

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Maria Josiane Macedo

DESENVOLVIMENTO DE ROTAS BIOTECNOLÓGICAS PARA A OBTENÇÃO DE COMPOSTOS DE AROMA

Diamantina

2020

Maria Josiane Macedo

DESENVOLVIMENTO DE ROTAS BIOTECNOLÓGICAS PARA A OBTENÇÃO DE COMPOSTOS DE AROMA

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Molina

Diamantina

2020

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M838d

Macedo, Maria Josiane

Desenvolvimento de rotas biotecnológicas para a obtenção de compostos de aroma / Maria Josiane Macedo, 2020.

84 p.

Orientador: Gustavo Molina

Dissertação (Mestrado- Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2020.

1. Síntese "de novo". 2. Biotransformação. 3. *Geotrichum* sp. 4. Ésteres. 5. Aromas. I. Molina, Gustavo. II. Título. III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

CDD 660.6

Ficha Catalográfica – Sistema de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecária: Viviane Pedrosa – CRB6/2641

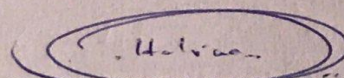
MARIA JOSIANE MACEDO

**DESENVOLVIMENTO DE ROTAS BIOTECNOLÓGICAS PARA A
OBTENÇÃO DE COMPOSTOS DE AROMA**

Dissertação apresentada ao
MESTRADO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, nível
de MESTRADO como parte dos
requisitos para obtenção do título de
MESTRA EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Orientador (a): Prof. Dr. Gustavo
Molina

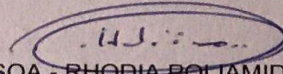
Data da aprovação : 31/01/2020



Prof.Dr. GUSTAVO MOLINA - UFVJM



Prof.Dr. EZEQUIAS PESSOA DE SIQUEIRA - INSTITUTO RENÉ RACHOU (IRR-FIOCRUZ)



Dr.^a MARINA GABRIEL PESSOA - RHODIA-POLIAMIDA E ESPECIALIDADES SA

DIAMANTINA

À Deus, minha Família e Amigos, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus que iluminou o meu caminho durante esta caminhada e me deu forças para continuar.

Ao meu orientador Gustavo Molina pela oportunidade e confiança e sobretudo pelas palavras motivacionais, que me instigaram a continuar nessa jornada, superando qualquer expectativa.

Aos docentes e colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) pelos ensinamentos compartilhados e pela amizade.

À FAPEMIG e CNPq pelos fomentos que propiciaram a execução desse trabalho.

À UFVJM pela oportunidade de cursar esse programa de mestrado.

Aos técnicos e funcionários do ICT/EAL, Keyla, Mara, Nath, por além de executarem seu trabalho com maestria, por estarem sempre dispostos a ajudar, e também pelo apoio moral de sempre nos momentos de dificuldade.

À minha família de sangue, sobretudo à minha mãe, minha maior inspiração, que sempre me apoiou e incentivou, aos meus irmãos (Li, Naldin, Tita e Wanderson), sobrinha (Anna Luísa) e prima (Dallyla) pelo amor incondicional, e por serem meu porto seguro.

A minha família de coração Kel, Bibi, Renata, Filipe, Carlene e Misa pela amizade, amor, apoio incondicional e por aturarem meus surtos, sem vocês eu não teria conseguido chegar tão longe. Amo vocês.

Aos amigos que Diamantina me deu Kel, Bibi, Renata, Filipe, Carlos (meu eterno ranço), Day, Nath, Fabi, Lívia, Thamires, Thais, Camila, Samili e Lauriany que me ajudaram de todas as formas possíveis, desde auxílio na pesquisa, motivação, segurar o choro ou chorar junto, ouvir meus palavrões e meus desabafos, ir pros roles pra não surtar, ou mesmo me alimentar pra me acalmar. Obrigada por todos os cafés. Amo vocês mil milhões.

Aos meus queridos amigos Elis, Samira, Greicy, Karina, Aris, Charles, Eriko que mesmo distantes não deixaram de me apoiar e me escutar, amo vocês.

Aos meus amigos de role, que me ajudaram a preservar boa parte da minha sanidade mental, não podemos dizer o mesmo do fígado, mas tudo e questão de equilíbrio.

Aos Professores Ezequias, Carlos, Betânia e demais funcionários da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz): Instituto René Rachou-BH, pela parceria incrível que proporcionou a continuidade deste trabalho, vocês foram fundamentais.

Aos Professores Rodrigo Verly, Eduardo e ao Aventino, pelas parcerias e doações de itens de consumo indispensáveis ao meu projeto.

A todas as pessoas que durante essa caminhada me ensinaram o significado de “*RESILIÊNCIA*”.

Meus mais sinceros agradecimentos à todos os que me ajudaram de todas as formas a alcançar essa conquista.

“O tempo é o melhor autor; sempre encontra um final perfeito.”

Charles Chaplin.

RESUMO

O mercado global de aromas e fragrâncias tem-se mostrado promissor devido à crescente demanda por ingredientes naturais em produtos alimentícios, já que os consumidores estão cada vez mais preocupados com a saúde a longo prazo, devido aos efeitos do uso de ingredientes e aditivos artificiais (em produtos alimentícios). No entanto, o alto custo envolvido na produção de aromas naturais é o principal fator restritivo do mercado, sendo este dominado ainda pelo segmento de aromas artificiais, devido ao seu baixo custo. Além disso, os aromas naturais são menos estáveis, diminuindo assim o prazo de validade dos produtos. Sendo assim espera-se que o mercado global de aromas atinja US \$ 17,1 bilhões até 2023, com um CAGR de 4,8% de 2018 a 2023. Os aromas podem ser formados por compostos químicos de vários grupos funcionais, como álcoois, ácidos, aldeídos, ésteres, cetonas e lactonas, entre outros. São conhecidos aproximadamente 6.500 voláteis naturais, mas apenas 300-400 são amplamente utilizados na indústria de alimentos, especialmente em bebidas, produtos lácteos e molhos. A obtenção desses compostos pode ocorrer por extração da natureza, síntese química ou produção biotecnológica. A extração da natureza possui limitações como sazonalidade e baixo rendimento, enquanto que a síntese química possui condições de processo complexas (altas pressões e temperaturas), produção de misturas racêmicas de produtos e altos impactos ambientais devido a geração de resíduos não biodegradáveis. A síntese de compostos de aroma por processos biotecnológicos pode ocorrer através de dois processos distintos, a síntese “*de novo*” e biotransformação. Na síntese “*de novo*” ocorre a formação desses compostos a partir de substratos simples, como a glicose, utilizando todo o arsenal metabólico do microrganismo e em geral produz uma mistura de vários compostos de aroma. Dentre os principais compostos produzidos pela síntese “*de novo*” destacam-se os ésteres, que estão entre os compostos de aroma mais frequentemente encontrados na natureza. Estes compostos estão associados ao odor agradável de flores e frutos. Os ésteres, também, são compostos de ampla aplicação no setor industrial com destaque na indústria de alimentos, na indústria farmacêutica e cosmética, e na produção de combustíveis e polímeros. Os ésteres podem ser produzidos por partes vegetais, sintetizados através das reações entre um ânion carboxilato e um haleto de alquila, pela reação de esterificação de Fischer ou por microrganismos como leveduras e fungos. Enquanto isso, o processo de biotransformação permite a acumulação significativamente aumentada do produto desejado, sendo que o precursor deve estar presente na natureza e ser facilmente isolado em quantidade suficiente da fonte natural de uma forma economicamente viável. Um dos compostos de aroma mais relevantes obtidos através da biotransformação é o 2-Feniletanol (2-PE), um álcool aromático com uma fragrância de rosa amplamente aplicado em diversos tipos de produtos, como perfumes, cosméticos, produtos farmacêuticos, alimentos e bebidas. A rota biotecnológica usada através da via de Ehrlich para obter 2-PE por bioconversão de L-fenilalanina (L-PHE), como única fonte de nitrogênio, é uma das maneiras mais simples de produção do álcool. Nesse contexto, a produção de aromas por via biotecnológica (bioaromas) mostra-se como uma alternativa promissora para atender a vívida demanda dos consumidores por uma alimentação saudável, estimulado pelo consumo de produtos naturais e funcionais. Por outro lado, a conscientização da sociedade acerca da importância do desenvolvimento sustentável tem motivado a adaptação dos processos industriais por novas tecnologias que façam uso de microrganismos (bioprocessos), possibilitando assim, a obtenção de produtos que sejam ambientalmente “amigáveis”. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver bioprocessos para produção de compostos de aroma por síntese “*de novo*”, bem como a extração e identificação dos compostos produzidos, e bioconversão de L-PHE em 2-PE utilizando linhagens de *Geotrichum sp.*

Palavras chave: síntese “*de novo*”, biotransformação, *Geotrichum sp.*, ésteres, aromas.

