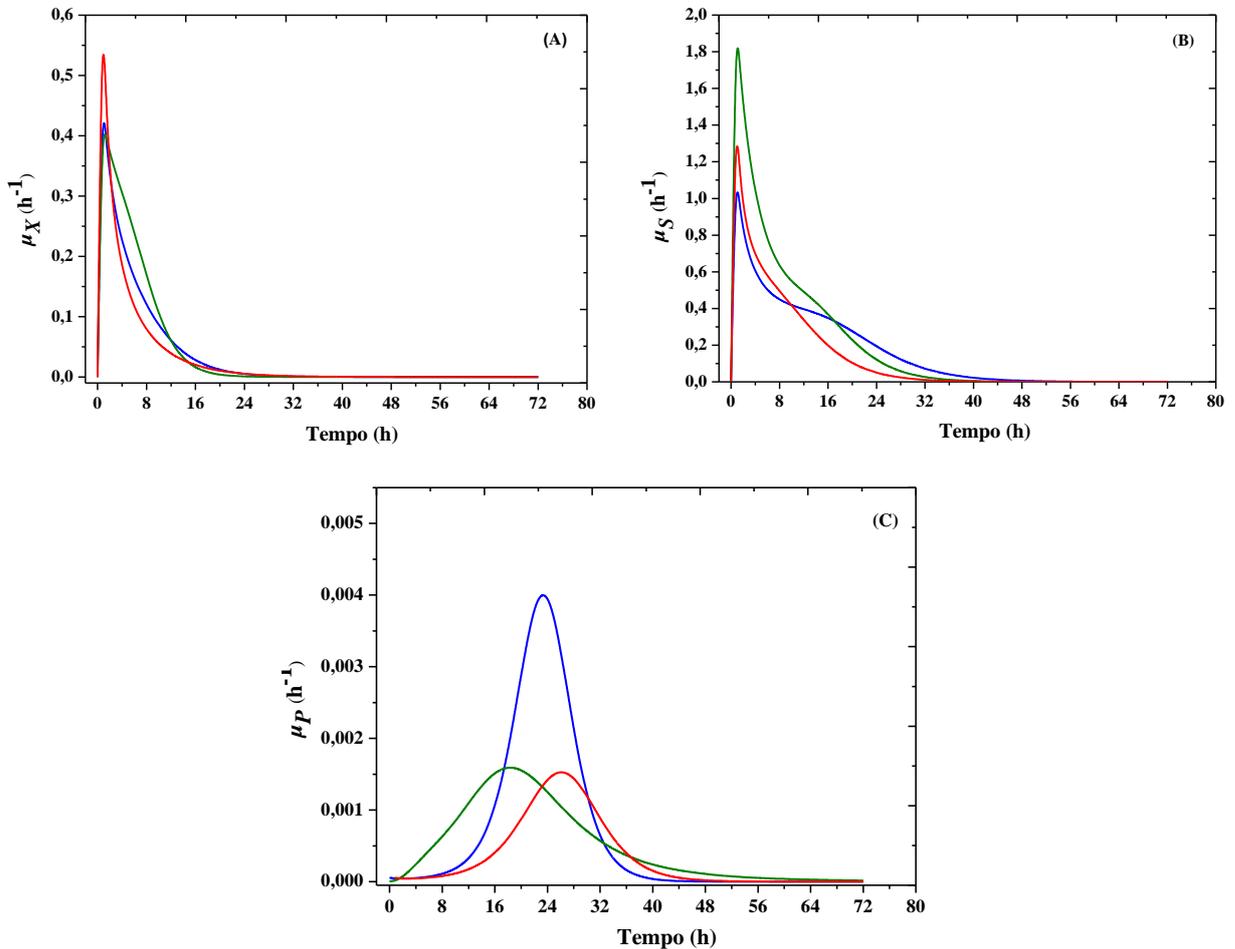
No caso da frutose, ela é transportada pelo sistema de baixa afinidade que é também utilizado pela glicose quando presente no meio. Embora a glicose e a frutose compartilhem um sistema comum, existe também um simporte de prótons de alta afinidade específico para a frutose, que permite o consumo deste monossacarídeo em paralelo ao consumo da glicose. Diante disso, a repressão exercida pela glicose sobre o consumo de frutose é certamente muito baixa em *K. marxianus* (FONSECA; CARVALHO; GOMBERT, 2013).

Do ponto de vista industrial, o consumo simultâneo de açúcares pelo micro-organismo produtor é altamente desejado, pois diminui o tempo de processo e, conseqüentemente, aumenta a produtividade (FONSECA; CARVALHO; GOMBERT, 2013).

As velocidades específicas de crescimento celular ( $\mu_x$ ), consumo de substrato ( $\mu_s$ ) e produção de 2-FE ( $\mu_p$ ) foram calculadas, e os resultados para as concentrações de glicose mais frutose de  $131 \pm 5,7 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $106 \pm 1,2 \text{ g.L}^{-1}$  e  $74 \pm 2,8 \text{ g.L}^{-1}$  no suco de caju são apresentados nas Figuras 10 e 11.

Na Figura 10A, comparando todos os experimentos realizados, é possível observar que a velocidade específica de crescimento ( $\mu_x$ ) foi maior na menor concentração de açúcar ( $74 \pm 2,8 \text{ g.L}^{-1}$ ), mostrando um  $\mu_{x\text{máx}}$  de  $0.50 \text{ h}^{-1}$  (vide Tabela 7), enquanto que para as demais concentrações de açúcar estudada ( $131$  e  $106 \text{ g.L}^{-1}$ ) as velocidades específicas de crescimento ( $\mu_x$ ) foram muito semelhantes. As velocidades específicas de crescimento ( $\mu_x$ ) e de consumo de substrato ( $\mu_s$ ), Figuras 10A e 10B, apresentaram perfis análogos, correlacionando-se muito bem e mostrando que as reações de catabolismo do açúcar estão voltadas mais para o crescimento celular do que para a produção de 2-FE, tendo em vista que as velocidades específicas de produção ( $\mu_p$ ), Figura 10C, não apresentaram o mesmo comportamento que as demais.

Figura 10 - Velocidades específicas de crescimento ( $\mu_X$ ), consumo de substrato ( $\mu_S$ ) e produção de 2-FE ( $\mu_P$ ) para os cultivos realizados a 35 °C, 250 rpm, aeração de 2 L.min<sup>-1</sup> e 3,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe, utilizando suco de caju nas concentrações de açúcar (glicose + frutose) de 131 ± 5,7 g.L<sup>-1</sup> (■); 106 ± 1,2 g.L<sup>-1</sup> (■); 74 ± 2,8 g.L<sup>-1</sup> (■).



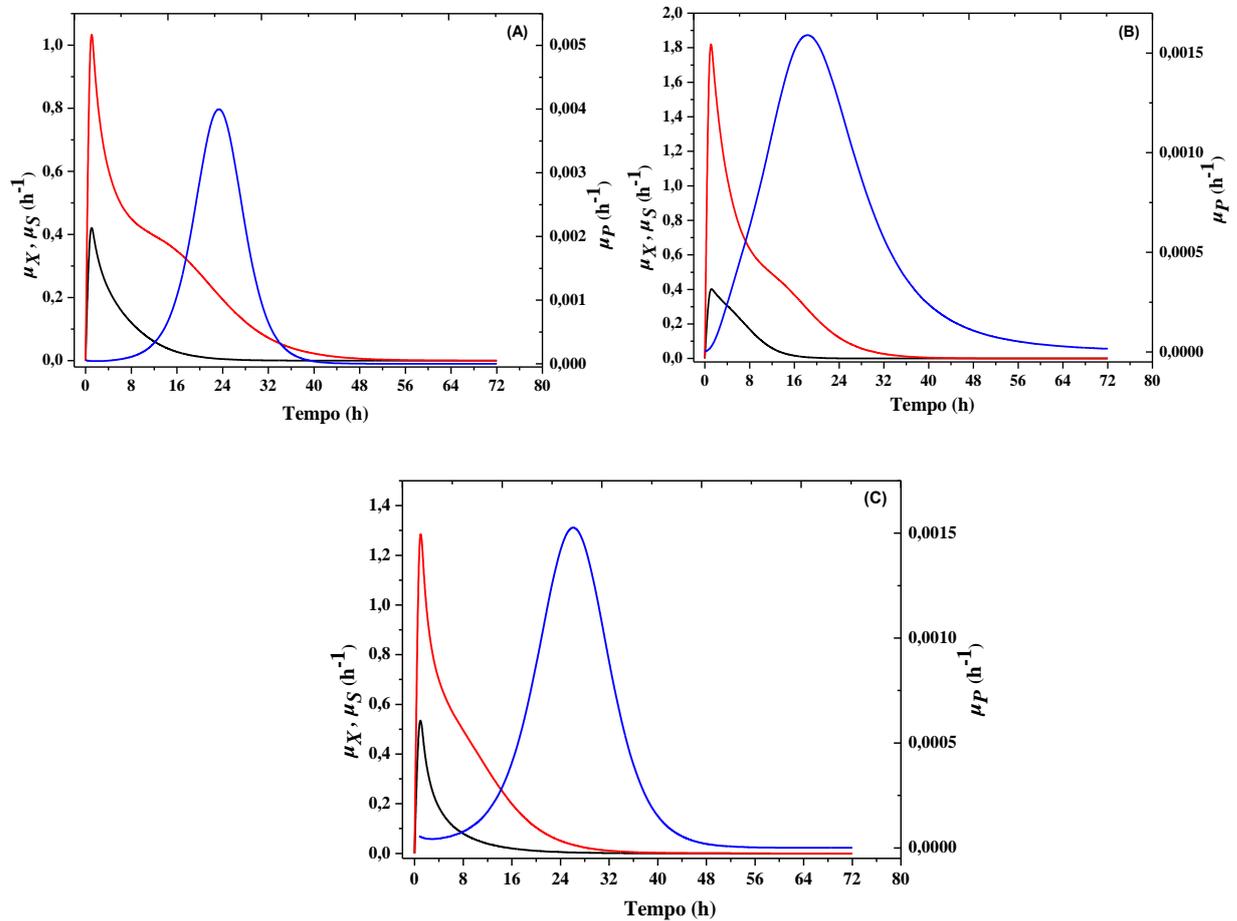
Fonte: Elaborada pelo autor.

Percebe-se na Figura 10B que a maior velocidade de consumo de substrato ocorreu na concentração intermediária de açúcar (106 g.L<sup>-1</sup>). A máxima velocidade específica de produção de 2-FE, Figura 10C, foi na concentração de 131 g.L<sup>-1</sup> de açúcar, enquanto as demais velocidades específicas de produção foram inferiores ao resultado da maior concentração de açúcar.

Como pode ser observado, as velocidades específicas de crescimento, consumo de substrato e formação de 2-FE, não parecem seguir um padrão correlacionado com a concentração inicial de açúcar. É difícil identificar uma tendência ao inspecionar as velocidades específicas, exceto pelo fato de que há uma diminuição nas velocidades específicas de produção com a diminuição das concentrações de açúcares.

É importante destacar o comportamento do metabolismo da *K. marxianus* ATCC 36907 na produção de 2-FE, utilizando o suco de caju como substrato. Para evidenciar melhor as velocidades de crescimento e produção, percebe-se nas Figuras 11 (A, B e C) que a maior taxa de crescimento ocorre nas primeiras horas de cultivo, em torno de 5 horas, após esse tempo, as taxas de crescimento começam a reduzir em todos os experimentos.

Figura 11 - Perfil das velocidades específicas de crescimento  $\mu_X$  (■), consumo de substrato  $\mu_S$  (■) e produção de 2-FE  $\mu_P$  (■) para os cultivos realizados a 35 °C, 250 rpm, aeração de 2 L.min<sup>-1</sup> e 3,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe, utilizando suco de caju nas concentrações de açúcar (glicose + frutose) de 131 ± 5,7 g.L<sup>-1</sup> (A); 106 ± 1,2 g.L<sup>-1</sup> (B); 74 ± 2,8 g.L<sup>-1</sup> (C).



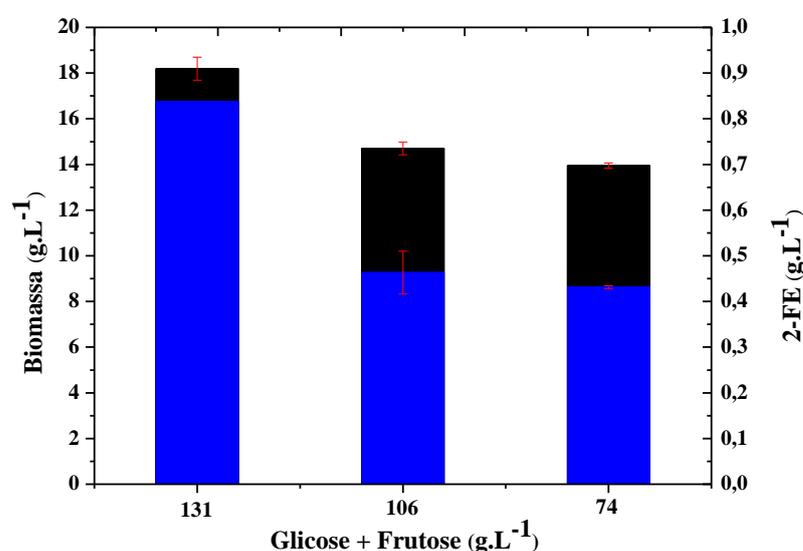
Fonte: Elaborada pelo autor.

Considerando as Figuras 11 (A, B e C) é possível compreender que no começo do processo predominaram as transformações produtoras de energia, com formação de biomassa e baixa produção de 2-FE, ligada as reações de decomposição do substrato. É também visível que após esse período inicial, a taxa específica de produção começa a aumentar em torno de 16 horas, chegando as máximas velocidades em aproximadamente 24 horas do cultivo, quando o

metabolismo catabólico das leveduras se encontrava reduzido. Provavelmente é nesse período que o micro-organismo assimila mais eficientemente a L-Phe. Pode-se comprovar mais uma vez por meio dos perfis de velocidades, que a produção de 2-FE é parcialmente associada.

Na Figura 12 fica mais evidente o comportamento da produção de biomassa e de 2-FE em relação a concentração inicial de açúcar.

Figura 12 - Máxima concentração de biomassa  $X_{máx}$  (■) e produção  $P_{máx}$  (■) para as concentrações de açúcar total (glicose + frutose) de  $131 \pm 5,7 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $106 \pm 1,2 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $74 \pm 2,8 \text{ g.L}^{-1}$ .



Fonte: Elaborada pelo autor.

Observa-se na Figura 12 que a máxima produção de biomassa ( $X_{máx}$ ) de  $18,18 \pm 0,50 \text{ g.L}^{-1}$  foi verificada na maior concentração de açúcar ( $131 \pm 5,7 \text{ g.L}^{-1}$ ). Nas duas concentrações mais baixas de açúcar a cepa *K. marxianus* ATCC 36907 atingiu uma concentração de biomassa de  $14,70 \pm 0,28 \text{ g.L}^{-1}$  e  $13,94 \pm 0,11 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente, nas diluições do suco de caju com  $106 \pm 1,2 \text{ g.L}^{-1}$  e  $74 \pm 2,8 \text{ g.L}^{-1}$  de açúcar.