ABSTRACT

The global market for flavorings and fragrances has been promising due to the growing demand for natural ingredients in food products, as consumers are increasingly concerned about long-term health, due to the effects of using artificial ingredients and additives (in food products). However, the high cost involved in the production of natural flavorings is the main restrictive factor in the market, which is still dominated by the artificial flavor segment, due to its low cost. In addition, natural aromas are less stable, thus reducing the shelf life of products. Therefore, the global flavor market is expected to reach US \$ 17.1 billion by 2023, with a CAGR of 4.8% from 2018 to 2023. Flavors can be formed by chemical compounds from various functional groups, such as alcohols, acids, aldehydes, esters, ketones and lactones, among others. Approximately 6,500 natural volatiles are known, but only 300-400 are widely used in the food industry, especially in beverages, dairy products and sauces. These compounds can be obtained through nature extraction, chemical synthesis or biotechnological production. The extraction of nature has limitations such as seasonality and low yield, while chemical synthesis has complex process conditions (high pressures and temperatures), production of racemic mixtures of products and high environmental impacts due to the generation of non-biodegradable waste. The synthesis of aroma compounds by biotechnological processes can occur through two different processes, the “de novo” synthesis and biotransformation. In “de novo” synthesis, the formation of these compounds occurs from simple substrates, such as glucose, using the entire metabolic arsenal of the microorganism and in general produces a mixture of various aroma compounds. Among the main compounds produced by the “de novo” synthesis, esters stand out, which are among the aroma compounds most often found in nature. These compounds are associated with the pleasant odor of flowers and fruits. Esters, too, are widely used in the industrial sector, especially in the food industry, in the pharmaceutical and cosmetic industry, and in the production of fuels and polymers. Esters can be produced by plant parts, synthesized through the reactions between a carboxylate anion and an alkyl halide, by the Fischer esterification reaction or by microorganisms such as yeasts and fungi. Meanwhile, the biotransformation process allows for significantly increased accumulation of the desired product, the precursor being present in nature and easily isolated in sufficient quantity from the natural source in an economically viable way. One of the most relevant aroma compounds obtained through biotransformation is 2-Phenylethanol (2-PE), an aromatic alcohol with a rose fragrance widely applied in several types of products, such as perfumes, cosmetics, pharmaceuticals, food and drinks. The biotechnological route used through the Ehrlich pathway to obtain 2-PE by bioconversion of L-phenylalanine (L-PHE), as the sole source of nitrogen, is one of the simplest ways of producing alcohol. In this context, the production of aromas by biotechnological means (bioaromas) is a promising alternative to meet the vivid consumer demand for healthy eating, stimulated by the consumption of natural and functional products. On the other hand, society's awareness of the importance of sustainable development has motivated the adaptation of industrial processes by new technologies that make use of microorganisms (bioprocesses), thus making it possible to obtain products that are environmentally "friendly". In this way, the objective of the present work was to develop bioprocesses for the production of aroma compounds by “de novo” synthesis, as well as the extraction and identification of the produced compounds, and bi-conversion of L-PHE into 2-PE using *Geotrichum sp.*

Key words: “de novo” synthesis, biotransformation, *Geotrichum sp.*, esters, aromas.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	17
REFERÊNCIAS.....	18
CAPÍTULO 1 REFERENCIAL TEÓRICO: ADVANCES IN THE BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF 2-PHENYLETHANOL.....	19
RESUMO.....	19
1.1 Introdução.....	19
1.2 Suitable conditions for the production biotechnological of 2-phenylethanol.....	23
1.2.1 <i>Process conditions in benchtop bioreactor</i>	26
1.2.2 <i>Biotechnological production of 2-phenylethanol using genetically modified microorganisms</i>	26
1.2.3 <i>Biotechnological production of 2-phenylethanol using agricultural residues</i>	28
1.3 <i>Purification steps for 2-phenylethanol recovery</i>	28
1.4 <i>Concluding remarks</i>	33
1.5 REFERÊNCIAS.....	34
CAPÍTULO 2 - OBTENÇÃO DE COMPOSTOS DE AROMA POR “SÍNTESE DE NOVO” UTILIZANDO LINHAGENS DE <i>GEOTRICHUM sp.</i>	39
RESUMO.....	39
2.1 Introdução.....	39
2.2 Material e métodos.....	40
2.2.1 <i>Microrganismos</i>	40
2.2.2 <i>Caracterização morfológica</i>	40
2.2.3 <i>Manutenção das linhagens</i>	41
2.2.4 <i>Cinética de crescimento padrão das linhagens Geotrichum sp.</i>	41
2.2.5 <i>Testes de fonte de carbono como substrato para a fermentação</i>	41
2.2.6 <i>Extração dos compostos voláteis formados</i>	42
2.2.7 <i>Identificação dos compostos formados no sistema fermentativo</i>	42
2.2.8 <i>Análise estatística</i>	43
2.3 Resultados e discussão.....	43
2.3.1 <i>Caracterização morfológica dos microrganismos</i>	43
2.3.2 <i>Testes de fonte de carbono como substrato para a fermentação</i>	44
2.3.3 <i>Identificação dos compostos de aroma formados no sistema fermentativo</i>	47
2.4 Conclusão.....	52

2.5 Referências.....	53
CAPÍTULO 3- PRODUÇÃO DE 2-FENILETANOL A PARTIR DA BIOCONVERSÃO DE L-FENILALANINA PELA LINHAGEM <i>GEOTRICHUM sp.</i>.....	56
RESUMO.....	56
3.1 Introdução.....	56
3.2 Material e métodos.....	57
3.2.1 <i>Microrganismos</i>	57
3.2.2 <i>Manutenção das linhagens</i>	58
3.2.3 <i>Reagentes e substratos</i>	58
3.2.4 <i>Testes de fonte de carbono e Influência da L-PHE na produção de 2-PE</i>	58
3.2.5 <i>Identificação e quantificação da L-PHE e do 2-PE</i>	58
3.2.6 <i>Planejamento experimental para otimização do bioprocessos</i>	59
3.3 Resultados e discussão.....	60
3.3.1 <i>Testes de fonte de carbono e influência da L-PHE na produção de 2-PE</i>	60
3.3.2 <i>Consumo de L-PHE e produção de 2-PE</i>	63
3.3.3 <i>Planejamento Experimental para otimização do bioprocessos</i>	65
3.3.3.1 <i>Planejamento experimental para otimização das condições de meio</i>	66
3.3.3.2 <i>Planejamento experimental para otimização das condições de processo</i>	68
3.4 Conclusão.....	71
3.5 Referências.....	73
ANEXO A- CROMATOGRAMAS	77

INTRODUÇÃO GERAL

Segundo uma pesquisa feita pela Markets and Markets em 2019, o mercado global de aromas e fragrâncias tem-se mostrado promissor devido à crescente demanda por ingredientes naturais em produtos alimentícios, já que os consumidores estão cada vez mais preocupados com a saúde a longo prazo, devido aos efeitos do uso de ingredientes e aditivos artificiais em produtos alimentícios. No entanto, o alto custo envolvido na produção de aromas naturais é o principal fator restritivo do mercado, sendo este dominado ainda pelo segmento de aromas artificiais, devido seu baixo custo. Além disso, os aromas naturais são menos estáveis, diminuindo assim o prazo de validade dos produtos. Sendo assim espera-se que o mercado global de aromas atinja US \$ 17,1 bilhões até 2023, com um CAGR de 4,8% de 2018 a 2023.

Os compostos de aromas podem ser formados por compostos químicos de vários grupos funcionais, como álcoois, ácidos, aldeídos, ésteres, cetonas e lactonas, entre outros (UENOJO et al., 2007). São conhecidos aproximadamente 6.500 voláteis naturais, mas apenas 300-400 são amplamente utilizados na indústria de alimentos, especialmente em bebidas, produtos lácteos e molhos (HOSOGLU; GUNESER; YUCEER, 2018).

A obtenção dos compostos de aroma pode ocorrer por extração da natureza, síntese química, ou produção biotecnológica (MOLINA, 2014; PIMENTEL et al., 2011). Dentre estes métodos, a extração natural possui limitações como a dependência da sazonalidade e o baixo rendimento destes compostos, enquanto a síntese química possui condições de processo complexas (altas pressões e temperaturas) e reduzida regiosseletividade da reação, obtendo uma mistura racêmica de produto que altera drasticamente a percepção sensorial do aroma desejado (FELIPE; OLIVEIRA; BICAS, 2017; 2006; VESPERMANN et al., 2017), mas devido rendimento satisfatório da rota química e principalmente em decorrência da discrepância entre o custo de um aroma natural e um aroma sintético, como por exemplo, a vanilina obtida de fava de baunilha (US\$ 4.000 kg) e vanilina sintética (US\$ 12 kg) os aromas sintéticos são majoritariamente utilizados nos setores industriais (DAUGSCH, 2005; HOSOGLU; GUNESER; YUCEER, 2018; KRINGS & BERGER, 1998; PIMENTEL et al., 2011).

Alternativamente, a obtenção de compostos de aroma com denominação natural pode ocorrer através de processos biotecnológicos, os quais se dividem em dois processos distintos, a síntese “de novo”, e os processos de bioconversão. No primeiro caso, pela síntese “de novo”, a formação desses compostos ocorre a partir de substratos simples, como a glicose, utilizando todo o arsenal metabólico do microrganismo e, em geral, produz uma mistura de vários compostos de aroma. Enquanto isso, no processo de bioconversão e/ou biotransformação, o microrganismo é induzido a seguir uma via metabólica através da adição de precursores específicos para cada tipo de produto, como a fenilalanina (*L*-PHE) utilizada para a produção de 2-feniletanol (2-PE) (BICAS et al., 2011; ETSCHMANN et al., 2002; MARÓSTICA, 2006; VESPERMANN et al., 2017), ou como o ácido ferúlico utilizado para a produção de vanilina, por exemplo (SCHEMPP et al., 2017).

Nesse contexto, a produção de aromas por via biotecnológica (bioaromas) mostra-se como uma alternativa promissora para atender a vívida demanda dos consumidores por uma alimentação saudável, estimulado pelo consumo de produtos naturais e funcionais. Por outro lado, a conscientização da sociedade acerca da importância do desenvolvimento sustentável tem motivado a adaptação dos processos industriais por novas tecnologias que façam uso de microrganismos (bioprocessos), possibilitando assim, a obtenção de produtos que sejam ambientalmente “amigáveis” (FELIPE; OLIVEIRA; BICAS, 2017). Desta forma, o principal objetivo deste trabalho foi desenvolver bioprocessos para a produção de compostos de aroma por síntese “*de novo*” e pela bioconversão de *L*-Fenilalanina (*L*-PHE) em 2-Feniletanol (2-PE) utilizando linhagens de *Geotrichum sp.*

REFERÊNCIAS

- BICAS, J. L. et al. Evaluation of the antioxidant and antiproliferative potential of bioflavors. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 7, 2011.
- DAUGSCH, ANDREAS; PASTORE, G. OBTENÇÃO DE VANILINA: OPORTUNIDADE BIOTECNOLÓGICA Quim. **Quimica Nova**, v. 28, n. 4, p. 642–645, 2005.
- ETSCHMANN, M. M. W. et al. Biotechnological production of 2-phenylethanol. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 59, n. 1, p. 1–8, 1 jun. 2002.
- FELIPE, L. DE O.; OLIVEIRA, A. M. DE; BICAS, J. L. Bioaromas – Perspectives for sustainable development. **Trends in Food Science and Technology**, v. 62, p. 141–153, 2017.
- Global Market for Flavor and Fragrance. Disponível em <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/food-flavors-market-93115891.html> Acesso em: 27 Dez. 2019.
- HOSOGLU, M. I.; GUNESER, O.; YUCEER, Y. K. **on Production of Bioflavor Compounds**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018.
- KRINGS, U.; BERGER, R. G. Biotechnological production of flavours and fragrances. p. 1–8, 1998.
- MARÓSTICA, G. M. P. M. R. Biotransformação de terpenos para a produção de compostos de aroma e funcionais. **Biblioteca Unicamp, F E A**, 2006.
- MOLINA, G. **Biotechnological production of aroma compounds by the biotransformation of terpenes**. [s.l.] UNICAMP, 2014.
- PIMENTEL, M. R. et al. The Use of Endophytes to Obtain Bioactive Compounds and Their Application in Biotransformation Process. **Biotechnology Research International**, v. 2011, p. 1–11, 2011.
- SCHEMPP, F. M. et al. **Microbial Cell Factories for the Production of Terpenoid Flavor and Fragrance Compounds**. 2017.
- UENOJO, M. et al. CAROTENÓIDES: PROPRIEDADES, APLICAÇÕES E BIOTRANSFORMAÇÃO PARA FORMAÇÃO DE COMPOSTOS DE AROMA. v. 30, n. 3, p. 616–622, 2007.
- VESPERMANN, K. A. C. et al. Biotransformation of α - and β -pinene into flavor compounds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 5, p. 1805–1817, 20 mar. 2017.

CAPÍTULO 1. REFERENCIAL TEÓRICO: ADVANCES IN THE BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF 2-PHENYLETHANOL

ABSTRACT

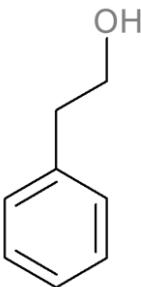
2-Phenylethanol (2-PE) is an aromatic, colorless and volatile alcohol. The main characteristic of this compound is the rose-like aroma, being widely applied in the food, pharmaceutical and cosmetic industry. Natural 2-PE can be extracted from the essential oils of flowers such as hyacinths, jasmine, lilies and daffodils, it also can be obtained by chemical synthesis, using mainly the *Friedel-Craft* reaction, which uses ethylene oxide with benzene. Finally, this alcohol can also be produced by biotechnological pathways, through the bioconversion of *L*-phenylalanine (L-PHE). The biotechnology route has been a promising strategy to produce food additives, since the products can be labeled as "natural" by the US Food and Drug Administration, being highly desirable and commercially more viable compared to other methods. In this way, this review will address the advances in the biotechnological production of 2-PE, with emphasis on the strategies used to increase the production of this important commercial compound.

Keywords: natural aroma, bioconversion, biotransformation, L-Phenylalanine, genetic engineering, agricultural residues.

1.1 Introduction

2-Phenylethanol (2-PE) is an aromatic, colorless and volatile alcohol with a characteristic rose aroma (**Table 1**). This alcohol is widely applied in the food industry as a flavoring agent to improve the taste of foods such as soft drinks, sweets, ice cream, chewing gum and biscuits (ČERVENĀNSKÝ; MIHAL; MARKOŠ, 2017; LUO et al., 2017; OKUNIEWSKA et al., 2017b; WANG et al., 2017a). In addition, 2-PE is used as a substrate for the synthesis of other aromatic compounds, including phenylethyl acetate (GRAS 2857), a compound with a floral odor that is widely used in the flavor and fragrance industry (PINTO, 2017), and *p*-hydroxyphenylethanol, which is widely used in pharmaceutical and chemical industries (ZHANG et al., 2014).

Table 1. Physicochemical properties of 2-Phenylethanol

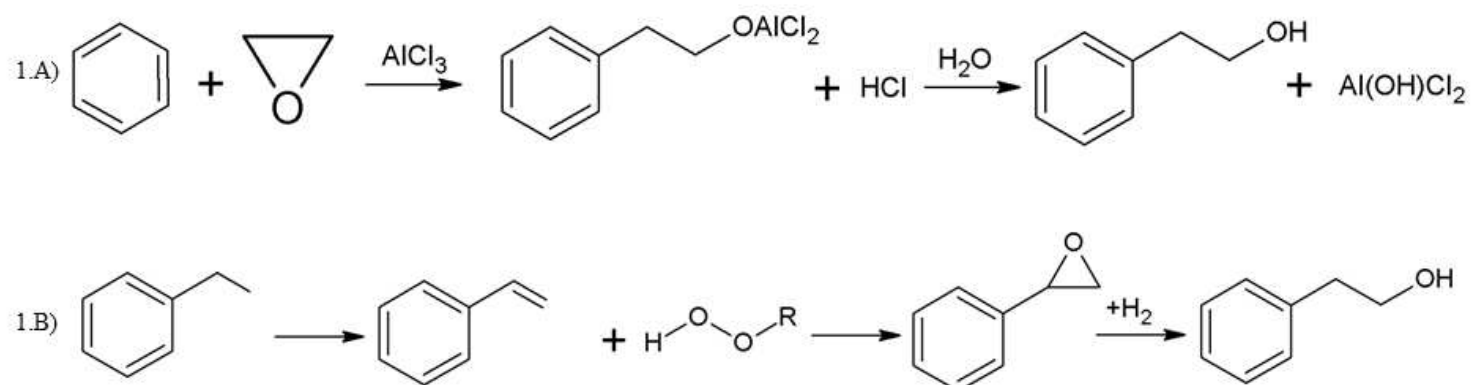
Property	Description
Characteristics	Colorless liquid, rose and honey aroma
Aroma threshold values	Detection: 0.015 ppb to 3.5 ppm; Recognition: 1.2 ppm
Structure	
Molecular formula	C ₈ H ₁₀ O
Molecular weight	122.167 g.mol ⁻¹
Boiling point	219-221 °C
Melting point	-27 °C
Solubility	19 g.L ⁻¹ in water at 20 °C; soluble in alcohols, esters, aldehydes, benzyl benzoate, mineral oil, chlorinated solvents
Synonyms	Phenylethyl alcohol, 2-phenylethyl alcohol, β-phenylethyl alcohol fenilético, benyl carbinol, β-hydroxyethylbenzene
Register FEMA-GRAS	2858

Fonte: (BURDOCK, 1976; ETSCHMANN et al., 2002); PubChem Compound Database; CID = 6054

Natural 2-PE can be extracted from the essential oils of flowers such as hyacinths, jasmine, lilies, daffodils and roses. However, climatic conditions influence the yield of 2-PE obtained because unfavorable conditions can result in a scarcity of flowers. In addition, the extraction efficiency might be low, and the concentrations of 2-PE in these flowers are low, except for rose oil, from which up to 60% yield can be obtained (ETSCHMANN et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2015). Thus, the extraction of 2-PE is an expensive process (US\$ 1000/kg), the yield is low, and the market demand has not been satisfied. Global production of 2-PE was estimated at approximately 10,000 tons/year in 2010, with 7000 tons being obtained by chemical synthesis at an average price of US\$ 5/kg (DE LIMA et al., 2018; LU et al., 2016).

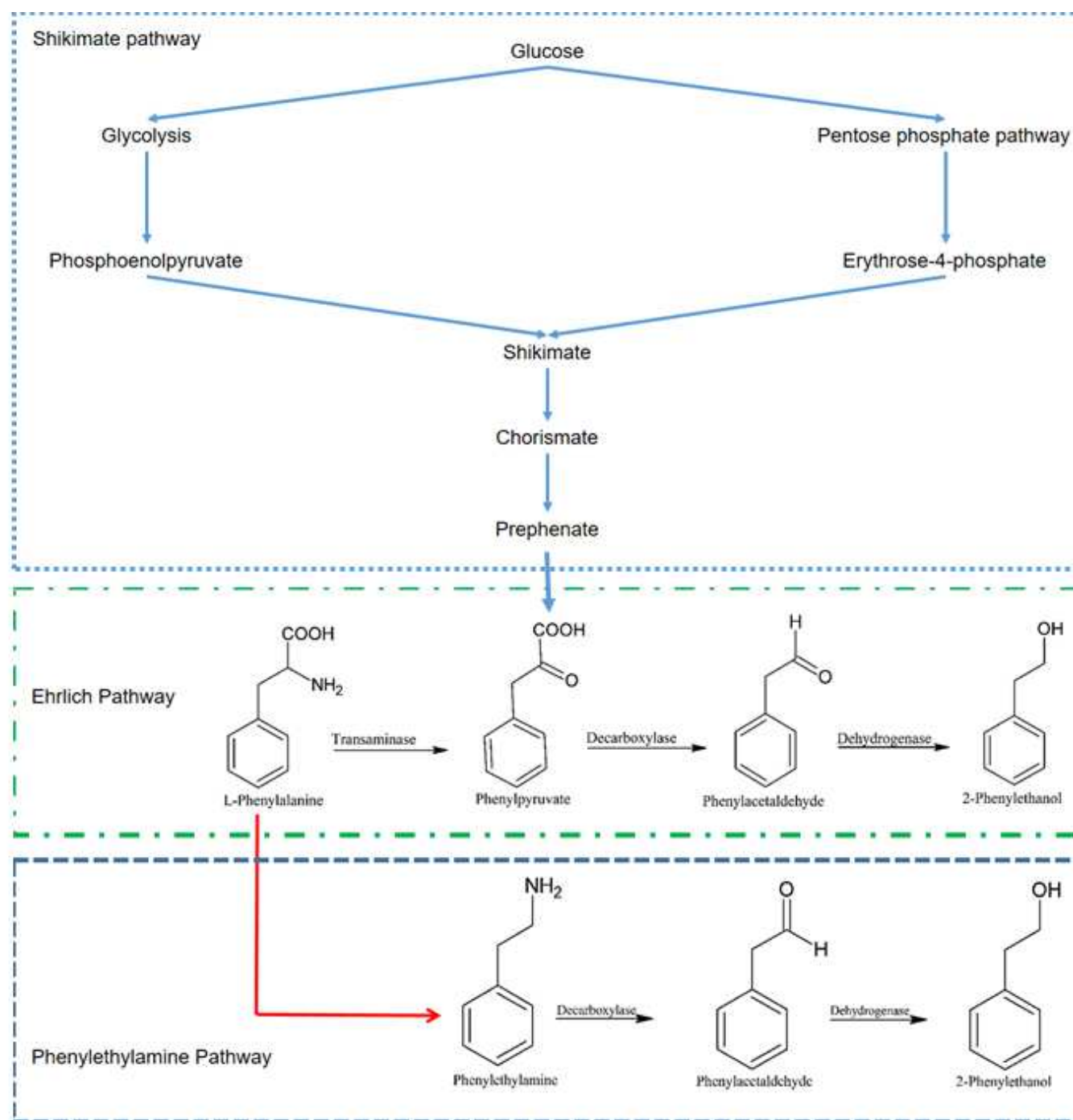
2-PE can be obtained by chemical synthesis, mainly using the Friedel-Craft reaction (Figure 1.A), in which ethylene oxide reacts with benzene in the presence of molar quantities of aluminum chloride. The addition product is hydrolyzed to yield 2-PE. It can also be produced by the catalytic reduction of styrene oxide (Figure 1.B) by hydrogenation at low temperatures in the presence of Raney nickel catalyst and a small amount of sodium hydroxide (ESHKOL et al., 2009; ETSCHMANN et al., 2002; LU et al., 2016).