No estudo realizado por Palitot (2017), que também utilizou o suco de caju integral para a produção de 2-FE por *K. marxianus* CCA 510, a concentração máxima de biomassa alcançada durante o cultivo, quando realizado com suplementação de  $3,0 \text{ g.L}^{-1}$  de L-Phe a  $35 \text{ °C}$ , foi de  $5,63 \text{ g.L}^{-1}$ .

Uma concentração máxima de biomassa semelhante foi observada por Gao e Daugulis (2009) utilizando *K. marxianus* CBS 600, em seu estudo elaborado com  $70 \text{ g.L}^{-1}$  de

glicose e  $26 \text{ g.L}^{-1}$  de L-Phe a uma temperatura de  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ , eles conseguiram observar uma produção celular de  $5,8 \text{ g.L}^{-1}$  obtida no final de 42,5 horas.

Comparando os resultados deste trabalho com os estudos realizado por Palitot, (2017) e Gao; Daugulis, (2009), para a produção de biomassa, é provável que os açúcares (glicose e frutose) tenham sido utilizados mais para o crescimento da levedura do que para a produção de 2-FE, visto que no estudo de Palitot (2017) e de Gao e Daugulis (2009) foi possível obter uma produção máxima de  $1,04 \text{ g.L}^{-1}$  e  $1,4 \text{ g.L}^{-1}$  de 2-FE, respectivamente, enquanto no estudo em questão a máxima produção de 2-FE foi  $0,84 \text{ g.L}^{-1}$ .

Semelhante à concentração celular, a máxima produção ( $P_{\text{máx}}$ ) de  $0,84 \text{ g.L}^{-1}$  de 2-FE foi obtida também quando se utilizou a maior concentração de açúcar ( $131 \pm 5,7 \text{ g.L}^{-1}$ ). Nas concentrações de 106 e  $74 \text{ g.L}^{-1}$ , onde a produção de 2-FE foi de  $0,46 \pm 0,04 \text{ g.L}^{-1}$  e  $0,43 \pm 0,002 \text{ g.L}^{-1}$  para as respectivas concentrações de açúcar, não se percebeu diferenças significativas na formação de 2-FE ( $p > 0,05$ ).

Em condições similares às utilizadas neste trabalho, Garavaglia *et al.* (2007) utilizando *K. marxianus* CBS 6556 para a produção de 2-FE em mosto de uva na concentração de  $186,2 \text{ g.L}^{-1}$  de açúcares redutores, suplementado com  $3,0 \text{ g.L}^{-1}$  de L-Phe, foi possível avaliar uma máxima produção de biomassa de  $11,2 \text{ g.L}^{-1}$  e  $0,77 \text{ g.L}^{-1}$  de 2-FE, em que a biomassa e o 2-FE produzidos foram, respectivamente; 38,4 % e 8,3 % inferiores as concentrações obtidas neste trabalho.

Mesmo o açúcar tenha sido direcionado mais para a produção de biomassa, ainda há uma grande influência da concentração inicial de açúcares na produção de 2-FE. Visto que na concentração de  $131 \text{ g.L}^{-1}$  foi obtido praticamente o dobro de 2-FE, quando se compara aos resultados das concentrações mais baixas de açúcares.

Outro fator importante é que por se operar em aerobiose, normalmente a quantidade de células geradas costuma ser muito intensa, em relação ao açúcar consumido, ao lado de uma quantidade relativamente baixa de produto.

Os parâmetros de conversão, que descrevem o desempenho do micro-organismo, foram calculados considerando ambos os açúcares (glicose e frutose) como a única fonte de carbono, os resultados estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Rendimento em biomassa,  $Y_{X/S}$  ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), rendimento de 2-FE,  $Y_{P/S}$  ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), produtividade de 2-FE  $Q_P$  ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ), produtividade de biomassa  $Q_X$  ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) e máxima velocidade específica de crescimento  $\mu_{Xmáx}$  ( $\text{h}^{-1}$ ) para as concentrações de açúcar total (glicose + frutose) de  $131 \pm 5,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $106 \pm 1,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $74 \pm 2,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  nos cultivos realizados a  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ , 250 rpm, aeração de  $2 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$  e  $3,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de L-Phe.

Parâmetros	Concentração de Açúcar (glicose + frutose)		
	$131 \pm 5,7 \text{ (g}\cdot\text{L}^{-1})$	$106 \pm 1,2 \text{ (g}\cdot\text{L}^{-1})$	$74 \pm 2,8 \text{ (g}\cdot\text{L}^{-1})$
$Y_{X/S} \text{ (g}\cdot\text{g}^{-1})$	0,1330 <sup>a</sup>	0,1383 <sup>a</sup>	0,1801 <sup>b</sup>
$Y_{P/S} \text{ (g}\cdot\text{g}^{-1})$	0,0066 <sup>c</sup>	0,0045 <sup>d</sup>	0,0060 <sup>c</sup>
$Y_{P/X} \text{ (g}\cdot\text{g}^{-1})$	0,0496 <sup>f</sup>	0,0323 <sup>e</sup>	0,0334 <sup>e</sup>
$Q_P \text{ (g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1})$	0,0116 <sup>h</sup>	0,0064 <sup>g</sup>	0,0060 <sup>g</sup>
$Q_X \text{ (g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1})$	0,2526 <sup>i</sup>	0,2042 <sup>i</sup>	0,1937 <sup>i</sup>
$\mu_{Xmáx} \text{ (h}^{-1})$	0,3428 <sup>k</sup>	0,3448 <sup>k</sup>	0,5039 <sup>l</sup>

Valores com letras iguais na mesma linha não diferem significativamente ao nível de 5 % de significância ( $p > 0,05$ ).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Observando a Tabela 7, o maior rendimento de biomassa ( $Y_{X/S} = 0,18 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) foi obtido do crescimento no suco de caju com a concentração inicial de  $74 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de açúcares redutores, assim como a maior taxa específica de crescimento ( $\mu_{Xmáx} 0,5039 \text{ h}^{-1}$ ). Pode-se constatar uma diminuição desse rendimento de  $0,18 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$  para aproximadamente  $0,13 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$  nas concentrações mais elevadas de açúcar, bem como a redução da taxa específica de crescimento. A diminuição do rendimento da biomassa, mesmo que não tenha sido acentuada, provavelmente foi devido ao aumento da contribuição de energia para manutenção celular e ao desvio do carbono para a formação de metabólitos.

O maior rendimento de 2-FE ( $Y_{P/S}$ ) de  $0,0066 \text{ g / g}$  de substrato foi obtido para o cultivo realizado na maior concentração de açúcar ( $131 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), no entanto, esse parâmetro não foi significativamente diferente ao encontrado na concentração de  $74 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de substrato. Já para concentração intermediária de açúcar, o valor encontrado foi relativamente mais baixo.

A produtividade volumétrica de 2-FE ( $0,0116 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) foi maior para o meio com  $131 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de substrato quando comparado aos resultados dos outros meios com concentrações mais baixas de açúcar. Percebe-se que a produtividade volumétrica foi proporcional ao aumento da concentração de açúcar, o que não pode ser confirmado para o rendimento de  $Y_{P/S}$ .

Conde-Báez *et al.* (2017) estudaram a produção de 2-FE em soro de leite constituído de  $55,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de lactose sem suplementação de L-Phe durante 24 horas a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  utilizando a *K. marxianus*. Os autores observaram uma máxima produção de 2-FE de  $0,96 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  com uma produtividade volumétrica de 2-FE de  $0,009 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Esse trabalho apresentou uma máxima

taxa específica de células de  $0,18 \text{ h}^{-1}$ , um rendimento de biomassa de  $0,19 \text{ g.g}^{-1}$ , na qual a produtividade volumétrica de produto e o  $\mu_{Xm\acute{a}x}$  foram muito inferiores aos encontrados neste trabalho. No entanto, a produção de 2-FE obtida por esses autores foi mais elevada do que a obtida neste trabalho.

Em relação ao desvio metabólico da produção de biomassa em produto ( $Y_{P/X}$ ), a Tabela 7 mostra que para esse parâmetro o maior valor ( $0,0496 \text{ g.g}^{-1}$ ) foi encontrado na concentração de açúcar mais elevada, já para as outras concentrações de açúcares avaliadas, não houve diferença significativa no rendimento  $Y_{P/X}$ .

Palitot (2017) utilizando suco de caju para produzir 2-FE por *K. marxianus* CCA 510 em condições semelhantes a deste estudo, alcançou um rendimento de produto por desvio metabólico cerca de 2,8 vezes superior ao maior rendimento ( $Y_{P/X}$ ) encontrado neste trabalho, mostrando que neste estudo o desvio dos açúcares foi muito baixo para a produção de 2-FE.

Essas diferenças nas concentrações e nos parâmetros do processo são consequência das condições do processo, das diferenças entre as linhagens da *K. marxianus*, das formas em que as células foram propagadas e preservadas (FONSECA; CARVALHO; GOMBERT, 2013).

A obtenção de concentrações elevadas de um metabólito em um cultivo aeróbio depende também da capacidade de se transferir oxigênio ( $\text{O}_2$ ) para a fase líquida. Geralmente, em meio aquoso sob 1 atmosfera e a  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ , a concentração de oxigênio dissolvido na saturação é apenas da ordem de  $7 \text{ mg.L}^{-1}$ , ou seja, o oxigênio é pouco solúvel em água, então de nada adiantaria dissolver concentrações elevadas de açúcar no meio, se não for possível introduzir ao longo do processo o oxigênio necessário para suportar a condição de aerobiose. Como as fermentações não são realizadas utilizando água pura, a presença de solutos como sais, ácidos e açúcares afeta a solubilidade do oxigênio (DORAN, 2013).

No suco de caju, presume-se que a concentração de saturação do oxigênio em relação ao valor observado para a água seja ainda menor, devido a dissolução de outras espécies químicas presentes no meio, além dos açúcares (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

A escolha do substrato utilizado no meio de cultivo, bem como sua concentração, pode afetar também a demanda de oxigênio. A taxa específica de oxigênio consumido é maior quando se utilizam substratos de carbono com alto grau de redução, por exemplo quando há glicose no meio de cultivo (DORAN, 2013).

Durante os cultivos, foram medidas as concentrações instantâneas de oxigênio dissolvido utilizando um eletrodo polarizado. No início dos cultivos, a concentração de  $\text{O}_2$  era a de saturação, a qual diminuía gradativamente com o aumento da concentração de biomassa

(dados não apresentados), visto que as células utilizam o  $O_2$  no processo de respiração celular. Dessa forma, utilizando os dados fornecidos pelos sensores do biorreator, foram calculadas as máximas taxas específicas de consumo de oxigênio ( $qO_2$  mmol.g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) e as concentrações totais de oxigênio consumido ( $QO_2$  mmol) em até 60 horas de processo. A Tabela 8 apresenta os resultados do consumo de oxigênio em todos os experimentos realizados para as concentrações iniciais de açúcares.

Um aumento na taxa de crescimento específico pode levar a maiores taxas de consumo de substrato e de oxigênio. No entanto, não foi adequadamente observado essa tendência neste trabalho, já que a maior taxa específica de crescimento ( $\mu_x = 0,5$  h<sup>-1</sup>) ocorreu na menor concentração de açúcar (74 g.L<sup>-1</sup>), e as máximas taxas específicas de consumo de oxigênio ( $qO_2 = 4,24$  mmol.g.L<sup>-1</sup>. h<sup>-1</sup>) e de substrato ( $\mu_s$ ) foram observadas na concentração de 106 g.L<sup>-1</sup> de açúcar.

Tabela 8 - Taxas específicas e consumo total de consumo de oxigênio em 60 horas de cultivo para as concentrações de açúcar total (glicose + frutose) de  $131 \pm 5,7$  g.L<sup>-1</sup>;  $106 \pm 1,2$  g.L<sup>-1</sup>;  $74 \pm 2,8$  g.L<sup>-1</sup> nos cultivos realizados a 35 °C, 250 rpm, aeração de 2 L.min<sup>-1</sup> e 3,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe.

Parâmetros	Concentração de Açúcar (Glicose + Frutose)		
	131 g.L <sup>-1</sup>	106 g.L <sup>-1</sup>	74 g.L <sup>-1</sup>
$qO_2$ mmol.g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	3,8	4,24	2,51
$QO_2$ mmol	206,1	163,35	178,2

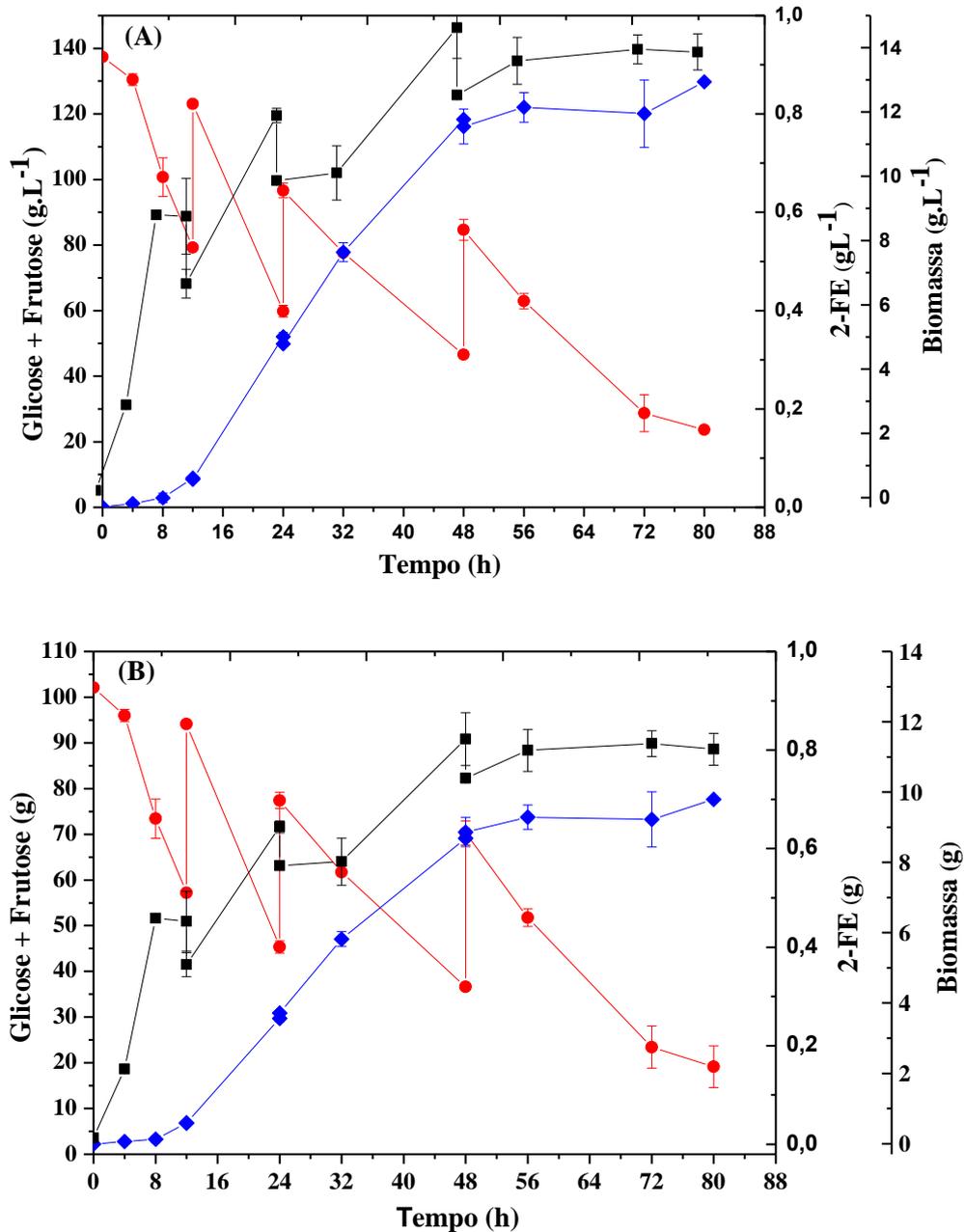
Fonte: Elaborada pelo autor.