Figure.1 (A) Friedel-Craft reaction for the synthesis of 2-PE; (B) Reduction of styrene oxide in the synthesis of 2-PE



The synthesis of 2-PE by both methods involves toxic reagents that are harmful to health and the environment, as well as technically difficult conditions (high temperature, high pressure and use of strong acids or alkalis), and by-products that reduce the final quality of 2-PE are produced. Therefore, the contaminants must be removed before commercializing the product. This purification step increases the cost of production (ESHKOL et al., 2009; WANG et al., 2011a). The biosynthesis of 2-PE can occur through two routes that have L-phenylalanine (L-PHE) as the precursor (Figure 2): the Phenylethylamine pathway (PEA) and the Ehrlich pathway, which combines with the Shikimate route to form the phenylpyruvate pathway, whereby 2-PE can be formed via "de novo" synthesis from glucose. In the PEA pathway, L-PHE is decarboxylated to PEA by an aromatic amino acid decarboxylase, oxidatively deaminated to phenylacetaldehyde by monoamine oxidase, and reduced to 2-PE by alcohol dehydrogenase (CHEN et al., 2011; ZHANG et al., 2014).

Figure.2 Biotechnological pathways for the production of 2-PE.



Adapted from Etschmann et al. (2003); Etschmann et al. (2002); Etschmann et al. (2005); Wittmann et al. (2002); Zhang et al. (2014).

In the Shikimate pathway, phenylalanine is first synthesized from phosphoenolpyruvate (PEP) and erythrose-4-phosphate (E4P) and converted to the phenylpyruvate intermediate, which is then converted to phenylacetaldehyde and 2-PE via the Ehrlich pathway (CHEN et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2015; SHEN et al., 2016). In the Ehrlich pathway, L-PHE is transaminated to phenylpyruvate by a transaminase, decarboxylated to phenylacetaldehyde by phenylpyruvate decarboxylase (PDC), and then reduced to 2-PE by a dehydrogenase. The 2-PE

produced can also be converted to phenylacetaldehyde and then to phenylacetate (2-PEAc) (CHEN et al., 2017; ETSCHMANN; SCHRADER, 2006; SHEN et al., 2016).

Several microorganisms (bacteria, filamentous fungi and yeasts) have the capacity to synthesize 2-PE. A strong potential for industrial production by yeast has been observed, where *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* are the most widely studied species (ETSCHMANN et al., 2002; LU et al., 2016; WITTMANN; HANS; BLUEMKE, 2002). The biotechnological production of 2-PE process involves mild process conditions, a short production cycle, high substrate selectivity and few by-products. In addition to being considered a promising strategy for the production of food additives, the products can be labeled as "natural" by the US Food and Drug Administration (HUA; XU, 2011; WANG et al., 2011a). Therefore, the biotechnological production of 2-PE from L-PHE is highly desirable and commercially more viable than other methods (CHREPTOWICZ et al., 2016; VELASCO et al., 2010; WANG et al., 2017a). However, the accumulation of 2-PE in the medium at concentrations greater than 4 g/L can be toxic to some microorganisms and leads to a very low final concentration (ČERVENŠANSKÝ; MIHAL; MARKOŠ, 2017; ESHKOL et al., 2009; WANG et al., 2011a).

This review analyzes the recent advances in the biotechnological production of 2-PE, with emphasis on the strategies used to increase the production and the applications of ISPR techniques (*In Situ* Product Removal) for 2-PE recovery.

1.2 Suitable conditions for the production biotechnological of 2-phenylethanol

The production of 2-PE can be strongly influenced by the composition of the culture medium (ETSCHMANN; SELL; SCHRADER, 2004), culture conditions and microorganisms employed (FABRE; BLANC; GOMA, 1998; HUANG; LEE; CHOU, 2000a). The complexity of the nitrogen source and the nature of the carbon source in the medium can influence the metabolism of the microorganism and, consequently, the amount of by-products formed (GARAVAGLIA et al., 2007; PINTO, 2017; WITTMANN; HANS; BLUEMKE, 2002).

The ability of the JM2014 strain of *Saccharomyces cerevisiae* to convert L-PHE to 2-PE was observed by Chreptowicz et al. (2016) utilizing a distinct: optimum essential nitrogen medium (NEO) (20 g.L⁻¹ glucose, 4 g.L⁻¹ L-PHE, 4 g.L⁻¹ KH₂PO₄, 0.4 g.L⁻¹ of MgSO₄.7H₂O and 1 g.L⁻¹ of yeast extract) and medium 8 (15 g.L⁻¹ glucose, 8 g.L⁻¹ sucrose, 5 g.L⁻¹ L-PHE, 0.5 g.L⁻¹ MgSO₄, 1.7 g.L⁻¹ YNB extract without amino acids and ammonium sulfate, pH 4.6). Yields of 2.21 g.L⁻¹ (NEO medium) and 3.65 g.L⁻¹ (medium 8) of 2-PE were obtained. In contrast, (LU et al., 2016) evaluated the ability of *Candida glycerinogenica* WL2002-5 to synthesize 2-PE using defined medium (50 g.L⁻¹ glucose, 5 g.L⁻¹ L-PHE, 5 g.L⁻¹ KH₂PO₄, 0.5 g.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O and 0.17 g.L⁻¹ of YNB), and a yield of 2.5 g.L⁻¹ of 2-PE was obtained. Using the defined medium without the L-PHE (YNB was the only nitrogen source), they obtained a 75 mg.L⁻¹ concentration of 2-PE, indicating that the presence of a potential de novo pathway exists for the synthesis of 2-PE from glucose in the WL2002-5 strain of *C. glycerinogenes*. Thus, the association of glucose and sucrose as carbon sources as well as L-PHE and YNB as nitrogen sources demonstrates their direct influence on the yield of 2-PE (3.65 g.L⁻¹ (medium 8)) (CHREPTOWICZ et al., 2016).

Thermo-tolerant (Ye9-612) and non-tolerant (Ye9-596) *Saccharomyces cerevisiae* strains were cultured by Eshkol et al. (2009) at different temperatures (30 °C, 37 °C and 40 °C) utilizing NE medium (5 g.L⁻¹ of glucose, 4 g.L⁻¹ of L-PHE, 4 g.L⁻¹ of KH₂PO₄, 4 g.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O, 1 g.L⁻¹ of yeast extract). The best yields were 0.85 and 0.59 g.L⁻¹ at 30 and 37 °C, respectively, for the Ye9-612, strain and 0.54 g.L⁻¹ at 30 °C for the Ye9-596 strain. At 40 °C, the concentration of 2-PE obtained was not significant in any of the cases. Similar data were

reported by Lu et al. (2016), where they observed that the ideal temperature for 2-PE biosynthesis was 30 °C (3.6 g.L⁻¹) for the WL2002-5 thermally tolerant strain of *C. glycerinogene*. The 2-PE titer significantly decreased with increasing temperature (above 37 °C), and the cell growth was completely repressed at 47 °C where 1.5 g.L⁻¹ of 2-PE (40% of the maximum titer) was detected.

Similar results were also presented by Huang, Lee and Chou (2000a) using *Pichia fermentans* L-5 incubated into 50 mL of medium (formulated with 0.25% yeast extract, 18% sucrose and 0.10% phenylalanine). They observed that the highest production of 2-PE (515.2 mg.L⁻¹) was obtained at the temperature range of 30-35 °C, whereas a lower production of 2-PE (88.7 mg.L⁻¹) was observed at 40 °C. They also observed that the production of 2-PE increased as the pH increased, reaching a maximum of 515.2 mg.L⁻¹ at pH 8.5, and the yield of 2-PE decreased above this pH. It was found that the production of 2-PE increased as the stirring speed increased, the production of 2-PE (524.4 mg.L⁻¹) at 250 rpm, was 10 times greater than the yield obtained in a static culture. Thus, the optimum temperature, pH, and stirring speed for the production of 2-PE by *P. fermentans* L-5 were 30-35 °C, pH 8.5 and 250 rpm, respectively, with a maximum yield of 524,4 mg. L⁻¹ of 2-PE.

Lima et al. (2018) used the *K. marxianus* CCT 7735 strain incubated in medium composed of 8.0 g.L⁻¹ L-PHE, 20.0 g.L⁻¹ glucose and 6.7 g.L⁻¹ YNB (yeast extract nitrogen base) without amino acids and ammonium sulfate, pH 5.0 with a yield of 174 mg.L⁻¹ of 2-PE. They reported that concentrations greater than 4.0 g.L⁻¹ of L-PHE did not increase the yield of 2-PE and the L-PHE was not fully consumed. Similar data were found by Fabre, Blanc and Goma (1998), who found that increasing the L-PHE concentration from 2.0 to 5.0 g.L⁻¹ did not improve the production of 2-PE by *K. marxianus* DSM 5422. They also evaluated the effect of the glucose concentration on the production of 2-PE, wherein a concentration of up to 30 g.L⁻¹ was shown to lead to an increase in the yield of 2-PE (3.40 g.L⁻¹). The 2-PE production was also influenced by temperature; the highest 2-PE titres were obtained at 25 °C (appr. 52 mg.L⁻¹.h⁻¹) and 30 °C (approx.. 65 mg.L⁻¹.h⁻¹).