Como pode ser observado na Tabela 8, o maior consumo cumulativo de oxigênio (206,1 mmol) ocorreu na maior concentração de açúcar, visto que, nesta mesma concentração, também se observou a maior produção de biomassa (18,18 g.L<sup>-1</sup>). Logo, supõe-se que foi necessário um maior consumo de oxigênio, a fim de produzir energia suficiente para sínteses de moléculas, manutenção das células, bom como para o crescimento de novas células.

#### 4.3.3 Efeito da produção de 2-FE em batelada alimentada

Para investigar se a repressão de catabólitos (glicose) poderia se estabelecer durante os cultivos em batelada com a cepa *K. marxianus* ATCC 36907, ou se haveria um possível aumento da produção de 2-FE, foi realizado um processo de batelada alimentada com 50 g.L<sup>-1</sup> de glicose em 12; 24 e 48 horas do processo. A Figura 13 apresenta os perfis da produção de 2-FE em batelada alimentada.

Figura 13 – Perfis da produção de 2-FE representados em termos de concentração (A) e em massa (B) do sistema de batelada alimentada a 35 °C, 250 rpm, aeração de 2 L.min<sup>-1</sup> utilizando suco de caju suplementado com 3,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe e adicionado de glicose (50 g.L<sup>-1</sup>) em tempos pré-estabelecidos. (♦) 2-FE; (■) Biomassa e (●) Glicose + Frutose.



Fonte: Elaborada pelo autor.

O que pode ser observado na Figura 13A, nas primeira e segunda etapas de alimentação (12 e 24 horas), é um rápido consumo de substrato com simultânea produção de biomassa e de 2-FE. A concentração de biomassa apresenta um perfil decrescente durante a

alimentação, pois a concentração de micro-organismo não depende só da massa presente, mas também do volume decorrente do acréscimo de nutriente no meio.

Na última etapa de alimentação, as 48 horas, não se observou crescimento acentuado de biomassa e nem produção de 2-FE até as 72 horas, mas houve um consumo de 72 % do substrato a partir da última alimentação até o final do processo. Logo, a hipótese a ser considerada é que as células consumiram o substrato para gerar energia, porém a energia produzida nessa etapa não foi aplicada para crescimento de biomassa e sim para manutenção do maquinário celular.

Outra suposição é que a energia gerada foi utilizada na reestruturação da fisiologia celular, em virtude da alta concentração de substrato, voltada para uma nova capacidade de crescer e conseqüentemente continuar produzindo. No entanto, não foi observado um novo crescimento, mas é visível que após as 72 horas há um ligeiro aumento da produção de 2-FE de 0,80 para 0,86 g.L<sup>-1</sup>.

A produção de 2-FE foi o principal fator utilizado como resposta para essa fase do estudo. Dessa forma, ao avaliar a Figura 13A, é possível perceber que a cada adição de glicose, a concentração de 2-FE aumentou até o máximo de 0,86 g.L<sup>-1</sup>. No entanto, em relação ao estudo anterior, foi observado uma menor produção de biomassa ( $14,62 \pm 0,95$  g.L<sup>-1</sup>) no final das 80 horas de cultivo. Essa menor produção reforça a teoria de que o substrato foi utilizado mais para preservação da viabilidade celular, do que para o crescimento.

Observa-se na Figura 13B que a máxima produção de 2-FE, em termos de massa, foi de  $0,69 \pm 0,05$  g e de biomassa  $11,5 \pm 0,74$  g. Em relação a produção de 2-FE, pode-se dizer que neste processo, houve uma melhora na produção quando comparado com os estudos anteriores, os quais apresentaram uma média de produção de 0,62 g de 2-FE, sendo esta melhora cerca de 11,3 % no final de 80 horas de processo. No entanto, deve-se levar em consideração o custo benefício deste tipo de processo, se realmente é promissor acrescentar mais nutriente e aumentar o tempo de produção.

No que se refere a massa de células, observou-se nesta etapa de batelada alimentada uma produção de biomassa em torno de 15 % inferior, quando se compara aos demais estudos, nos quais resultaram uma média de 13,5 g de biomassa. A redução na quantidade de células pode estar atribuída a alta quantidade de nutrientes, reprimindo o aumento da produção celular.

Um estudo de batelada alimentada realizado por Fabre *et al.* (1995) utilizando a *K. marxianus* CBS 6556 para a produção de 2-FE a 23 °C, em biorreator contendo 15 L de meio definido, alimentado com glicose (5 a 8 g.L<sup>-1</sup>), foi possível obter uma máxima produção de biomassa de 36 g.L<sup>-1</sup> e 0,4 g.L<sup>-1</sup> de 2-FE. Provavelmente, a produção foi realizada por meio

da via de síntese *de novo*, pois o meio não foi suplementado com L-Phe. Analisando os resultados desse autor, a produção de biomassa foi 2,4 vezes maior que a concentração obtida neste estudo. Percebe-se que a fonte de carbono foi direcionada mais para o crescimento do que para produção de 2-FE, a qual foi praticamente a metade do que a produzida neste trabalho.

#### **4.4 Conclusão**

Foi demonstrado que os processos realizados neste estudo foram conduzidos com a *K. marxianus* ATCC 36907 ainda em fase de crescimento relevante.

Foi constatado também que a concentração inicial de açúcar (glicose e frutose) influenciou o metabolismo da *K. marxianus* ATCC 36907 na produção de 2-FE, mostrando que a maior produção do metabólito e de células ocorreu utilizando a maior concentração de açúcares do suco de caju. Foi possível concluir também que a produção de 2-FE pela cepa *K. marxianus* ATCC 36907 é parcialmente associada ao crescimento, que foi mais elevada na fase estacionária.

De modo geral, foi possível concluir que a estratégia de alimentação pode ser utilizada para o aumento da produção de 2-FE. Foi possível constatar também uma redução no crescimento da levedura no processo de batelada alimentada.

Por fim, como a melhor produção de 2-FE ocorreu na concentração de 131 g.L<sup>-1</sup> de açúcar, levando em consideração os custos do processo de batelada alimentada, esta concentração foi tomada como base para os próximos experimentos.

## **5 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE L-PHE NO SUCO DE CAJU PARA PRODUÇÃO DE 2-FE**

### **5.1 Introdução**

As substituições dos meios nutrientes padrões da microbiologia por matrizes de alimentos complexas, como mosto de soja, suco, leite, mostraram que a composição do meio nutritivo induz a expressão de diferentes conjuntos de genes envolvidos na síntese de metabólitos. Essa observação levou a elaborar sistemas experimentais mais definidos, em que um produto químico puro serve como precursor a ser convertido ao metabólito de interesse.

Assim, a adição de um precursor adequado torna-se uma ferramenta modelo para melhorar os rendimentos do processo (BERGER; KRINGS, 2014).

A presença de L-Phe no meio de cultivo é fundamental para uma produção mais eficiente de 2-FE, e por isso, esse aminoácido é considerado como o seu precursor natural. Segundo Wittmann, Hans e Bluemke, (2002); Eshkol *et al.* (2009) são necessárias concentrações relevantes do precursor para fazer o metabolismo das leveduras se desviar para a rota de Ehrlich, rota da transformação microbiana da L-Phe a 2-FE. Esse metabólito é derivado quase que exclusivamente da L-Phe exógena, enquanto que a contribuição da glicose parece ser muito baixa.

A ativação da síntese de 2-FE em meio suplementado com L-Phe já foi demonstrada por diversos autores. Por exemplo, Etschmann, Sell e Schrader (2003) utilizaram 7,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe e obtiveram uma produção de 0,89 g.L<sup>-1</sup> de 2-FE com a *K. marxianus* CBS 600; Eshkol *et al.* (2009) em seu estudo usando 10,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe, foi possível obter uma produção de 0,9 g.L<sup>-1</sup> de 2-FE com *Saccharomyces cerevisiae*. No estudo de Oliveira *et al.* (2013b) utilizando a *K. marxianus* ATCC 36907 foi possível obter uma produção de 0,19 g.L<sup>-1</sup> de 2-FE a partir de 3,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe.

Logo, o controle da suplementação de L-Phe no meio de cultivo parece ser uma opção apropriada para elevar os níveis de 2-FE durante o processo.

Diante disso, esta etapa do trabalho teve como objetivo avaliar qual concentração inicial de L-Phe é mais significativa na síntese de 2-FE, assim como calcular a massa de 2-FE arrastada pela corrente gasosa, e um possível aumento da produção de 2-FE com a variação da aeração e L-Phe. Espera-se que os dados gerados resultem uma melhor compreensão do mecanismo de produção de 2-FE por *K. marxianus* ATCC 36907 em suco de caju.

## 5.2 Material e Método

Os experimentos realizados na avaliação da concentração inicial de L-Phe no processo de produção do 2-FE seguiram as metodologias apresentadas nos tópicos 3.1 a 3.4 do capítulo 3.

### 5.2.1 Influência da concentração de L-fenilalanina (L-Phe) no suco de caju para a produção de 2-FE

Foi realizado o estudo do efeito da concentração de L-Phe no suco de caju integral, constituído por uma média de 133,4 ± 2,4 g.L<sup>-1</sup> de açúcar total (glicose e frutose). Para isso,

avaliou-se as concentrações de 1,0; 3,0; 4,0 e 10,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe, mantendo a aeração de 2 L.min<sup>-1</sup>, a temperatura de 35 °C e agitação de 250 rpm. Nesse estudo, também foram analisados os parâmetros cinéticos e de conversão. Para cada concentração foram avaliadas as taxas específicas de crescimento celular ( $\mu_X$ ), taxa específica de consumo de açúcar ( $\mu_S$ ) e de produção de 2-FE ( $\mu_P$ ), concentração máxima de biomassa  $X_{máx}$  (g.L<sup>-1</sup>) e de 2-FE  $P_{máx}$  (g.L<sup>-1</sup>), assim como os rendimentos de biomassa ( $Y_{X/S}$ ), de produto ( $Y_{P/S}$ ) e a relação do desvio de açúcar da síntese de biomassa para produção de 2-FE ( $Y_{P/X}$ ). Foram avaliados também a máxima taxa específica de consumo de O<sub>2</sub> ( $qO_2$ ) e o consumo total de O<sub>2</sub> (QO<sub>2</sub>) em 60 horas de cultivo, seguindo a metodologia exposta no tópico 3.5.5.

### ***5.2.2 Massa de 2-FE no meio e massa arrastada pela corrente gasosa***

Foi realizado um estudo para calcular o arraste de 2-FE pela corrente de ar no reator. Para tal finalidade, utilizou-se um frasco contendo uma solução de 200 mL de álcool etílico 70 %, acoplado ao condensador do reator, o qual foi ligado a um banho na temperatura de 15 °C para condensação e solubilização do 2-FE arrastado. Foram retiradas alíquotas da solução do frasco em intervalos de tempos pré-definidos, as amostras foram avaliadas seguindo a metodologia do tópico 3.5.3. Esses experimentos foram realizados em biorreator a 35 °C e 250 rpm.

Para o experimento (A), o reator foi aerado a 4,0 L.min<sup>-1</sup> com suplementação de 8,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe no suco de caju.

Para o experimento (B), o reator foi aerado a 5,0 L.min<sup>-1</sup> com suplementação de 10,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe no suco de caju.

### ***5.2.3 Métodos analíticos***

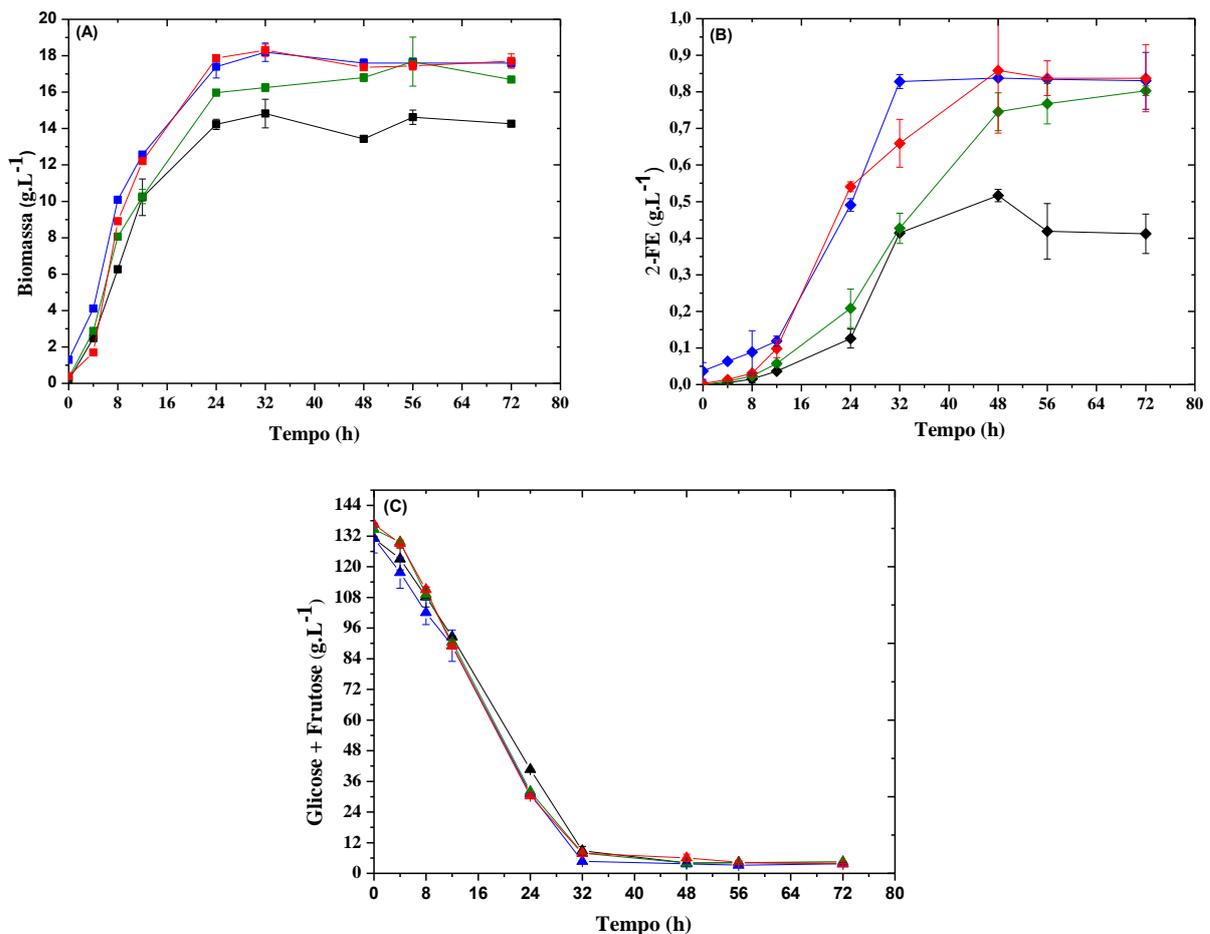
As concentrações de biomassa, substrato, 2-FE, os parâmetros cinéticos e de conversão foram mensurados seguindo as metodologias apresentadas nos tópicos 3.5.1 a 3.5.4 do capítulo 3.

## 5.3 Resultados e Discussão

### 5.3.1 Influência da concentração de L-Phe no suco de caju para a produção de 2-FE

Um segundo aspecto deste estudo foi investigar os efeitos da variação de L-Phe no suco de caju. Sabe-se que a produção significativa de 2-FE ocorre apenas em meio suplementado com L-Phe. Assim, os resultados da variação do precursor na produção de 2-FE são apresentados na Figura 14. Os perfis unidos de cada avaliação podem ser encontrados no Anexo A.

Figura 14 - Efeito da concentração de L-Phe no crescimento celular (A), produção de 2-FE (B) e consumo de açúcar total (C), para os cultivos realizados a 35 °C, 250 rpm, aeração de 2 L.min<sup>-1</sup> utilizando suco de caju nas concentrações de açúcar total (glicose + frutose) de 133 ± 2,4 g.L<sup>-1</sup>. Concentrações de L-fenilalanina de 1,0 g.L<sup>-1</sup> (■); 3,0 g.L<sup>-1</sup> (■); 4,0 g.L<sup>-1</sup> (■) e 10,0 g.L<sup>-1</sup> (■).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Estudando as Figuras 14A e 14B, durante a fase inicial, caracterizada pelo crescimento exponencial entre as faixas de tempo de 0 a 12 horas, é possível perceber uma baixa produção de 2-FE e uma elevada produção de células para todos os cultivos. É provável que nesse período de tempo o consumo da L-Phe não seja significativo, e a possível rota de produção seja por meio da síntese *de novo*, utilizando os açúcares presentes.

Após essa fase inicial, há uma diminuição no crescimento e a levedura começa a entrar na fase estacionária. É nesse mesmo período que se observa um aumento considerável da produção de 2-FE, acredita-se que nessa fase a rota de Ehrlich seja ativada pela levedura. Esse comportamento é exatamente o mesmo observado no estudo anterior, ou seja, a maior produção de 2-FE ocorre após as 12 horas de cultivo e na fase estacionária, a qual se estabelece em 24 horas de processo.

Ainda analisando as Figuras 14A e 14B, com exceção do cultivo suplementado com  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$  de L-Phe, todos os outros apresentaram uma alta produção de biomassa, as quais não foram significativamente diferenciadas ( $p > 0,05$ ).

Uma hipótese a ser considerada é que a levedura esteja consumindo a L-Phe também para produção de energia e crescimento celular, tendo em vista que na menor concentração do precursor, também foi verificado a menor produção de biomassa e de 2-FE (WITTMANN; HANS; BLUEMKE, 2002).

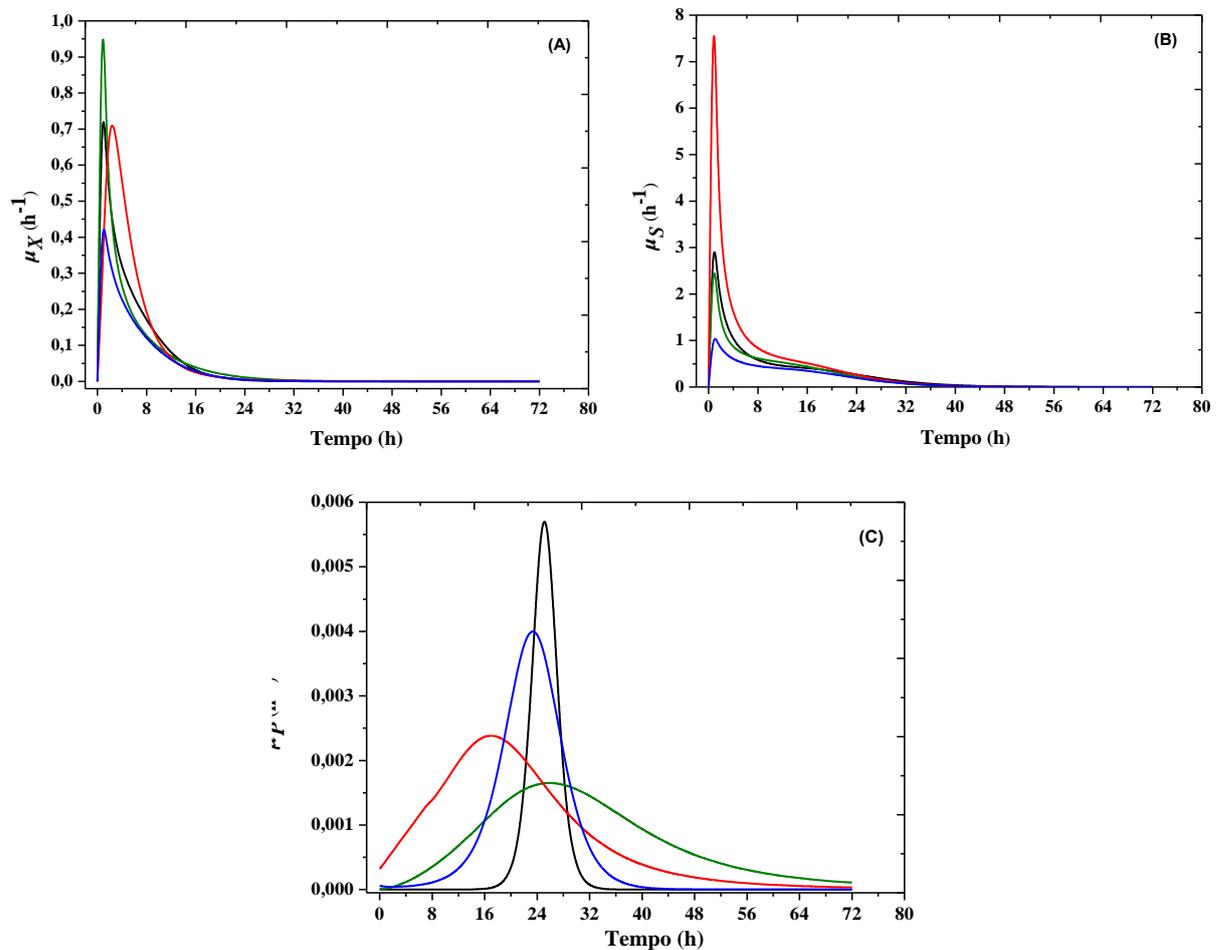
Na Figura 14B, pode-se verificar que a maior produção de 2-FE ocorreu nos cultivos suplementados com 3,0; 4,0 e  $10,0 \text{ g.L}^{-1}$  de L-Phe, as médias destas concentrações também não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ).

Avaliando o cultivo com  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$  de L-Phe (Figura 14B), nota-se uma perceptível queda da concentração de 2-FE em 48 horas. Uma explicação sugerida é que, possivelmente, tenha sucedido uma transformação do 2-FE. É importante lembrar que na rota de Ehrlich para a bioconversão da L-Phe, o 2-FE pode ser convertido em 2-feniletil acetato (*vide* Figura 4).

No que se refere ao consumo de substrato (Figura 14C) pela *K. marxianus* ATCC 36907 também não foi possível avaliar a preferência do açúcar pelo micro-organismo, mas o comportamento é precisamente o mesmo discutido no capítulo anterior. Para todos os experimentos foi consumido cerca de 97,2 % do substrato inicial até as 32 horas de cultivo. Pode-se destacar também que após as 24 horas de processo, esses substratos foram provavelmente usados para fins de manutenção e formação de produtos, uma vez que a concentração de biomassa (Figura 14A) permaneceu praticamente constante até as 72 horas.

Na Figura 15 são apresentados os comportamentos das taxas específicas de crescimento celular ( $\mu_X$ ), consumo de substrato ( $\mu_S$ ) e de produção ( $\mu_P$ ) em relação ao aumento da concentração inicial de L-Phe no suco de caju.

Figura 15 - Velocidades específicas de crescimento ( $\mu_X$ ), consumo de substrato ( $\mu_S$ ) e produção de 2-FE ( $\mu_P$ ) para os cultivos realizados a 35 °C, 250 rpm, aeração de 2 L.min<sup>-1</sup> para as concentrações de 1,0 (■), 3,0 (■), 4,0 (■) e 10,0 (■) g.L<sup>-1</sup> de L-fenilalanina, utilizando suco de caju integral.



Fonte: Elaborada pelo autor.

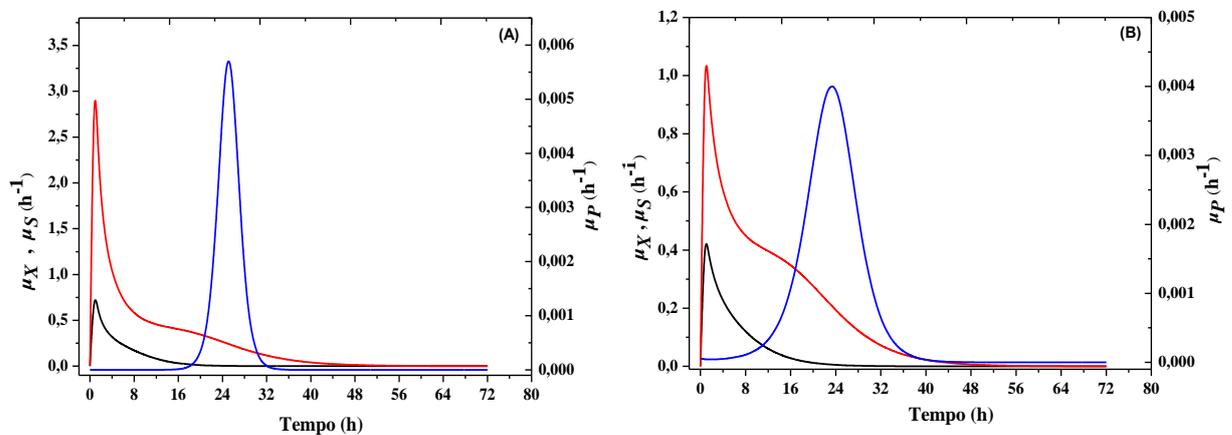
A maior velocidade específica de crescimento microbiano (Figura 15A) foi verificada na concentração de 4,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe, e a menor ocorreu na concentração de 3,0 g.L<sup>-1</sup>. Para as demais, (1,0 e 10,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe) as velocidades específicas de crescimento foram praticamente iguais. Em vista disso, entende-se que não houve uma tendência de aumento das velocidades de crescimento ao aumentar a concentração do precursor no meio.

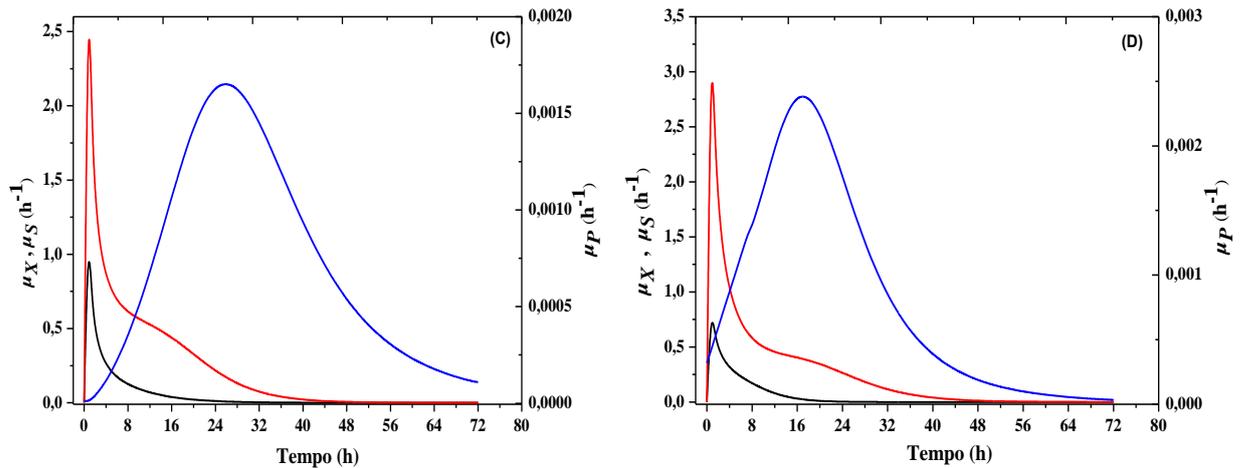
O cultivo realizado na concentração de  $10,0 \text{ g.L}^{-1}$  de L-Phe apresentou a maior velocidade específica de consumo de açúcar, e a menor foi em  $3,0 \text{ g.L}^{-1}$  do precursor (Figura 14B).

Ao analisar a Figura 15C, a maior taxa específica de produção foi verificada na concentração de  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$  de L-Phe. Pode-se perceber também que para as concentrações de  $1,0$  e  $3,0 \text{ g.L}^{-1}$  de L-Phe, as taxas específicas de produção de 2-FE crescem subitamente em 24 horas e decaem rapidamente após o esgotamento do açúcar em 32 horas. Já para as concentrações de  $4,0$  e  $10,0 \text{ g.L}^{-1}$  de L-Phe as velocidades crescem compassadamente desde o início dos processos, e também decaem lentamente após as 32 horas quando o substrato é limitado.

Na Figura 16 são apresentados os perfis das velocidades específicas de crescimento celular ( $\mu_X$ ), consumo de substrato ( $\mu_S$ ) e de produção ( $\mu_P$ ) para cada concentração de L-Phe avaliada.

Figura 16 - Perfil das velocidades específicas de crescimento  $\mu_X$  (■), consumo de substrato  $\mu_S$  (■) e produção de 2-FE  $\mu_P$  (■) para os cultivos realizados a  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $250 \text{ rpm}$ , aeração de  $2 \text{ L.min}^{-1}$ , utilizando suco de caju nas concentrações de açúcar (glicose + frutose) de  $133 \pm 2,4 \text{ g.L}^{-1}$ , para concentrações de  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$  (A);  $3,0 \text{ g.L}^{-1}$  (B);  $4,0 \text{ g.L}^{-1}$  (C) e  $10,0 \text{ g.L}^{-1}$  (D) de L-Phe.