The concentration of 2-PE is directly influenced by the nitrogen and carbon source, as well as by the variation of temperature, pH and stirring rate, as is shown in Table 2. The optimal production of 2-PE occurs in the temperature range of 30 °C to 37 °C in the presence of the L-PHE and YNB nitrogen sources and of the glucose and sucrose carbon sources. The optimum yield was obtained in the pH range of 4.6-8.5 with a stirring rate of 250 rpm (CHREPTOWICZ et al., 2016; CHREPTOWICZ; MIERZEJEWSKA, 2018; ESHKOL et al., 2009; HUANG; LEE; CHOU, 2000a; LU et al., 2016). The following topics will discuss techniques such as increasing the scale of the process, extraction and genetic engineering, with the aim of increasing the production of 2-PE.

Table 2. Overall view of the production of 2-phenylethanol through biotechnological routes.

Micro-organism	Substrate	Volume	Time	Temperature	Production	Reference
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> JM2014	L-PHE+glucose +sucrose	50 mL	72 h	30 °C	3.65 g.L ⁻¹	(CHREPTOWICZ et al., 2016)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> JM2014	L-PHE+glucose+sucrose	4 L	72 h	30 °C	3.60 g.L ⁻¹	(CHREPTOWICZ et al., 2016)
<i>Candida glycerinogenes</i> WL2002-5	L-PHE+glucose	30 mL	50 h	30 °C	3.6 g.L ⁻¹	(LU et al., 2016)
<i>Candida glycerinogenes</i> WL2002-5	Glucose	30 mL	50 h	30 °C	75 mg.L ⁻¹	(LU et al., 2016)
<i>Candida glycerinogenes</i> WL2002-5	L-PHE+glucose	3 L	45 h	30 °C	5.0 g.L ⁻¹	(LU et al., 2016)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Ye9-612	L-PHE+glucose	60 mL	72 h	30 °C	0.85 g.L ⁻¹	(ESHKOL et al., 2009)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Ye9-612	L-PHE+glucose	1 L	72 h	30 °C	4.5 g.L ⁻¹	(ESHKOL et al., 2009)
<i>Pichia fermentans</i> L-5	L-PHE+sucrose	50 mL	72 h	30-35 °C	515.2 mg.L ⁻¹	(HUANG; LEE; CHOU, 2000a)
<i>K. marxianus</i> CCT 7735	L-PHE+glucose	25mL	72 h	30 °C	174 mg.L ⁻¹	(LIMA et al., 2018)
<i>K. marxianus</i> DSM 5422	L-PHE+glucose	50 mL	24 h	30 °C	3.40 g L ⁻¹	(FABRE; BLANC; GOMA, 1998)
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	L-PHE+ grape must	1.5L	100 h	37 °C	0.51 g.L ⁻¹	(GARAVAGLIA et al., 2007)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	L-PHE+glucose	12 L	42 h	25 °C	7.5 g.L ⁻¹	(MIHALI et al., 2012)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	L-PHE+glucose+cassava wastewater	50 mL	72 h	24 °C	1.33 g.L ⁻¹	(OLIVEIRA et al., 2015)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> JM2014	Whey+concentrated beet juice+L-PHE	50 mL	72 h	30 °C	3.28 g.L ⁻¹	(CHREPTOWICZ et al., 2018)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Olive mill waste	30 mL	72 h	30 °C	13.91 µg/kg	(GUNESER et al., 2017)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Tobacco residues	50 mL	87.97 h	-	1.55 g.L ⁻¹	(WANG et al., 2013)

*L-PHE: L-Phenylalanine.

1.2.1 Process conditions in benchtop bioreactor

The use of bioreactors to increase productions sought to provide adequate conditions of temperature, pH, substrate concentration, mineral salts, vitamins and oxygen to obtain a better microbial growth, as well as to increase the yield of the products of interest (ALVES, 2010).

The JM2014 strain of *Saccharomyces cerevisiae* was used by Chreptowicz et al. (2016) in a 6.2-L bioreactor containing medium 8 (15 g.L⁻¹ glucose, 8 g.L⁻¹ sucrose, 5 g.L⁻¹ L-PHE, 0.5 g.L⁻¹ MgSO₄, 1.7 g.L⁻¹ YNB without amino acids or ammonium sulfate, pH 4.6). After 72 hours, the concentration of 2-PE obtained was 3.60 g.L⁻¹, corresponding to a bioconversion efficiency of approximately 97%. There was an increase in the specific growth rate of $\mu = 0.310 \text{ h}^{-1}$ (observed in bioreactor) vs $\mu = 0.180 \text{ h}^{-1}$ (observed in shaken flask). In a study conducted by Eshkol et al. (2009), the Ye9-612 strain of *Saccharomyces cerevisiae* was incubated in a 3-L fermentor containing NE medium (20 g.L⁻¹ glucose, 10 g.L⁻¹ L-PHE, 4 g.L⁻¹ KH₂PO₄, 0.4 g.L⁻¹ of MgSO₄.H₂O, 1 g.L⁻¹ yeast extract) at 30 °C to yield a final concentration of 4.5 g.L⁻¹ of 2-PE after 72 hours in a space-time yield of 0.065 g.L⁻¹.h⁻¹.

On the other hand, Mihaľ et al. (2012) used *Saccharomyces cerevisiae* in an aerobic bioreactor fed with an initial volume of 12 L containing 5.8 g.L⁻¹ biomass, 50-140 g glucose, 1-8 g of L-PHE. The reactor was fed at one-hour intervals and maintained at 25 °C and pH 5.5 for 48 hours. A yield of 7.5 g.L⁻¹ of 2-PE was obtained, which was greater than that obtained in a normal fed-batch bioreactor (approximately 4 g.L⁻¹).

Garavaglia et al. (2007) used the *Kluyveromyces marxianus* strain in a 1.5 L bioreactor containing grape must and 3 g.L⁻¹ of L-PHE. The reactor was maintained at 37 °C and pH 7. They observed that the greater formation of 2-PE occurred during the stationary growth phase, when ethanol was totally metabolized, and it coincided with the faster consumption of L-PHE. A yield of 0.62 g of 2-PE/g L-PHE was obtained, very close to the theoretical maximum yield of 0.75 g.g⁻¹. This result is close to that found by Lu et al. (LU et al., 2016), who obtained a yield of 0.71 g.g⁻¹ using the WL2002-5 strain of *Candida glycerinogenes* in a 5-L bioreactor (glucose 90 g.L⁻¹, 5 g.L⁻¹ KH₂PO₄, 4 g.L⁻¹ of yeast extract, 0.5 g.L⁻¹ MgSO₄.H₂O, 7 g.L⁻¹ L-PHE). The maximum 2-PE titer of 5.0 g.L⁻¹ was obtained after 45 h. The concentration of 2-PE improved with the use of batch aerobic bioreactors, and the lower glucose and L-PHE feed rates and greater aeration lead to an increase in the production of 2-PE (MIHAL; KRIŠTOFÍKOVÁ; MARKOŠ, 2013).

1.2.2 Biotechnological production of 2-phenylethanol using genetically modified microorganisms

Bioengineering can be considered as the process by which living organisms are genetically manipulated through the introduction of new genes or their metabolic functions are modified to produce organisms with new characteristics or characteristics not found in nature. The genetic improvement of species of high biotechnological value has been a useful method to solve the problem of low productivity in industrial processes by improving the biocatalytic performance of the strain. The most widely used method to increase 2-PE production includes mutagenesis by gene expression and exclusion (HUA; XU, 2011; RENAULT, 2002).

To increase the production of 2-PE from glucose, Shen et al. (2016) identified the genes encoding the enzymes 2-ketoacid decarboxylase (KDC) and alcohol dehydrogenase (ADH) of the Ehrlich pathway for expression in the YPH499 strain of *Saccharomyces*

cerevisiae using SD selective medium (20 g.L⁻¹ glucose and 6.7 g.L⁻¹ of yeast extract based on nitrogen without amino acids). They observed that expression of the ARO10 gene increased the production of 2-PE from glucose, and then created the BY4741 strain with expressed ARO10 and excluded ARO8 to attenuate the concurrent pathway to the 2-PE synthesis. The designed strain furnished a high level of 2-PE production (96 mg.L⁻¹), which represented an approximately 13-fold increase compared to the wild-type strain harboring the empty control vector.

In contrast, Wang et al. (2017a) expressed the ARO8 and ARO10 genes and the main transcription factor ARO80 in *Saccharomyces cerevisiae* and investigated the effect of the nitrogen source on the synthetic medium (SC) with L-PHE. ARO8 aromatic aminotransferase activities were seriously inhibited by ammonium sulfate in the SC with L-PHE medium. The fermentation test demonstrated that the expressed ARO8 or ARO10 led to an increase of about 42% in the production of 2-PE over that of the control strain. The influence of the CAT8 and MIG1 transcription factors on 2-PE biosynthesis was also explored. The production of 2-PE by excess expression of CAT8 was 62% (3.73 g.L⁻¹) higher than that of the control strain. The elimination of MIG1 also led to a greater production of 2-PE, which demonstrated the fact that an excessive expression of CAT8 and removal of MIG1 were more effective in regulating the expression of ARO9 and ARO10.

Kang et al. (2014) performed a similar study, where they cloned phenylpyruvate decarboxylase (KDC) and alcohol dehydrogenase (ADH) and introduced them into L-PHE-producing *Escherichia coli* to construct a pathway for the synthesis of 2-PE. This bacteria was grown in LB medium [5 g.L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 3 g.L⁻¹ KH₂PO₄, 3 g.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O, 1 g.L⁻¹ NaCl, 1.5 g.L⁻¹ sodium citrate, 0.015 g.L⁻¹ CaCl₂.2H₂O, 0.1125 g.L⁻¹ FeSO₄.7H₂O, 0.075 g.L⁻¹ thiamine-HCl, 0.4 g.L⁻¹ L-Tyr, yeast extract and 1.5 mL.L⁻¹ of solution of trace elements, to furnish 130 mg.L⁻¹ of 2-PE. In addition, 285 mg.L⁻¹ of 2-PE was obtained by optimizing the coordinated expression of the four key enzymes *aroF* fbr, *pheA* fbr, KDC and ADH.

The ARO10 and ADH2 genes of the Ehrlich pathway of *Saccharomyces cerevisiae* were cloned and expressed in *Kluyveromyces marxianus* to improve the production of 2-PE. The resulting strain, KmTY1, produced 1.0 g.L⁻¹ of 2-PE, which was five-fold greater than that of the wild type. When they expressed only one of the ARO10 or ADH2 genes, they did not observe improvement in the production of 2-PE (data not shown). This result suggests that the Ehrlich pathway is limited and both pathway proteins are required for overproduction of 2-PE. They further attempted an evolutionary engineering of *K. marxianus* BY25569 with plasmid pTY, giving rise to the KmTY2 strain, which produced 1.1 g.L⁻¹ of 2-PE after 72 hours of fermentation. The KmTY2 strain was further transformed with the plasmid pTY-AA, but no improvement in the production of 2-PE was observed, suggesting that the flow through the Ehrlich pathway was already saturated and that the further increase in the expression of ADH2 and ARO10 did not help increase the production of 2-PE. A maximum titre of 1.3 g.L⁻¹ from 20 g.L⁻¹ of glucose without the addition of L-PHE was obtained (KIM; LEE; OH, 2014).

Similar results were obtained by Kim, Cho, and Hahn (2014b). They demonstrated that the Ald3 gene is the principal gene responsible for the oxidation of phenylacetaldehyde, competing with the production of 2-PE. Thus, the exclusion of ALD3 and the expression of ARO9 and ARO10 through the expression of the Aro80 transcription factor lead to the production of 4.8 g.L⁻¹ of 2-PE in a medium containing 10 g.L⁻¹ of L-PHE as the sole source of nitrogen.

Therefore, the genetic improvement of species of high biotechnological value through the expression and exclusion of the genes has been shown to be a useful method for improving the biocatalytic performance of the strain, and an increase in the production of 2-PE of up to 13-fold greater than that of the wild type strain was observed.

1.2.3 Biotechnological production of 2-phenylethanol using agricultural residues.

The generation of residues and by-products is inherent to any productive sectors, including the agroindustrial and food sectors, which produce large amounts of liquid and solid waste (ALEJANDRA; HERMOSA, 2014). Thus, the use of agroindustrial residues as raw materials would be an alternative for a better allocation of these residues and a means of generating income in the aforementioned sectors. For example, we can mention the use as a substrate in biotechnological processes to enable the production of compounds of high value (BICAS et al., 2010; GUNESER et al., 2017; MOLINA, 2014; PIMENTEL, 2012). This fact represents an attenuation for one of the main limitations in the production of aroma by biotechnological means, production costs.

Oliveira et al. (2015) performed a fermentative process using *Saccharomyces cerevisiae* as a biocatalyst in a medium containing cassava wastewater supplemented with varying concentrations of glucose (0, 25 and 50 g.L⁻¹) and L-PHE (0, 1.5 and 3.0 g.L⁻¹). The highest yields of 2-PE were obtained with a supplementation of 20.0 g.L⁻¹ of glucose and 5.5 g.L⁻¹ of L-PHE. In these conditions, 1.33 g.L⁻¹ of 2-PE and a yield factor of 0.070 g.g⁻¹ were obtained, which were equivalent to 74.3 and 89.7%, respectively, of the desired values.

Chreptowicz et al. (2018) evaluated 18 different species regarding their ability to produce 2-PE. Concentrations of 2-PE greater than 2 g.L⁻¹ were obtained with the JM2014, WUT34 and WUT35 strains of *S. cerevisiae* and the WUT36 strain of *P. fermentans*. The WMP (30 g.mL⁻¹ whey, 41 g.mL⁻¹ beet molasses, 5 g.mL⁻¹ L-PHE, pH 5.4) WJP (30 g.mL⁻¹ milk, 30 g.mL⁻¹ beetroot juice, 5 g.mL⁻¹ L-PHE, pH 5.4) and WSP (30 g.mL⁻¹ whey, 32 g.mL⁻¹ beet slurry II, 5 g.mL⁻¹ L-PHE, pH 5.5) media were varied at 30 °C for 72 hours. The maximum titer of 2-PE was obtained with the *Saccharomyces cerevisiae* JM2014 strain, with a yield of 2.52, 3.28 or 2.22 g.L⁻¹ and a 2-PE productivity of 35.00, 46.56 or 30.83 mg.L⁻¹.h⁻¹, respectively.

The production of 2-PE (13.91 µg/kg of substrate) was observed in a fermentation conducted with *Rhizopus oryzae* using olive mill waste (OMW, 10% w/v) as substrate (GUNESER et al., 2017). The positive effect of fermentation time on the increase in yield was also demonstrated (72 hours).

The Plackett-Burman design, the steepest ascent design and Box-Behnken were used as tools to optimize the composition of culture medium containing tobacco residues to verify the production of 2-PE by *Saccharomyces cerevisiae*. The maximum yield (1.55 g.L⁻¹) was achieved with 39.28 g.L⁻¹ of tobacco residue at pH 5.90 and a fermentation time of 87.97 h. Thus, a new and ecological method of using tobacco and a continuous approach to biosynthesize 2-PE were demonstrated, which should stimulate the development of the tobacco industry (WANG et al., 2013).

The use of agroindustrial wastes can be an interesting economical solution because these residues are produced in large quantities and represent an enormous potential for bioconversion to valuable products that can be used as carbon sources in fermentative processes. Their use reduces the cost of the process and decreases environmental pollution (CHREPTOWICZ et al., 2018; DAMASCENO et al., 2003; LI et al., 2012; MARÓSTICA; PASTORE, 2007).

1.3 Purification steps for 2-phenylethanol recovery

ISPR (*In Situ* Product Removal) techniques are effective methods that seek to stabilize the product, facilitate processing and increase yield, while keeping the product concentration below an inhibitory level for the strains as demonstrated in Table 3. The methods can be divided into two-phase extraction and adsorption (HUA; XU, 2011).

Table 3. Techniques for *in situ* recovery (ISPR) of 2-phenylethanol.

Micro-organism	Technique	Extraction solvente	Production of 2-PE	Reference
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Solvent extraction of membrane base	Pentane	79.5 g.L ⁻¹	(MIHAE et al., 2012)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Solvent extraction of membrane base	Pentane	18.6 g.L ⁻¹	(MIHAL; KRIŠTOFÍKOVÁ; MARKOŠ, 2013)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> JM2014	Two-phase extraction	Ethyl acetate	2.34 -2.64 g.L ⁻¹	(Chreptowicz et al., 2016)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> BD	Non-polar macroporous resin D101	---	6.2 g.L ⁻¹	(MEI; MIN; LÜ, 2009)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> P-3	Resin HZ818	---	6.6 g.L ⁻¹	(HUA et al., 2010)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Macroporous resin FD0816	---	12.8 g.L ⁻¹	(HUA; XU, 2011)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> R-UV3	Non-polar macroporous resin FD0816	---	13.7 g.L ⁻¹	(Wang et al., 2011)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> R-UV3	Semi-continuous culture with ISPR	---	32.5 g.L ⁻¹	(Wang et al., 2011)

Two-phase extraction consists of a simple, inexpensive and easily applicable system involving the addition of a suitable organic solvent. The 2-PE produced is extracted *in situ* to an organic phase because the cells are in the aqueous phase, where the concentration of 2-PE is below the inhibitory level. Bioconversion can be maintained with a minimum loss of biocatalytic ability (HUA; XU, 2011; WANG et al., 2011a).

Chreptowicz et al. (2016) used 500 mL of ethyl acetate for each 900 mL of broth to extract all the 2-PE produced by *Saccharomyces cerevisiae* JM2014. A second extraction step was necessary to obtain a complete extraction of 2-PE, where the combined organic phases were dried using two drying agents: magnesium sulfate and potassium carbonate. However, differences in the yields (2.64 g.L^{-1} and 2.34 g.L^{-1} , respectively) and properties of the final product were observed when the 2-PE was obtained with greater than 98% purity. When magnesium sulphate was used, a slightly bitter odor was perceptible, and the final product had a dark color. When potassium carbonate was used, a more pleasant and mild odor was observed, and the 2-PE was almost transparent.

Mihal' et al. (2012) used pentane as a solvent to ensure a sufficient driving force for membrane extraction. They maintained the concentration of 2-PE in the fermentation medium below 2.2 g.L^{-1} and effected an efficient extraction of 79 g of 2-PE at the end of the experiment. In a similar study, Mihal, Krištofiková, and Markoš (2013) used *Saccharomyces cerevisiae* in a batch aerobic bioreactor with an initial volume of 13.8 L (6.2 g.L^{-1} biomass, 10 g.L^{-1} glucose and 10 g.L^{-1} of L-PHE). The bioreactor was fed with 0.53 g.min^{-1} glucose and 0.113 g.min^{-1} L-PHE, and the air flow was 20 L.min^{-1} . Pentane flowed through the membrane module at 0.15 L min^{-1} and was continually distilled in the regeneration unit. A production of 18.6 g.L^{-1} of 2-PE was obtained, demonstrating that the lower glucose and L-PHE feed rate and increased aeration lead to an increase in the production of 2-PE.

Although the concentrations of 2-PE obtained with the two-phase extraction have been greatly improved, there are several drawbacks. Most extraction liquids are high-boiling chemicals that evaporate slowly and are difficult to remove from the aqueous phase. The residual odor can affect the quality of the final product. In addition, these extraction liquids can exhibit cytotoxicity and, therefore, affect cell viability in the production culture. This fact restricts the choice of an appropriate liquid. Thus, the choice of the extraction method is important mainly because of the great applicability of 2-PE in the flavor industry (HUA; XU, 2011).