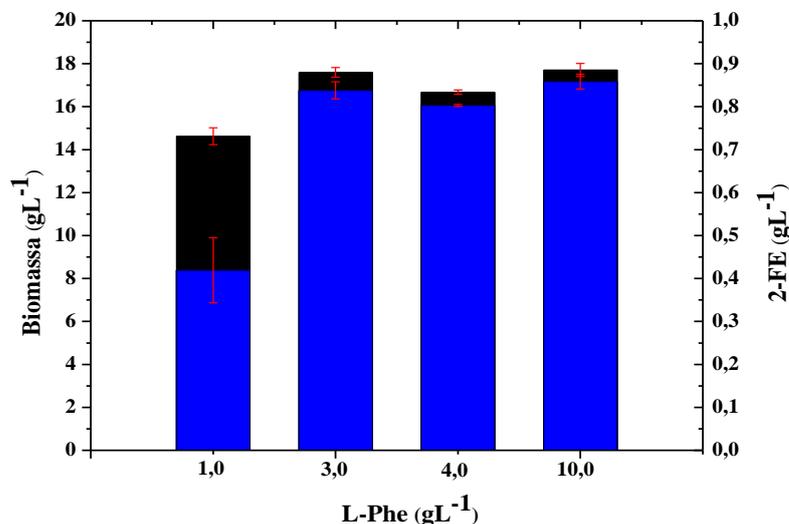
Fonte: Elaborada pelo autor.

Ao observar a Figura 16, fica claro que os perfis das taxas específicas de crescimento e consumo de substrato são análogos, fato esse, igualmente observado no estudo anterior. Inicialmente, para todos os cultivos, há uma predominância das reações catalíticas do substrato voltadas para o crescimento até as 4 horas de processo.

Já para o comportamento das velocidades específicas de produção, são observados perfis semelhantes, mas com tempos diferentes para o início da velocidade formação de produto. Nos processos com 1,0 e 3,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe (Figuras 16A e 16B), as velocidades de produção começam a aumentar a partir das 16 horas, mas para os cultivos realizados com 4,0 e 10,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe (Figuras 16C e 16D), essas velocidades são mais altas já nas primeiras horas dos cultivos, chegando ao seu ápice praticamente em 24 horas para os experimentos com 1,0; 3,0 e 4,0 g.L<sup>-1</sup> do precursor e em 16 horas para o processo com 10,0 g.L<sup>-1</sup>.

A Figura 17 apresenta a relação entre a máxima produção de biomassa e de 2-FE com a variação da concentração de L-Phe no suco de caju.

Figura 17 - Máxima concentração de biomassa  $X_{máx}$  (■) e produção  $P_{máx}$  (■) para os cultivos a 35 °C, 250 rpm, aeração de 2 L.min<sup>-1</sup>, realizados com suco integral (133 ± 2,4 g.L<sup>-1</sup>) nas concentrações de 1,0, 3,0, 4,0 e 10 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Analisando a Figura 17, não houve acréscimo significativo ( $p > 0,05$ ) na produção de biomassa para os estudos com concentrações iniciais de L-Phe de 3,0; 4,0 e 10,0 g.L<sup>-1</sup>, chegando ao máximo de 18,18 ± 0,50 g.L<sup>-1</sup>, 17,67 ± 1,34 g.L<sup>-1</sup> e 18,30 ± 0,33 g.L<sup>-1</sup> de células, respectivamente, para as concentrações do precursor. Fato esse que não corrobora com os resultados analisados por Palitot (2017), que em seu estudo avaliando a produção de 2-FE em suco de caju com e sem suplementação de L-Phe, percebeu uma menor concentração de biomassa, aproximadamente 5,6 g.L<sup>-1</sup>, quando suplementou o meio com L-Phe, ou seja, a L-Phe teve influência no crescimento.

Neste estudo as concentrações de biomassa não foram influenciadas na presença de concentrações mais elevadas de L-Phe (3,0; 4,0 e 10 g.L<sup>-1</sup>). Mas para a concentração de 1,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe foi observado uma produção de biomassa inferior (14,81 ± 0,78 g.L<sup>-1</sup>), no entanto, ainda foi 2,6 vezes maior que a concentração observada por Palitot (2017) em condições semelhantes de processo.

A partir da concentração de 3,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe, o aumento da concentração do precursor não propiciou acréscimos significativos na produção de 2-FE ( $p > 0,05$ ). As quantidades de 2-FE obtidas foram semelhantes para as concentrações de 3,0; 4,0 e 10,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe, sendo de 0,84 g.L<sup>-1</sup>; 0,80 g.L<sup>-1</sup> e 0,85 g.L<sup>-1</sup> de 2-FE, respectivamente, para cada concentração do precursor.

Esses resultados levantam diretamente suposições sobre o destino da fração de L-Phe que não foi convertida em produto, já que a produção foi praticamente igual para as concentrações mais elevadas. Novamente, pode-se reforçar a suposição que o fluxo de L-Phe está sendo direcionado para uma acumulação de 2-feniletil acetato pela transesterificação do 2-FE (WITTMANN; HANS; BLUEMKE, 2002).

Já para concentração de 1,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe houve uma limitação na produção de 2-FE (0,42 g.L<sup>-1</sup>), que foi bem inferior as demais concentrações estudadas.

No estudo de Etschmann, Sell e Schrader (2003) usando melão de beterraba como meio de cultura, suplementado com 7,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe, foi possível atingir uma produção de 0,89 g.L<sup>-1</sup> de 2-FE pela *K. marxianus* CBS 600, no processo realizado a 35 °C. Essa concentração de 2-FE foi muito próxima a obtida neste estudo.

Garavaglia *et al.* (2007) utilizando mosto de uva adicionado de 5,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe, obtiveram uma produção de 0,39 g.L<sup>-1</sup> de 2-FE em cultivo realizado em frascos agitados, e alcançou a máxima produção de 0,77 g.L<sup>-1</sup> em biorreator utilizando 3,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe. Esse resultado no biorreator é 9,09 % menor ao encontrado neste trabalho.

A Tabela 9 apresenta os parâmetros de conversão e cinéticos para os estudos avaliados nas diferentes concentrações de L-Phe.

Tabela 9 - Rendimento em biomassa,  $Y_{X/S}$  (g.g<sup>-1</sup>), rendimento de 2-FE,  $Y_{P/S}$  (g.g<sup>-1</sup>), produtividade de 2-FE  $Q_P$  (g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>), produtividade de biomassa  $Q_X$  (g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) e máxima velocidade específica de crescimento  $\mu_{X\max}$  (h<sup>-1</sup>) para as concentrações de 1,0; 3,0; 4,0 e 10,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe para os cultivos realizados com suco integral (133 ± 2,4 g.L<sup>-1</sup>), 35 °C, 250 rpm e aeração de 2 L.min<sup>-1</sup>.

Parâmetros	Concentração de L-Phe (g.L <sup>-1</sup> )			
	1.0 (g.L <sup>-1</sup> )	3.0 (g.L <sup>-1</sup> )	4.0 (g.L <sup>-1</sup> )	10.0 (g.L <sup>-1</sup> )
$Y_{X/S}$ (g.g <sup>-1</sup> )	0,1151 <sup>b</sup>	0,1279 <sup>a</sup>	0,1335 <sup>a</sup>	0,1349 <sup>a</sup>
$Y_{P/S}$ (g.g <sup>-1</sup> )	0,0041 <sup>d</sup>	0,0066 <sup>c</sup>	0,0062 <sup>c</sup>	0,0064 <sup>c</sup>
$Y_{P/X}$ (g.g <sup>-1</sup> )	0,0352 <sup>g</sup>	0,0514 <sup>f</sup>	0,0462 <sup>e</sup>	0,0494 <sup>e</sup>
$Q_P$ (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	0,0072 <sup>i</sup>	0,0116 <sup>h</sup>	0,0112 <sup>h</sup>	0,0119 <sup>h</sup>
$Q_X$ (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	0,2058 <sup>l</sup>	0,2444 <sup>j</sup>	0,2455 <sup>j</sup>	0,2543 <sup>j</sup>
$\mu_{X\max}$ (h <sup>-1</sup> )	0,5115 <sup>m</sup>	0,3428 <sup>o</sup>	0,863 <sup>n</sup>	0,5891 <sup>m</sup>

Valores com letras iguais na mesma linha não diferem significativamente ao nível de 5 % de significância ( $p > 0,05$ ).  
Fonte: Elaborada pelo autor.

Analisando a Tabela 9, nota-se o efeito do rendimento de biomassa influenciado pela concentração de L-Phe a partir dos valores de  $Y_{X/S}$  calculados. Para esse parâmetro é

possível observar que houve um sutil acréscimo no rendimento de biomassa de 0,1151 a 0,1349 g.g<sup>-1</sup>, com o aumento da concentração inicial de L-Phe.

O menor rendimento de células ( $Y_{XS} = 0,1151 \text{ g.g}^{-1}$ ) em relação ao consumo de substrato foi obtido na concentração de 1,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe, sendo um pouco inferior às demais concentrações estudadas no processo. Esses resultados estão de acordo com o que foi apresentado sobre a máxima concentração de biomassa (*vide* Figura 17).

A maior velocidade específica de crescimento de ( $\mu_{Xmáx} = 0,8631 \text{ h}^{-1}$ ) foi observada no cultivo com 4,0 g.L<sup>-1</sup> do precursor, e a menor ocorreu para o meio com 3,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe. Apesar da taxa específica de crescimento ser a mais baixa, foi na concentração de 3,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe que se observou o maior rendimento de substrato em produto ( $Y_{P/S} = 0,0066 \text{ g.g}^{-1}$ ) e também o maior desvio metabólico da produção de células para formação de 2-FE ( $Y_{P/X} = 0,0514 \text{ g.g}^{-1}$ ).

Como não houve um aumento significativo no rendimento de 2-FE com quantidades mais elevadas de L-Phe, entende-se que provavelmente, o substrato tenha sido utilizado mais para manutenção celular. Outra hipótese para explicar os baixos rendimentos de 2-FE em altas concentrações de L-Phe, pode ser atribuída a uma inibição pela própria L-Phe ou por subprodutos da degradação desse aminoácido. Uma provável alternativa para aumentar os rendimentos, seria avaliar um cultivo alimentado com L-Phe.

Também é provável que a L-Phe esteja sendo degradada a partir da via do cinamato, e portanto, não é possível converter toda L-Phe em 2-FE (ANGELOV; GOTCHEVA, 2012).

Em relação a produtividade volumétrica de 2-FE ( $Q_P$ ), não foi constatado diferenças significativas para as concentrações de 3,0 a 10,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe (Tabela 9). O mesmo se confirma para a produtividade de biomassa ( $Q_X$ ), os valores obtidos em todos os cultivos foram bem similares.

Oliveira *et al.* (2013b) utilizando a cepa *K. marxianus* ATCC 36907 para a produção de 2-FE, a temperatura de 24 °C por 72 horas de processo, conseguiram observar um rendimento de produto ( $Y_{P/S}$ ) de 0,0032 g.g<sup>-1</sup> em água de resíduo de fecularia, suplementada com 3,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe. Os autores observaram também um rendimento de produto por desvio metabólico ( $Y_{P/X}$ ) de 0,04 g.g<sup>-1</sup>, e o rendimento de biomassa por grama de substrato de ( $Y_{X/S}$ ) 0,1216 g.g<sup>-1</sup>. Esses resultados estão muito próximos aos encontrados neste trabalho, porém a máxima produção de 2-FE alcançada foi de 0,19 g.L<sup>-1</sup>, um valor de 4,5 vezes inferior ao deste estudo.

Já Etschmann e Schrader (2006) obtiveram um  $Y_{P/X}$  de 0,74 g.g<sup>-1</sup> para *Kluyveromyces marxianus* CBS 600 em processo de duas fases, aquoso e orgânico, utilizando uma concentração saturada 50,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe.

Uma explicação viável para os baixos rendimento de 2-FE neste trabalho, mesmo com altas concentrações de L-Phe, deve estar ligada a rota metabólica deste aminoácido no meio intracelular.

Ao avaliar a estequiometria da reação, sabe-se que teoricamente 1 mol de L-Phe produz 1 mol de 2-FE. Dessa forma, foi realizado o cálculo teórico do consumo da L-Phe para a produção de 2-FE. Os resultados teóricos da estequiometria de conversão da L-Phe em 2-FE podem ser avaliados examinando a Tabela 10.

É visível que, em teoria, a bioconversão da L-Phe não é completa. É possível observar que a maior eficiência de consumo da L-Phe ocorreu na concentração de 1,0 g.L<sup>-1</sup> do precursor, sendo consumido teoricamente 40 % da quantidade adicionada ao meio. Para as outras concentrações avaliadas, as quantidades de L-Phe consumidas foram muito semelhantes.

Tabela 10 - Estequiometria da reação de conversão da L-Phe a 2-FE para as concentrações de 1,0; 3,0; 4,0 e 10,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe nos cultivos realizados com suco integral (133 ± 2,4 g.L<sup>-1</sup>), 35 °C, 250 rpm e aeração de 2 L.min<sup>-1</sup>.

<b>Estequiometria da Reação</b>		
<b>Adição de L-Phe (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>L-Phe convertida em 2-FE (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>2-FE produzido g.L<sup>-1</sup></b>
1,0	0,40	0,42
3,0	0,80	0,84
4,0	0,76	0,80
10,0	0,82	0,86

Fonte: Elaborada pelo autor.

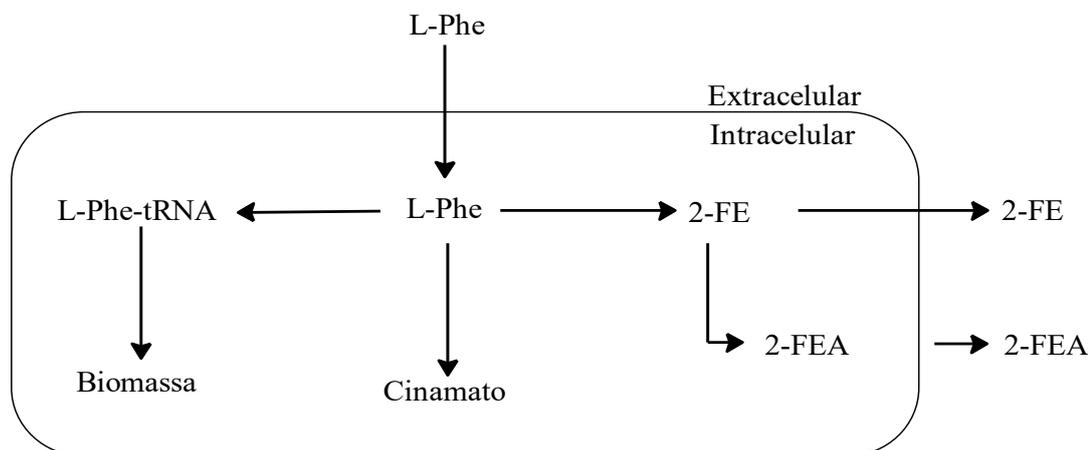
Uma estudo desenvolvido por Wittmann, Hans e Bluemke (2002) comprova o destino da L-Phe, explicando seu caminho metabólico pela *K. marxianus*. Esses autores conseguiram avaliar um rendimento de 0,65 mols de 2-FE / mol de L-Phe, e afirmaram que a *K. marxianus* tem a capacidade de separar catabolicamente a L-Phe no meio intracelular.

Uma direção do fluxo de L-Phe é para o acúmulo de 2-fenilacetato e para sua degradação pela via do cinamato. Esta afirmação de Wittmann, Hans e Bluemke (2002) pode ser visualizada no esquema proposto pelos autores, no qual eles afirmaram que 0,73 mol da L-Phe foi direcionada para a produção de 2-FE e 0,08 mol de L-Phe foi para transformação do 2-FE em fenilacetato, deixando ainda uma fração de L-Phe não convertida.