In situ product adsorption (ISPA) is one of the ISPR techniques that uses resins or other adsorption media and is widely used in biotechnological production processes to

facilitate product recovery (separation of several by-products) or to avoid inhibition of the product or the substrate. In addition to being a non-biodegradable, non-volatile and inexpensive process, polymers have another important advantage over organic solvents. They do not compromise product quality, and they do not affect the organoleptic properties (HUA; XU, 2011; MIHAL; KRIŠTOFÍKOVÁ; MARKOŠ, 2013; WANG et al., 2011a).

The non-polar, porous macro-resin D101 was applied to 2-PE bioconversion by *S. cerevisiae* BD, resulting in a total concentration of 2-PE of 6.2 g.L⁻¹, of which 3.2 g.L⁻¹ remained in the aqueous phase and 3.0 g.L⁻¹ was adsorbed onto the resin (MEI; MIN; LÜ, 2009). When the 7.0% HZ818 resin was added to the bioconversion system that used the P-3 strain of *S. cerevisiae*, 6.6 g.L⁻¹ of 2-PE was obtained from 12.0 g.L⁻¹ of L-PHE. The concentration of 2-PE was improved by 66.2% when compared to that obtained in the bioconversion without addition of adsorbent resin (HUA et al., 2010).

Wang et al. (2011a) performed the extraction of 2-PE produced by *Saccharomyces cerevisiae* R-UV3 using the FD0816 non-polar macroporous resin at 30 °C and pH 5.0. The blend contained 30-35 g.L⁻¹ of 2-PE and 5.0-5.6 g.L⁻¹ of L-PHE. The final concentration of 2-PE was 13.7 g.L⁻¹, and the mean yield reached 0.39 g.L.h⁻¹ after 35 hours. The concentration of 2-PE and the space-time yield with the addition of resin were, respectively, 213% and 24.6% higher than those obtained without resin. To further increase the space-time yield of L-PHE bioconversion into 2-PE, a semi-continuous culture with ISPR was performed, in which 2-PE was continuously produced by the R-UV3 strain to yield a final concentration of 2-PE of 32.5 g.L⁻¹ and the mean yield was 0.45 g.L⁻¹, 15.4% greater than that of the fed-batch process with ISPR.

Mei et al. (2009) achieved the bioconversion of L-PHE to 2-PE by *Saccharomyces cerevisiae* BD in 30-mL of medium (containing 120 g.L⁻¹ sucrose, 5 g.L⁻¹ yeast extract, 7.5 g.L⁻¹ KH₂PO₄, 9.6 g.L⁻¹ K₂HPO₄ and 0.5 g.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O) at 30 °C, with stirring at 200 rpm for 36 hours. With the addition of 2 g of non-polar macroporous resin D101, a total concentration of 6.01 g.L⁻¹ of 2-PE, of which 3.15 g.L⁻¹ remained in the aqueous phase and 3.02 g.L⁻¹ was adsorbed in D101. The concentration recovered was much higher than the concentration of 2-PE (4.56 g.L⁻¹) obtained without the addition of resin.

The specific rate of production of 2-PE is inhibited mainly by the final product 2-PE and by the product ethanol. Because the production of 2-PE was associated with cell growth, the biomass would be very concentrated if cells were not unloaded with the removal of 2-PE (WANG et al., 2011b). In addition to being non-biodegradable, non-volatile and of low cost, ISPR (In Situ Product Removal) techniques would be a promising method to

improve the production of 2-PE, and with an interesting perspective for industrial applications (HUA; XU, 2011).

1.4 Concluding remarks

The growing demand for flavorings in the world market requires new strategies to obtain these compounds. 2-PE is a high-cost and widely used aromatic alcohol, with several commercial applications. To increase the concentration of 2-PE produced, the metabolic engineering techniques and the use of agroindustrial wastes as alternative substrates are potential approaches that have been used by many authors who seek to make the process economically more viable and with sustainable features. For example, the use of metabolic engineering led to an increase in the production of 2-PE up to 13-times than that obtained with the-wild type lineages. The practical advances and process optimizations are also of great importance for 2-PE improvements. An optimum 2-PE production are obtained between 30 °C and 37 °C in the associated presence of the L-PHE and YNB as nitrogen sources, and mainly the use of glucose and sucrose as carbon sources, in a pH range of 4.6-8.5 with stirring at approximately 250 rpm. Additionally, the possible process inhibition by the product can be an important disadvantage, that needs to be circumvented by some approaches. Therefore, the application of ISPR (In Situ Product Removal) techniques guarantees the extraction of 2-PE without the loss of product quantity and quality, thus increasing its concentration produced. Finally, the production of 2-PE via the biotech pathway presents numerous advantages and needs many efforts and investments to make this alcohol viable for industrial applications.

1.5 References

- ALEJANDRA, N.; HERMOSA, B. Aproveitamento de resíduos do processamento semi-seco do café para produção de compostos de valor agregado. p. 76, 2014.
- ALPER, I.; FRENETTE, M.; LABRIE, S. Ribosomal DNA polymorphisms in the yeast *Geotrichum candidum*. **Fungal Biology**, v. 115, n. 12, p. 1259–1269, dez. 2011.
- BICAS, J. L. et al. Integrated process for co-production of alkaline lipase and R-(+)- α -terpineol by *Fusarium oxysporum*. **Food Chemistry**, v. 120, n. 2, p. 452–456, maio 2010.
- BICAS, J. L. et al. Evaluation of the antioxidant and antiproliferative potential of bioflavors. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 7, 2011.
- BIER, J. et al. Biotransformation of limonene by an endophytic fungus using synthetic and orange residue-based media. v. 1, 2016.
- BRAGA, A.; GUERREIRO, C.; BELO, I. Generation of Flavors and Fragrances Through Biotransformation and De Novo Synthesis. **Food and Bioprocess Technology**, v. 11, n. 12, p. 2217–2228, 2018.
- BURDOCK, G. A. Fenaroli's handbook of flavor ingredients. **Food and Cosmetics Toxicology**, v. 14, n. 2, p. 147, jan. 1976.
- CELÍŃSKA, E. et al. *Yarrowia lipolytica*: The novel and promising 2-phenylethanol producer. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 3–4, p. 389–392, 2013.
- ČERVENŠANSKÝ, I.; MIHAL, M.; MARKOŠ, J. Potential application of perfusion and pertraction for in situ product removal in biocatalytic 2-phenylethanol production. **Separation and Purification Technology**, v. 183, p. 11–20, ago. 2017.
- CHEN, X. et al. Functional characterization of rose phenylacetaldehyde reductase (PAR), an enzyme involved in the biosynthesis of the scent compound 2-phenylethanol. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 2, p. 88–95, 2011.
- CHEN, X. et al. Regulation of general amino acid permeases Gap1p, GATA transcription factors Gln3p and Gat1p on 2-phenylethanol biosynthesis via Ehrlich pathway. **Journal of Biotechnology**, v. 242, p. 83–91, 2017.
- CHREPTOWICZ, K. et al. Production of natural 2-phenylethanol: From biotransformation to purified product. **Food and Bioproducts Processing**, v. 100, p. 275–281, 2016.
- CHREPTOWICZ, K. et al. Screening of yeasts for the production of 2-phenylethanol (rose aroma) in organic waste-based media. **Letters in Applied Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 153–160, 2018.
- CHREPTOWICZ, K.; MIERZEJEWSKA, J. Enhanced bioproduction of 2-phenylethanol in a biphasic system with rapeseed oil. **New Biotechnology**, v. 42, n. December 2017, p. 56–61, 2018.

DAMASCENO, S. et al. Production of volatile compounds by *Geotrichum fragrans* using cassava wastewater as substrate. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 4, p. 411–414, 2003.

DE LIMA, L. A. et al. Screening of Yeasts Isolated from Brazilian Environments for the 2-Phenylethanol (2-PE) Production. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, 2018.

ESHKOL, N. et al. 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. M. W. et al. Biotechnological production of 2-phenylethanol. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 59, n. 1, p. 1–8, 1 jun. 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.

ETSCHMANN, M. M. W.; SELL, D.; SCHRADER, J. Production of 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate from L-phenylalanine by coupling whole-cell biocatalysis with organophilic pervaporation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 92, n. 5, p. 624–634, 2005.

FABRE, C. E.; BLANC, P. J.; GOMA, G. Production of 2-phenylethyl alcohol by *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology Progress**, v. 14, n. 2, p. 270–274, 1998.

GAMERO, A. et al. High-throughput screening of a large collection of non-conventional yeasts reveals their potential for aroma formation in food fermentation. **Food Microbiology**, v. 60, p. 147–159, 2016.

GARAVAGLIA, J. et al. 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.

GRONDIN, E. et al. Flavour production by *Saprochaete* and *Geotrichum* yeasts and their close relatives. **Food Chemistry**, v. 237, p. 677–684, 2017.

GRYGIER, A.; MYSZKA, K.; RUDZIŃSKA, M. *Galactomyces geotrichum*. n. 2015, p. 1360, 2017.

HOOG, G. S.; SMITH, M. T. Ribosomal gene phylogeny and species delimitation in *Geotrichum* and its teleomorphs. **Studies in Mycology**, n. 50, p. 489–515, 2004.

HOSOGLU, M. I.; GUNESER, O.; YUCEER, Y. K. **on Production of Bioflavor Compounds**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018.

HUA, D. et al. Enhanced 2-phenylethanol production from L-phenylalanine via in situ product adsorption. v. 28, n. December 2009, 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.

HUANG, C. J. R.; LEE, S. L.; CHOU, C. C. Production and Molar Yield of 2-Phenylethanol by *Pichia fermentans* L-5 as Affected by Some Medium Components. **JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING**, v. 90, n. 2, p. 142–147, 2000a.

HUANG, C. J. R.; LEE, S. L.; CHOU, C. C. Production and Molar Yield of 2-Phenylethanol by *Pichia fermentans* L-5 as Affected by Some Medium Components. v. 90, n. 2, p. 142–147, 2000b.

KANG, Z. et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of 2-phenylethanol from renewable glucose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 4, p. 2012–2021, 2014.