Essa fração de L-Phe não convertida foi direcionada para produção de biomassa e para a via do cinamato, via que catalisa a L-Phe em CO<sub>2</sub> e outros metabólitos. O esquema pode ser visualizado na Figura 18.

Desde que não haja outra rota de degradação da L-Phe, há uma grande perda da L-Phe no meio pela via do cinamato, já que pouco desse aminoácido é direcionado para produção de células (WITTMANN; HANS; BLUEMKE, 2002).

Figura 18 - Fluxo metabólico de L-Phe no meio intracelular da *K. marxianus*.



Fonte: Adaptado de Wittmann, Hans e Bluemke (2002).

Assim, os resultados apresentados nesta etapa do trabalho mostraram uma baixa conversão da L-Phe.

Devido à alta concentração de biomassa produzida pela *K. marxianus* ATCC 36907 e a produção de 2-FE, um equilíbrio se estabelece na bioconversão e mesmo acrescentando altas concentrações de L-Phe não há um efeito considerável sobre a produção do aroma. Pode-se observar que uma concentração de 3 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe é ideal para a biotransformação em 2-FE.

A Tabela 11 apresenta os resultados das taxas específicas de consumo de oxigênio e o consumo cumulativo de O<sub>2</sub> pela levedura em 60 horas de cultivo, para os experimentos realizados na avaliação da concentração inicial de L-Phe. Células em altas velocidades específicas de crescimento exige também elevadas velocidades específicas de respiração, no entanto, não foi o ocorrido nessa avaliação, pois a maior velocidade específica de consumo de oxigênio (15,2 mmol.g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) foi obtida no cultivo com adição de 1,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe no suco de caju, mas a maior velocidade específica de crescimento (0,8631.h<sup>-1</sup>) ocorreu no cultivo suplementado com 4,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe.

Sabe-se que a produção de 2-FE ocorre pelo desvio metabólico da produção de etanol para a produção do aroma, o qual exige condições de aeração para que o metabolismo da levedura seja desviado.

Neste trabalho não foi observado um aumento na produção de 2-FE com o aumento do consumo específico de  $O_2$ , pois o cultivo que apresentou a maior taxa específica de respiração, apresentou uma baixa produção de 2-FE ( $0,42 \text{ g.L}^{-1}$ ). Uma provável explicação para a alta taxa de consumo de oxigênio do cultivo realizado com  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$  de L-Phe pode ser atribuída a utilização do  $O_2$  para geração de ATP, utilizado para síntese de novas moléculas, biomassa ou consumo de oxigênio basal. No entanto, não foi observado uma alta produção de células para esse mesmo cultivo, ou seja, provavelmente, o consumo de oxigênio foi destinado mais para a manutenção das atividades biológica das células.

Tabela 11 - Taxas específicas de consumo de oxigênio e consumo total de oxigênio em 60 horas de cultivo para as concentrações de 1,0; 3,0; 4,0 e 10,0  $\text{g.L}^{-1}$  de L-Phe nos cultivos realizados com suco integral ( $133 \pm 2,4 \text{ g.L}^{-1}$ ),  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ , 250 rpm e aeração de  $2 \text{ L.min}^{-1}$ .

Parâmetros	Concentração de L-Phe			
	1,0 $\text{g.L}^{-1}$	3,0 $\text{g.L}^{-1}$	4,0 $\text{g.L}^{-1}$	10,0 $\text{g.L}^{-1}$
$qO_2 \text{ mmol.g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$	15,2	3,8	4,04	2,11
$QO_2 \text{ mmol}$	67,5	206,1	152	129,6

Fonte: Elaborada pelo autor.

Avaliando a Tabela 11, também pode ser observado uma tendência na diminuição da taxa de consumo específico de oxigênio com o aumento da concentração de L-Phe. O mesmo não pode ser observado para o consumo cumulativo de  $O_2$  durante o cultivo. No entanto, talvez as concentrações mais elevadas de consumo total de oxigênio tenham ocorrido devido também as altas produções de biomassa, para os cultivos realizados com  $3,0 \text{ g.L}^{-1}$  a  $10,0 \text{ g.L}^{-1}$  de L-Phe.

### 5.3.2 Massa de 2-FE no meio e massa arrastada pela corrente gasosa

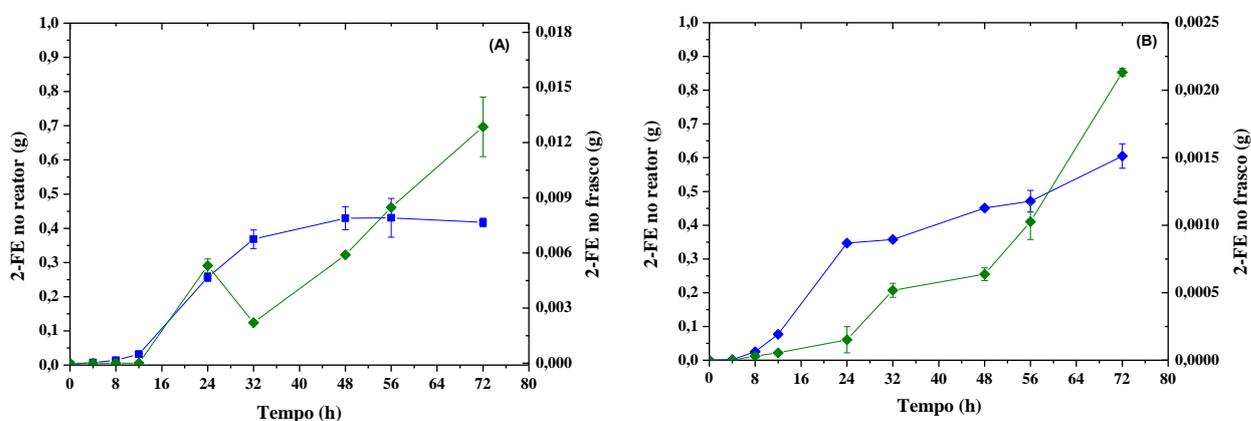
Uma etapa adicional deste capítulo foi verificar o arraste de 2-FE pela corrente gasosa. Para isso, realizou-se dois experimentos variando a aeração e a concentração de L-Phe. Nesse estudo a massa de 2-FE produzido pela *K. marxianus* ATCC 36907 e a massa de 2-FE arrastada pela corrente de ar, foram analisadas. Os dados da cinética de crescimento e os perfis completos dos cultivos podem ser visualizados nos Anexos A e B, visto que as descrições dos perfis são semelhantes aos já estudados.

Avaliando a Figura 19A, no cultivo sob a aeração de  $4,0 \text{ L.min}^{-1}$  e suplementação de  $8,0 \text{ g.L}^{-1}$  de L-Phe, a máxima massa de 2-FE produzida foi de  $0,43 \pm 0,057 \text{ g}$  e a massa de

2-FE arrastada pela corrente gasosa foi de  $0,012 \pm 0,001$  g, somando uma concentração total de  $0,59 \text{ g.L}^{-1}$  de 2-FE.

Já para o cultivo com aeração de  $5,0 \text{ L.min}^{-1}$  e  $10,0 \text{ g.L}^{-1}$  de L-Phe no suco de caju, a maior massa de 2-FE produzida foi de  $0,60 \pm 0,036$  g e para o 2-FE arrastado foi de  $0,002 \pm 2,89 \times 10^{-5}$  g, somando uma concentração de  $0,80 \text{ g.L}^{-1}$  de 2-FE.

Figura 19 - Massa de 2-FE produzida no reator mais a massa 2-FE arrastada pela corrente de ar do reator (frasco) para os cultivos realizado a  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  e 250 rpm com aeração de  $4,0 \text{ L.min}^{-1}$  e  $8,0 \text{ g.L}^{-1}$  de L-Phe (A); cultivo realizado a  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  e 250 rpm com aeração de  $5,0 \text{ L.min}^{-1}$  e  $10,0 \text{ g.L}^{-1}$  de L-Phe (B). 2-FE no reator ( $\blacklozenge$ ) e 2-FE no frasco ( $\blacklozenge$ ).



Fonte: Elaborada pelo autor.

O arraste só foi evidente a partir das 24 horas de cultivo e se prolongou até o final do processo, e é a partir de 12 horas que se observa o aumento da produção de 2-FE.

Em teoria, um aumento do oxigênio disponível no meio rege o desvio do metabolismo da *K. marxianus* para a produção de 2-FE. No entanto, pode significar também um maior arraste de 2-FE pela corrente gasosa, assim como a possibilidade de um maior grau de cisalhamento das células, devido ao aumento da vazão de oxigênio.

Apesar de ter ocorrido o arraste, pode-se observar nas Figuras 19A e 19B que a massa perdida pelo arraste durante os cultivos é negligenciável, logo não há um incremento na produção de 2-FE quando somado as massas calculadas no reator e no frasco.

Uma possível explicação para a baixa produção com o aumento da aeração, pode ser atribuída a uma baixa solubilização do oxigênio no meio. Esse elemento é muito pouco solúvel em meio aquoso, e por isso há uma menor disponibilidade de  $\text{O}_2$  para as células.

## 5.4 Conclusão

Com os estudos realizados, pode-se concluir que a suplementação de 3,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe é mais significativa na produção de 2-FE, pois os melhores rendimentos da bioconversão da L-Phe foram encontrados no cultivo com essa concentração do precursor.

Por fim, não foi possível aumentar a produção de 2-FE variando a aeração e a concentração de L-Phe no meio de cultivo. E o arraste de 2-FE pela corrente de ar foi considerado irrelevante.

## 6 CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS FUTURAS

A metodologia de produção de 2-FE por *K. marxianus* ATCC 36907 foi bem descrita e os resultados deste trabalho provaram que a cepa foi capaz de proporcionar uma produção significativa de 2-FE. As propostas apresentadas para a produção desse aroma visaram substituir o meio de cultura convencional e aproveitar um remanescente da cajucultura, o pedúnculo. Nessa abordagem foi comprovado que o suco de caju *in natura* com uma suplementação de 3,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe proporciona uma melhoria na produção de 2-FE, visto que nessa concentração foi observada os melhores rendimentos de conversão do produto. Até o momento, esta estratégia biotecnológica apresenta um caminho interessante para a produção de 2-FE, em substituição aos processos industriais atuais.

Para melhorar a rentabilidade do bioprocesso, um plano de estudo para produção de 2-FE pode estar relacionado com o uso de micro-organismos modificados geneticamente. Uma abordagem de batelada alimentada com L-Phe pode ser empregada, visando aumentar os rendimentos na produção de 2-FE.

A extração do produto *in situ* também é uma alternativa para tentar elevar a produção de 2-FE, ou até mesmo um estudo alimentado com L-Phe seguido de extração.

## REFERÊNCIAS

- ADLER, P.; HUGEN, T.; WIEWIORA, M.; KUNZ, B. Modeling of an integrated fermentation/membrane extraction process for the production of 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 3, p. 285–292, 2011.
- ALBUQUERQUE, T. L.; GOMES, S. D. L.; MARQUES JR., J. E.; SILVA JR., I. J. da; ROCHA, M. V. P. Xylitol production from cashew apple bagasse by *Kluyveromyces marxianus* CCA510. **Catalysis Today**, v. 255, p. 33–40, out. 2015.
- ANGELOV, A. D.; GOTCHEVA, V. Biosynthesis of 2-phenylethanol by yeast fermentation. **Scientific Works of UFT**, v. 59, p. 490–495, 2012.
- BARROS, E. M.; CARVALHO, V. M.; RODRIGUES, T. H. S.; ROCHA, M. V. P.; GONÇALVES, L. R. B. Comparison of strategies for the simultaneous saccharification and fermentation of cashew apple bagasse using a thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* to enhance cellulosic ethanol production. **Chemical Engineering Journal**, v. 307, p. 939–947, 2017.
- BARROS, E. M.; RODRIGUES, T. H. S.; PINHEIRO, A. D. T.; ANGELIM, A. L.; MELO, V. M. M.; ROCHA, M. V. P.; GONÇALVES, L. R. B. A Yeast Isolated from Cashew Apple Juice and Its Ability to Produce First- and Second-Generation Ethanol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 8, p. 2762–2776, 2014.
- BEN AKACHA, N.; GARGOURI, M. Microbial and enzymatic technologies used for the production of natural aroma compounds: Synthesis, recovery modeling, and bioprocesses. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, n. October, p. 675–706, 2015.
- BERGER, R. G.; KRINGS, U. Fermentation (Industrial): Production of Colors and Flavors. In: **Encyclopedia of Food Microbiology**. 2nd ed. Hannover: Elsevier, 2014. 1p. 785–791.
- BETIKU, E.; EMEKO, H. A.; SOLOMON, B. O. Fermentation parameter optimization of microbial oxalic acid production from cashew apple juice. **Heliyon**, v. 2, n. 2, p. 00082, fev. 2016.
- BOSSE, A. K.; FRAATZ, M. A.; ZORN, H. Formation of complex natural flavours by biotransformation of apple pomace with basidiomycetes. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 2952–2959, 2013.
- BRAGA, A.; BELO, I. Production of  $\gamma$ -decalactone by *Yarrowia lipolytica*: Insights into experimental conditions and operating mode optimization. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 90, n. 3, p. 559–565, 2015.
- BUZZINI, P.; GASPARETTI, C.; TURCHETTI, B.; CRAMAROSSA, M. R.; VAUGHAN-MARTINI, A.; MARTINI, A.; PAGNONI, U. M.; FORTI, L. Production of volatile organic compounds (VOCs) by yeasts isolated from the ascocarps of black (*Tuber melanosporum* Vitt.) and white (*Tuber magnatum* Pico) truffles. **Archives of Microbiology**, v. 184, n. 3, p. 187–193, 2005.
- CELIŃSKA, E.; KUBIAK, P.; BIAŁAS, W.; DZIADAS, M.; GRAJEK, W. *Yarrowia*

*lipolytica*: The novel and promising 2-phenylethanol producer. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 3–4, p. 389–392, 2013.

CONDE-BÁEZ, L.; CASTRO-ROSAS, J.; VILLAGÓMEZ-IBARRA, J. R.; PÁEZ-LERMA, J. B.; GÓMEZ-ALDAPA, C. Evaluation of Waste of the Cheese Industry for the Production of Aroma of Roses (Phenylethyl Alcohol). **Waste and Biomass Valorization**, v. 8, n. 4, p. 1343–1350, 2017.

COSTA, J. A.; MARQUES, J. E.; GONÇALVES, L. R. B.; ROCHA, M. V. P. Enhanced enzymatic hydrolysis and ethanol production from cashew apple bagasse pretreated with alkaline hydrogen peroxide. **Bioresource Technology**, v. 179, p. 249–259, 2015.

DARAMOLA, B. Assessment of some aspects of phytonutrients of cashew apple juice of domestic origin in Nigeria. **African Journal of Food Science**, v. 7, n. 6, p. 107–112, 2013.

DAS, I.; ARORA, A. Post-harvest processing technology for cashew apple – A review. **Journal of Food Engineering**, v. 194, p. 87–98, 2017.

DEMAIN, A. L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, n. 4, p. 455–463, 21 out. 1999.

DEMAIN, A. L. The business of biotechnology. **Industrial Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 269–283, out. 2007.

DORAN, P. M. **Bioprocess Engineering Principles**. 2nd ed. Oxford: Elsevier, 2013.

DREW, S. W.; DEMAIN, A. L. Effect of Primary Metabolites on Secondary Metabolism. **Annual Review of Microbiology**, v. 31, n. 1, p. 343–356, out. 1977.

EHRlich, F. Über die Bedingungen der Fuselolbildung und über ihren Zusammenhang mit dem Eiweissaufbau der Hefe. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 40, n. 1, p. 1027–1047, 1907.

ESHKOL, N.; SENDOVSKI, M.; BAHALUL, M.; KATZ-EZOV, T.; KASHI, Y.; FISHMAN, A. Production of 2-phenylethanol from L-phenylalanine by a stress tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 2, p. 534–542, 2009.

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

ETSCHMANN, M. M. W.; SCHRADER, J. An aqueous-organic two-phase bioprocess for efficient production of the natural aroma chemicals 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate with yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, n. 4, p. 440–443, 2006.

ETSCHMANN, M. M. W.; SELL, D.; SCHRADER, J. Screening of yeasts for the production of the aroma compound 2-phenylethanol in a molasses-based medium. **Biotechnology Letters**, v. 25, n. 7, p. 531–536, 2003.

ETSCHMANN, M. M. W.; SELL, D.; SCHRADER, J. Medium optimization for the

production of the aroma compound 2-phenylethanol using a genetic algorithm. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 29, n. 1–6, p. 187–193, 2004.

FABRE, C. E.; DUVIAU, V. J.; BLANC, P. J.; GOMA, G. Identification of volatile flavour compounds obtained in culture of *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology Letters**, v. 17, n. 11, p. 1207–1212, nov. 1995.

FLAGFELDT, D. B.; SIEWERS, V.; HUANG, L.; NIELSEN, J. Characterization of chromosomal integration sites for heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast (Chichester, England)**, v. 26, n. 10, p. 545–551, 2009.

FONSECA, G. G.; CARVALHO, N. M. B. de; GOMBERT, A. K. Growth of the yeast *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 on different sugar combinations as sole carbon and energy source. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 11, p. 5055–5067, 2013.

FONSECA, G. G.; HEINZLE, E.; WITTMANN, C.; GOMBERT, A. K. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 3, p. 339–354, 2008.

FONTES, C. P. M. L.; SANTIAGO SILVEIRA, M.; GUILHERME, A. A.; FERNANDES, F. A. N.; RODRIGUES, S. Substitution of yeast extract by ammonium sulfate for mannitol production in cashew apple juice. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 69–75, 2013.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. US Code of Federal Regulations. p. 21, 101.22a.3, 1985.

FORTI, L.; CRAMAROSSA, M. R.; FILIPPUCCI, S.; TASSELLI, G.; TURCHETTI, B.; BUZZINI, P. Nonconventional Yeast-Promoted Biotransformation for the Production of Flavor Compounds. In: GRUMEZESCU, A. M.; HOLBAN, A. M. (Ed.). **Natural and Artificial Flavoring Agents and Food Dyes**. Academic P ed. [s.l.] Elsevier, 2018. 7p. 165–187.

GAO, F.; DAUGULIS, A. J. Bioproduction of the aroma compound 2-phenylethanol in a solid-liquid two-phase partitioning bioreactor system by *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 104, n. 2, p. 332–339, 2009.

GARAVAGLIA, J. **Bioconversão De L-Fenilalanina Em 2-Feniletanol Por *Kluyveromyces Marxianus* Em Mosto de Uva**. 2006. 104 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

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

GASNIER, B. Characterization of low- and high-affinity glucose transports in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. **BBA - Biomembranes**, v. 903, n. 3, p. 425–433, 1987.

GÜNEŞER, O.; KARAGÜL-YÜCEER, Y.; WILKOWSKA, A.; KREGIEL, D. Volatile

metabolites produced from agro-industrial wastes by Na-alginate entrapped *Kluyveromyces marxianus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 7, p. 965–972, 2016.

GUPTA, C.; PRAKASH, D.; GUPTA, S. A Biotechnological Approach to Microbial Based Perfumes and Flavours. **Journal of Microbiology & Experimentation**, v. 2, n. 1, p. 1–8, 2015.

HOHMANN, S.; MAGER, W. H. The environmental stress response: a common yeast response to diverse environmental stresses. In: **Yeast Stress Responses**. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 2003. p. 11–56.

HONORATO, T. L.; RODRIGUES, S. Dextranucrase Stability in Cashew Apple Juice. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 1, p. 105–110, fev. 2010.

HUA, D.; LIN, S.; LI, Y.; CHEN, H.; ZHANG, Z.; DU, Y.; ZHANG, X.; XU, P. Enhanced 2-phenylethanol production from L-phenylalanine via *in situ* product adsorption. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 28, n. 4, p. 259–266, 2010.

HUA, D.; XU, P. Recent advances in biotechnological production of 2-phenylethanol. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 654–660, 2011.

IBGE. Levantamento Sistemático de Produção Agrícola. v. 30, n. 11, p. 1–83, 2017.

JÚNIOR, N. P.; BON, E. P. da S.; FERRARA, M. A. Tecnologia de bioprocessos. In: **Séries em Biotecnologia**. [s.l.: s.n.]p. 62.

KAPRASOB, R.; KERDCHOECHUEN, O.; LAOHAKUNJIT, N.; SARKAR, D.; SHETTY, K. Fermentation-based biotransformation of bioactive phenolics and volatile compounds from cashew apple juice by select lactic acid bacteria. **Process Biochemistry**, v. 59, p. 141–149, ago. 2017.

KIM, T. Y.; LEE, S. W.; OH, M. K. Biosynthesis of 2-phenylethanol from glucose with genetically engineered *Kluyveromyces marxianus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 61–62, p. 44–47, 2014.

LANE, M. M.; BURKE, N.; KARREMAN, R.; WOLFE, K. H.; O'BYRNE, C. P.; MORRISSEY, J. P. Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 100, n. 4, p. 507–519, 15 nov. 2011.

LU, X.; WANG, Y.; ZONG, H.; JI, H.; ZHUGE, B.; DONG, Z. Bioconversion of L-phenylalanine to 2-phenylethanol by the novel stress-tolerant yeast *Candida glycerinogenes* WL2002-5. **Bioengineered**, v. 7, n. 6, p. 418–423, 2016.

MALIK, V. S. Microbial secondary metabolism. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 5, n. 3, p. 68–72, mar. 1980.

MARTÍNEZ-AVILA, O.; SÁNCHEZ, A.; FONT, X.; BARRENA, R. Bioprocesses for 2-phenylethanol and 2-phenylethyl acetate production: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 23, p. 9991–10004, 2018.

MARTÍNEZ, O.; SÁNCHEZ, A.; FONT, X.; BARRENA, R. Valorization of sugarcane bagasse and sugar beet molasses using *Kluyveromyces marxianus* for producing value-added aroma compounds via solid-state fermentation. **Journal of Cleaner Production**, v. 158, p. 8–17, 2017.

MEI, J.; MIN, H.; LÜ, Z. Enhanced biotransformation of l-phenylalanine to 2-phenylethanol using an *in situ* product adsorption technique. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 8, p. 886–890, ago. 2009.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Membranas Biológicas e Transporte. In: **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. New York: Artmed, 2014. p. 387–432.

OLIVEIRA, A. H.; OGRODOWSKI, C. C.; MACEDO, A. C. de; SANTANA, M. H. A.; GONÇALVES, L. R. B. Cashew apple juice as microbial cultivation medium for non-immunogenic hyaluronic acid production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1097–1104, dez. 2013a.

OLIVEIRA, S. M. M. DE. **Avaliação da Produção Biotecnológica de 2-feniletanol em resíduo líquido de fecularia**. 2010. 68 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Curso de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2010.

OLIVEIRA, S. M. M.; DAMASCENO GOMES, S.; SENE, L.; MACHADO COELHO, S. R.; BARANA, A. C.; CEREDA, M. P.; CHRIST, D.; PIECHONTCOSKI, J. Production of 2-phenylethanol by *Geotrichum fragrans*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* in cassava wastewater. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, v. 11, n. 2, p. 158–163, 2013b.

OLIVEIRA, S. M. M.; GOMES, S. D.; SENE, L.; CHRIST, D.; PIECHONTCOSKI, J. Production of Natural Aroma By Yeast in Wastewater of Cassava Starch Industry. **Journal of the Brazilian Association of Agricultural Engineering**, v. 4430, p. 1–12, 2015.

PALITOT, D. R. T. **Estudo da Produção de 2-Feniletanol por *Kluyveromyces marxianus* CCA 510 Utilizando o suco de caju como substrato**. 2017. 92 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

PEREZ, A. A. **Enhanced Microbial Production of Natural Flavors via In-situ Product Adsorption**. 2001. Swiss Federal Institute of Technology Zurich, Zurich, Suíça, 2001.

PINHEIRO, Á. D. T.; ROCHA, M. V. P.; MACEDO, G. R.; GONÇALVES, L. R. B. Evaluation of cashew apple juice for the production of fuel ethanol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 148, n. 1–3, p. 227–234, 2008.

ROCHA, M. V. P. **Produção de biossurfactantes por fermentação submersa usando substrato não convencional**. 2007. 142 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007

ROCHA, M. V. P.; OLIVEIRA, A. H. S.; SOUZA, M. C. M.; GONÇALVES, L. R. B. Natural cashew apple juice as fermentation medium for biosurfactant production by *Acinetobacter calcoaceticus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 12, p. 1295–

1299, 2006.

ROCHA, M. V. P.; RODRIGUES, T. H. S.; DE ALBUQUERQUE, T. L.; GONÇALVES, L. R. B.; DE MACEDO, G. R. Evaluation of dilute acid pretreatment on cashew apple bagasse for ethanol and xylitol production. **Chemical Engineering Journal**, v. 243, p. 234–243, 2014.

ROCHA, M. V. P.; RODRIGUES, T. H. S.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B.; MACEDO, G. R. de. Cashew apple bagasse as a source of sugars for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* CE025. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 1099–1107, 30 ago. 2011.

ROCHA, M. V. P.; SOUZA, M. C. M.; BENEDICTO, S. C. L.; BEZERRA, M. S.; MACEDO, G. R.; PINTO, G. A. S.; GONÇALVES, L. R. B. Production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* grown on cashew apple juice. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137–140, n. 1–12, p. 185–194, 2007.

SÁ, A. G. A.; MENESES, A. C.; ARAÚJO, P. H. H.; OLIVEIRA, D. de. A review on enzymatic synthesis of aromatic esters used as flavor ingredients for food, cosmetics and pharmaceuticals industries. **Trends in Food Science and Technology**, v. 69, p. 95–105, 2017.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. de A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia industrial - Vol.2**. [s.l.] Edgar Blucher, 2001.

SCHRADER, J.; ETSCHMANN, M. M.; SELL, D.; HILMER, J. M.; RABENHORST, J. Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavour compounds--current industrial processes and future prospects. **Biotechnol Lett**, v. 26, n. 6, p. 463–472, 2004.

SEOW, Y. X.; ONG, P. K. C.; LIU, S. Q. Production of flavour-active methionol from methionine metabolism by yeasts in coconut cream. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, n. 3, p. 235–240, 2010.

SERRA, S.; FUGANTI, C.; BRENNNA, E. Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 4, p. 193–198, 2005.

SERRANO-CARREÓN, L. Improving Biogenesis of Aroma Compounds by *In Situ* Product Removal. In: GUTIÉRREZ-LÓPEZ, G. F.; GUSTAVO V. BARBOSA-CÁNOVAS (Ed.). **Trends in Food Science & Technology**. London: CRC Press LLC, 2003. 14p. 229–239.

SILVEIRA, M. S.; FONTES, C. P. M. L.; GUILHERME, A. A.; FERNANDES, F. A. N.; RODRIGUES, S. Cashew Apple Juice as Substrate for Lactic Acid Production. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 3, p. 947–953, 29 abr. 2012.

SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTA, P. K. Microbial metabolites in nutrition, healthcare and agriculture. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, p. 15, 8 maio 2017.

TIAN, X.; YE, R.; WANG, J.; CHEN, Y.; CAI, B.; GUAN, S.; RONG, S.; LI, Q. Effects of aroma quality on the biotransformation of natural 2-phenylethanol produced using ascorbic acid. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 286–290, 2015.

TYLEWICZ, U.; INCHINGOLO, R.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M. T. Food aroma compounds. In: **Nutraceutical and Functional Food Components: Effects of Innovative Processing Techniques**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 297–334.

VAN HECKE, W.; DE WEVER, H. High-flux POMS organophilic pervaporation for ABE recovery applied in fed-batch and continuous set-ups. **Journal of Membrane Science**, v. 540, n. May, p. 321–332, 2017.

VIDAL, M. F. Situação da Cajucultura nordestina após a seca. **Caderno Setorial ETENE**, v. 1, n. 4, p. 17–25, 2016.

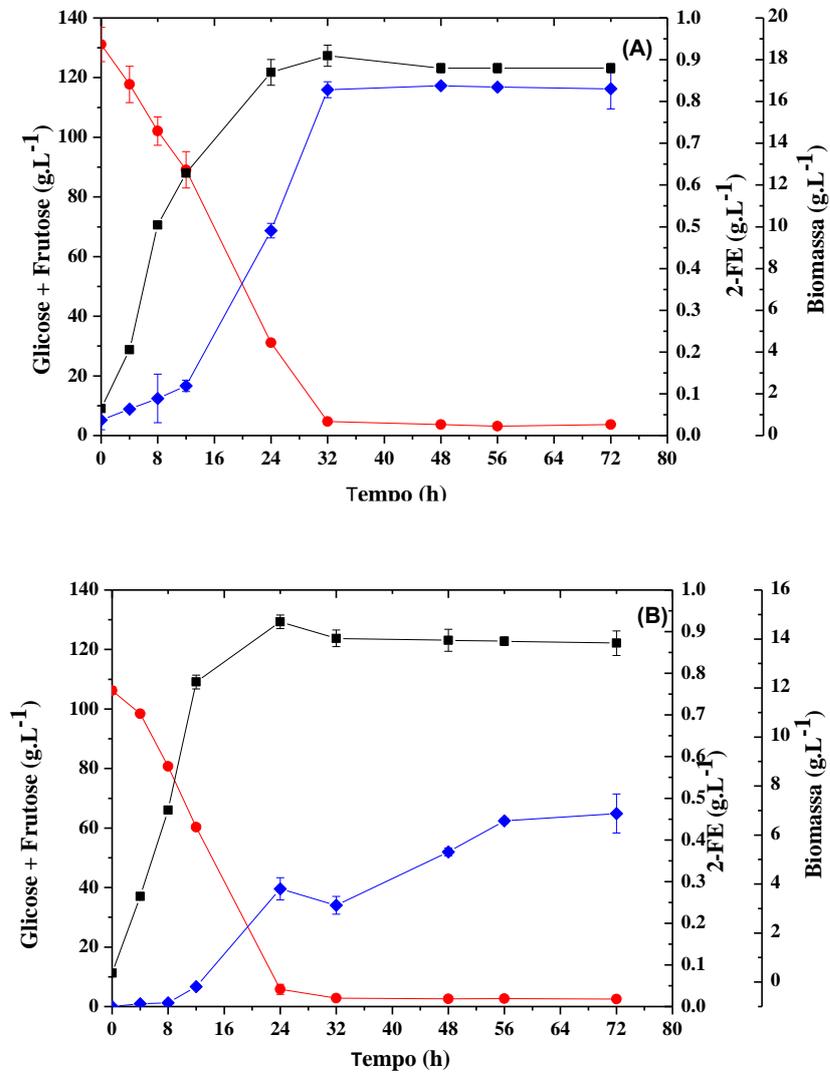
WANG, H.; DONG, Q.; GUAN, A.; MENG, C.; SHI, X.; GUO, Y. Synergistic inhibition effect of 2-phenylethanol and ethanol on bioproduction of natural 2-phenylethanol by *Saccharomyces cerevisiae* and process enhancement. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 112, n. 1, p. 26–31, 2011.

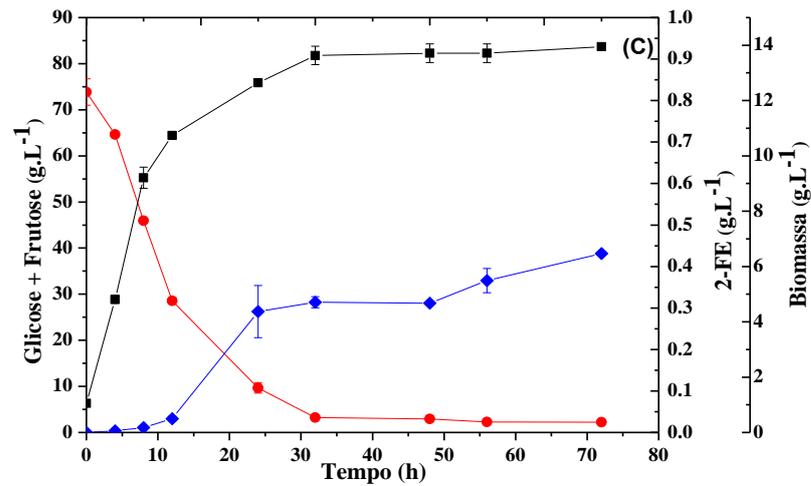
WITTMANN, C.; HANS, M.; BLUEMKE, W. Metabolic physiology of aroma-producing *Kluyveromyces marxianus*. p. 1351–1363, 2002.

XU, P.; HUA, D.; MA, C. Microbial transformation of propenylbenzenes for natural flavour production. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 12, p. 571–576, 2007.

## ANEXO A – PERFIS COMPLETO DOS CULTIVOS REALIZADOS.

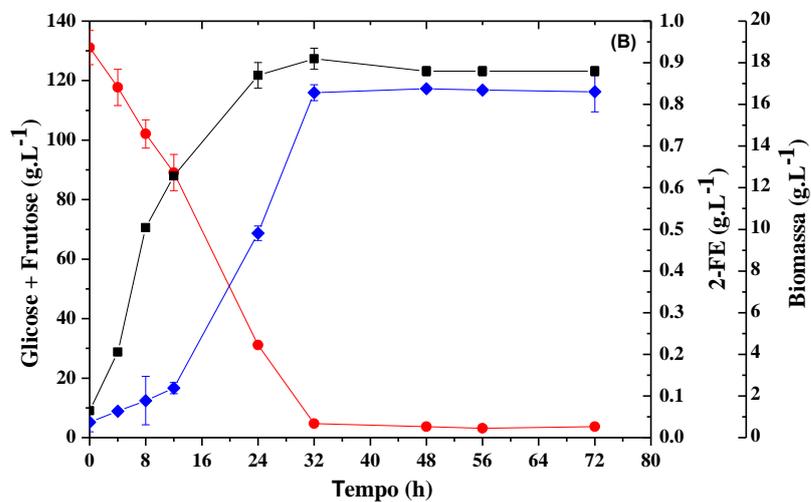
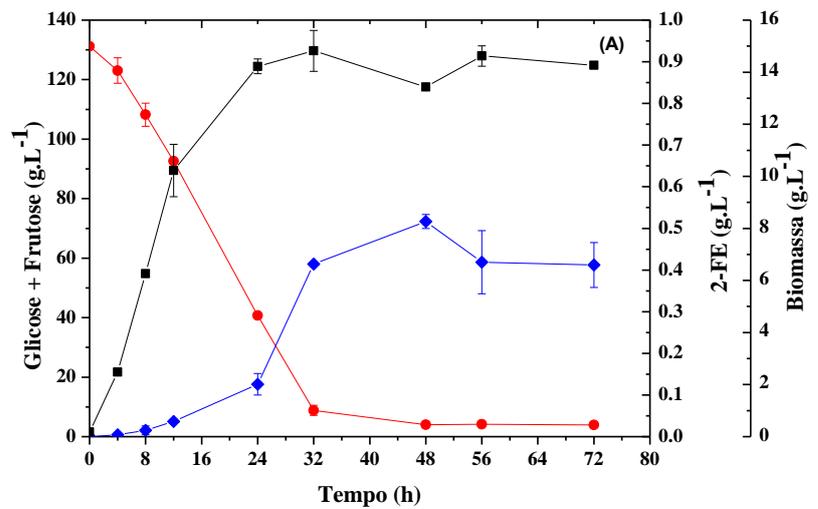
Figura 20 - Perfis dos cultivos em diferentes concentrações de açúcares (glicose e frutose). 131 g, L<sup>-1</sup> (A); 106 g.L<sup>-1</sup> (B) e 74 g.L<sup>-1</sup> (C). Biomassa (■), glicose (●) e 2-FE (◆).

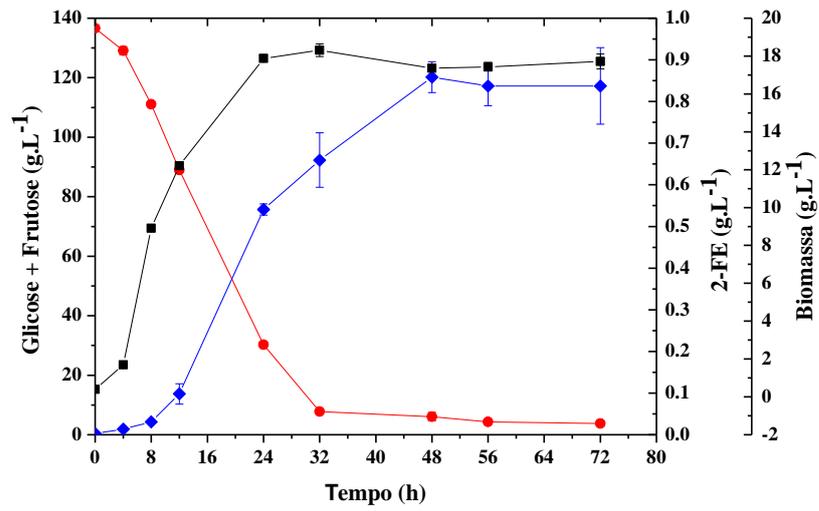
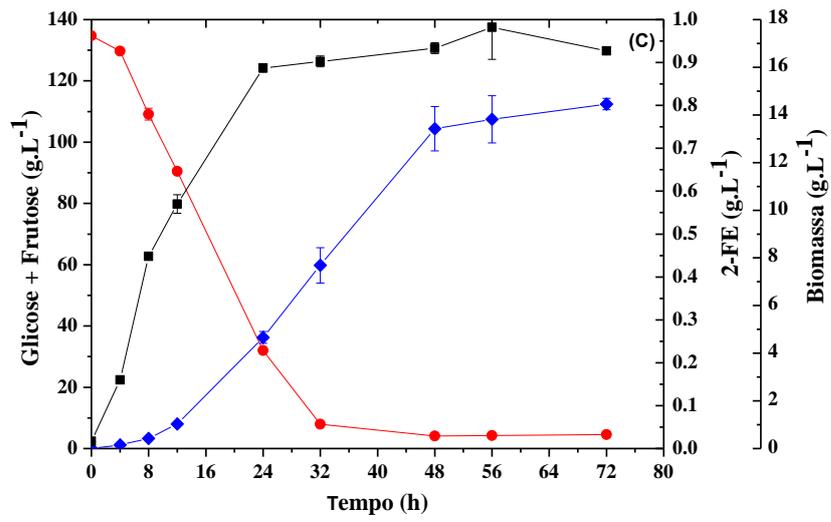




Fonte: Elaborada pelo autor.

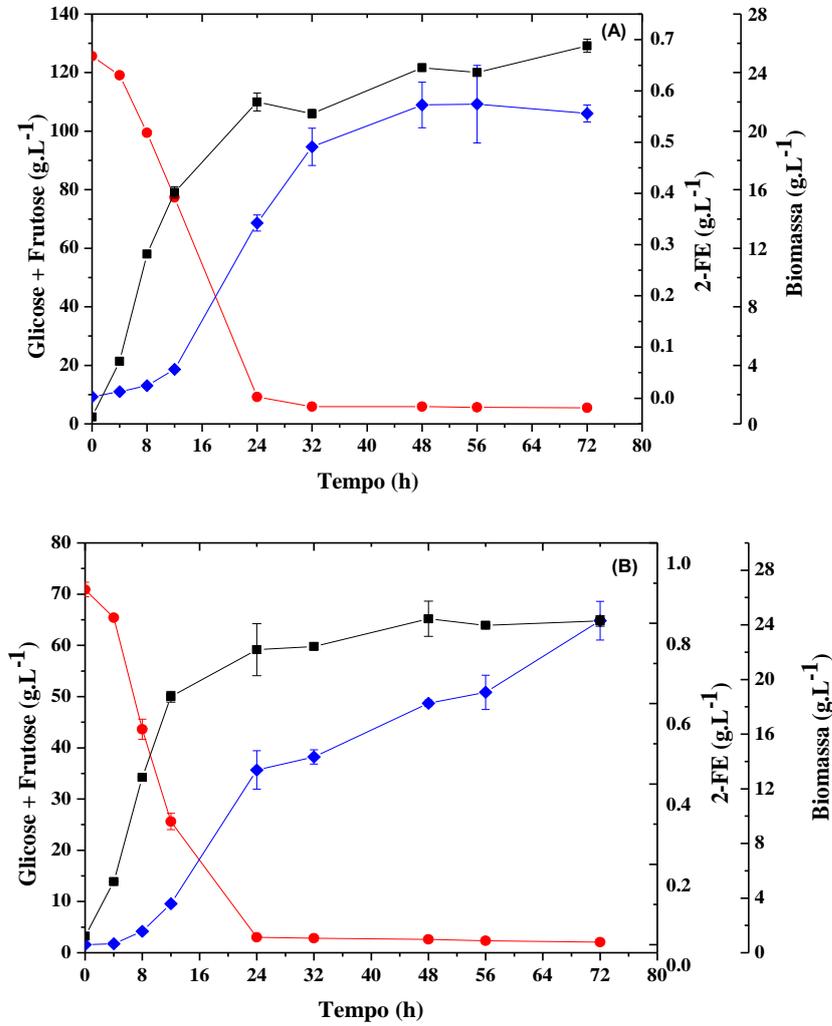
Figura 21 - Perfis dos cultivos realizados para as variações de L-Phe.1,0 g, L<sup>-1</sup> (A); 3,0 g.L<sup>-1</sup> (B); 4,0 g.L<sup>-1</sup> (C) e 10,0 g.L<sup>-1</sup>. Biomassa (■), glicose (●) e 2-FE (◆).





Fonte: Elaborada pelo autor.

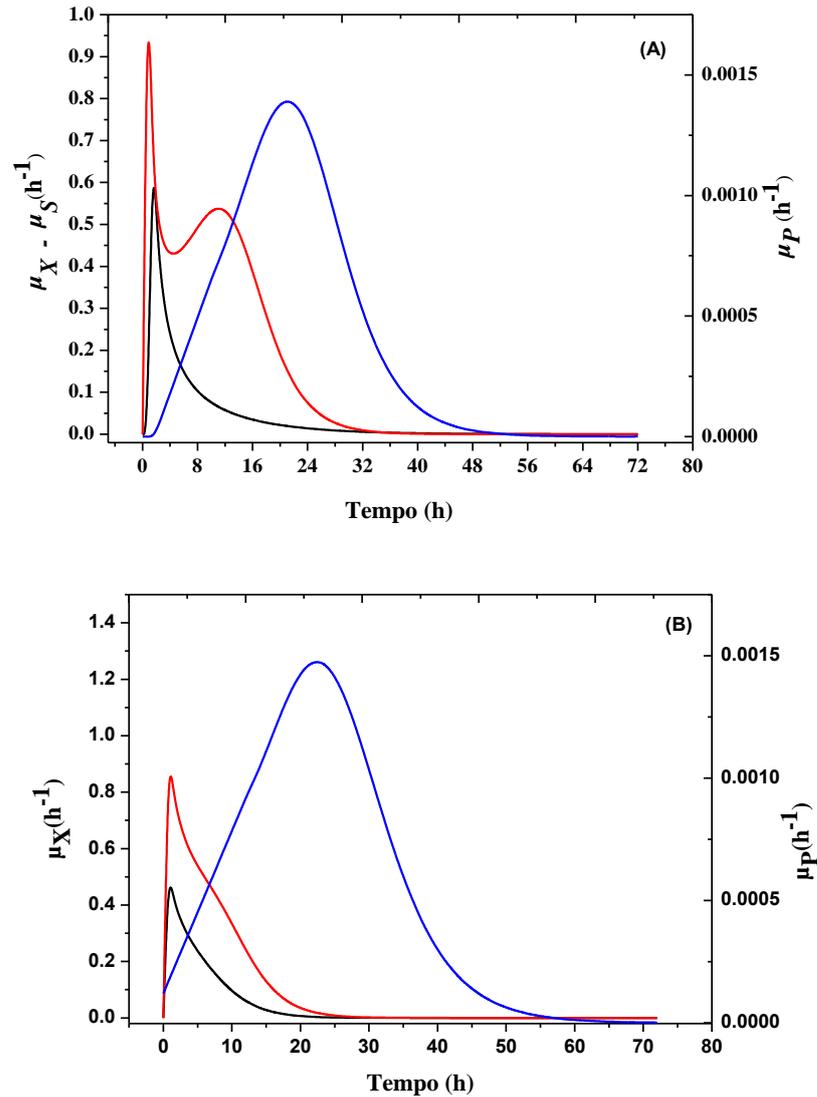
Figura 22 - Perfis dos cultivos realizados sob aeração de  $4,0 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$  e  $8,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de L-Phe (A); cultivo realizado sob aeração de  $5,0 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$  e  $10,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de L-Phe (B). Biomassa (■), glicose (●) e 2-FE (◆).



Fonte: Elaborada pelo autor.

## ANEXO B – PERFIS DAS CINÉTICAS DOS CULTIVOS REALIZADOS PARA AS VARIAÇÕES DE O<sub>2</sub> E L-PHE

Figura 23 - Perfis cinético dos cultivos realizado sob aeração de 4,0 L.min<sup>-1</sup> e 8,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe (A) e cultivo realizado sob aeração de 5,0 L.min<sup>-1</sup> e 10,0 g.L<sup>-1</sup> de L-Phe (B). Velocidades específicas de crescimento  $\mu_X$  (■), consumo de substrato  $\mu_S$  (■) e produção de 2-FE  $\mu_P$  (■).



Fonte: Elaborada pelo autor.