KIM, B.; CHO, B. R.; HAHN, J. S. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of 2-phenylethanol via Ehrlich pathway. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, n. 1, p. 115–124, 2014.

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, 1 jul. 2014.

KONÉ, M. K. et al. Contribution of predominant yeasts to the occurrence of aroma compounds during cocoa bean fermentation. **Food Research International**, v. 89, p. 910–917, 2016.

KRINGS, U.; BERGER, R. G. Biotechnological production of γ -avours and fragrances. p. 1–8, 1998.

LIMA, L. A. DE et al. Screening of Yeasts Isolated from Brazilian Environments for the 2-Phenylethanol (2-PE) Production. v. 332, p. 326–332, 2018.

LU, X. et al. 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.

LUO, C. et al. Cosynthesis of L-homophenylalanine and 2-phenylethanol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing aspartate aminotransferase from *Escherichia coli* BL21(DE3). **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 123, n. 1, p. 1–7, jan. 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, 2009.

MIHAL, M. et al. Intensification of 2-phenylethanol production in fed-batch hybrid bioreactor: Biotransformations and simulations. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 57–58, p. 75–85, 2012.

MIHAL, M.; KRIŠTOFÍKOVÁ, L.; MARKOŠ, J. Production of 2-phenylethanol in hybrid system using airlift reactor and immersed hollow fiber membrane module. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 72, p. 144–152, 2013.

OKUNIEWSKA, P. et al. Recovery of 2-phenylethanol from aqueous solutions of biosynthesis using ionic liquids. **Separation and Purification Technology**, 2017a.

PIMENTEL, M. R. Produção de compostos de aroma a partir da biotransformação de monoterpenos por *Pseudomonas*. **Universidade Estadual de Campinas Faculdade de Engenharia de Alimentos**, 2012.

PINTO, L. L. L. Produção biotecnológica de álcool feniletílico por fungos filamentosos em meio de cultura desenvolvido com utilização de resíduos de maçã (*malus domestica*). **Faculdade de Engenharia de Alimentos universidade Estadual de Campinas**, 2017.

SHEN, L. et al. Overexpressing enzymes of the Ehrlich pathway and deleting genes of the competing pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for increasing 2-phenylethanol production from glucose. **Journal of bioscience and bioengineering**, 2016.

SIN, H. N. et al. Optimization of hot water extraction for sapodilla juice using response surface methodology. v. 74, p. 352–358, 2006.

STARK, D. et al. Extractive Bioconversion of 2 Phenylethanol from L Phenylalanine by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Prog.**, v. 18, p. 514–523, 2002.

VELASCO, B. et al. Production of 2-phenylethanol in the biotransformation of cinnamyl alcohol by the plant pathogenic fungus *Colletotrichum acutatum*. **Vitae, Revista De La Facultad De Química Farmacéutica**, v. 17, n. 3, p. 272–280, 2010.

WANG, H. et al. A continuous and adsorptive bioprocess for efficient production of the natural aroma chemical 2-phenylethanol with yeast. **Enzyme and Microbial Technology**, 2011a.

WANG, H. et al. 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, 2011b.

WANG, P. et al. Cofactor self-sufficient whole-cell biocatalysts for the production of 2-phenylethanol. **Metabolic Engineering**, 2017a.

WANG, Q. et al. Biosynthesis of 2-phenylethanol using tobacco waste as feedstock. v. 31, n. March, p. 292–298, 2013.

WANG, Z. et al. Regulation of crucial enzymes and transcription factors on 2-phenylethanol biosynthesis via Ehrlich pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 44, n. 1, p. 129–139, 21 jan. 2017b.

WITTMANN, C.; HANS, M.; BLUEMKE, W. Metabolic physiology of aroma-producing *Kluyveromyces marxianus*. **Yeast**, v. 19, n. 15, p. 1351–1363, 2002.

ZHANG, H. et al. De-novo synthesis of 2-phenylethanol by *Enterobacter* sp. CGMCC 5087. **BMC Biotechnology**, v. 14, 2014.

CAPÍTULO 2 - OBTENÇÃO DE COMPOSTOS DE AROMA POR SÍNTESE “*DE NOVO*” UTILIZANDO LINHAGENS DE *GEOTRICHUM sp.*

RESUMO

Os processos fermentativos onde a produção de compostos de aroma é realizada utilizando-se nutrientes simples, como açúcares, álcoois e outros, sem a adição de substratos especiais, são denominados síntese “*de novo*”. Dentre os principais compostos produzidos pela síntese “*de novo*” destacam-se os ésteres, que estão entre os compostos de aroma mais frequentemente encontrados na natureza. Estes compostos estão associados ao odor agradável de flores e frutos. Os ésteres, também, são compostos de ampla aplicação no setor industrial com destaque na indústria de alimentos, na indústria farmacêutica e cosmética, e na produção de combustíveis e polímeros. O mercado de ésteres foi avaliado em US \$ 55,7 milhões em 2015 e está previsto atingir um valor de US \$ 74,6 milhões até 2020, com um CAGR de 6,0% de 2015 a 2020. Os ésteres podem ser produzidos por partes vegetais, sintetizados através das reações entre um ânion carboxilato e um haleto de alquila, pela reação de esterificação de Fischer ou por microrganismos como leveduras e fungos. Deste modo o objetivo do presente capítulo foi avaliar o potencial de leveduras do gênero *Geotrichum* para produção de compostos de aroma através de síntese “*de novo*” a partir de glicose e frutose, bem como a extração através da técnica *Solid Phase Micro-Extraction* (SPME) e identificação desses compostos voláteis por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS). Foram identificados cerca de 17 compostos voláteis para a linhagem *Geotrichum sp. CCT4500* e 5 compostos voláteis para a linhagem *Geotrichum sp. FC2891*. Os compostos voláteis predominantes pertenceram às classes dos ésteres (14 compostos para a linhagem *Geotrichum sp. CCT4500* e 3 para a linhagem *Geotrichum sp. FC2891*), ácidos (1 para linhagem *Geotrichum sp. CCT4500*), e álcoois (2 compostos para ambas linhagens). Com base nos resultados obtidos, concluímos que as linhagens de *Geotrichum sp. CCT4500* e *FC2891*, podem ser consideradas ótimas produtoras de compostos de aroma através da síntese “*de novo*” demonstrando ainda uma produção de compostos de alto valor industrial e aplicabilidade na área de alimentos, como o 2-Feniletanol e ésteres frutados como o acetato de isoamila (banana), butanoato de etila (abacaxi) e hexanoato de etila (maça/abacaxi).

Palavras-chave: síntese “*de novo*”, compostos voláteis, ésteres, *Geotrichum sp.*, SPME.

2.1 Introdução

Os processos fermentativos onde a produção de compostos de aroma é realizada utilizando-se nutrientes simples, como açúcares, álcoois e outros, sem a adição de substratos especiais, são denominados síntese “*de novo*”. Neste processo, os microrganismos utilizam vias metabólicas complexas, obtendo uma mistura de vários compostos como produto final (BRAGA; GUERREIRO; BELO, 2018; VESPERMANN et al., 2017) dentre os quais podem ser produzidos álcoois, ésteres, ácidos alifáticos, aldeídos, lactonas, cetonas e compostos de enxofre (HOSOGLU; GUNESER; YUCEER, 2018).

Dentre estes, os ésteres estão entre os compostos de aroma mais frequentemente encontrados na natureza. Estes compostos estão associados ao odor agradável exalado por flores e frutos (CALVALCANTE et al., 2015), sendo que a maioria dos ésteres possui características de odor descritas como frutadas (BURDOCK, 1976). Os ésteres, também, são compostos de ampla aplicação no setor industrial com destaque na indústria de alimentos, como aditivos flavorizantes para realçar sabores e aromas, na indústria farmacêutica e cosmética, e na produção de combustíveis e polímeros (OLIVEIRA et al., 2014). O mercado de ésteres foi avaliado em US \$ 55,7 milhões em 2015 e está previsto atingir um valor de US \$ 74,6 milhões até 2020, com um CAGR de 6,0% de 2015 a 2020 segundo o Markets and Markets em 2016.

Os ésteres podem ser obtidos através da extração de plantas, mas o alto custo e o baixo rendimento, torna essa técnica inviável para aplicações industriais (CALVALCANTE et al., 2015; ROMERO et al., 2007). De acordo com GÜVENÇ; KAPUCU; MEHMETOĞLU (2002), a síntese química de ésteres pode ser realizada através da esterificação (reação entre os álcoois e ácidos carboxílicos), da acidólise (troca de grupos acilo entre os ésteres e ácidos), da alcoólise (entre os ésteres e álcoois), da glicerólise (entre os ésteres e glicerol) e transesterificação (entre ésteres). Os produtos de esterificação obtidos por ácidos graxos de cadeia longa e álcoois de cadeia longa são usados como lubrificantes e plastificantes para máquinas de alta precisão, os ésteres resultantes da reação de ácidos graxos de cadeia longa e álcoois de cadeia curta são utilizados como aditivos em alimentos, detergentes, cosméticos e produtos farmacêuticos, enquanto que os produtos de cadeia curta são importantes aromas e fragrâncias empregados como componentes em alimentos, bebidas, produtos cosméticos e farmacêuticos (GUBICZA et al., 2000). Embora os processos biotecnológicos ainda sejam mais caros do que os processos químicos, eles têm vantagens ambientais evidentes e as enzimas podem ser reutilizadas, minimizando a geração de resíduos da reação (ROMERO et al., 2007).

Dentre os microrganismos produtores de aromas e compostos pertencentes a classe dos ésteres, álcoois e ácidos, amplamente aplicados na indústria de alimentos (ALPER; FRENETTE; LABRIE, 2011), destacam-se o gênero *Geotrichum*. Este gênero inclui espécies que podem ser encontradas em vários ambientes, incluindo solos, água, leite e como patógenos em plantas (DAMASCENO et al., 2003; ETSCHMANN et al., 2002; GAMERO et al., 2016; GRONDIN et al., 2017).

Assim sendo, o objetivo do presente capítulo foi avaliar o potencial de leveduras do gênero *Geotrichum* para produção de compostos de aroma através de síntese “*de novo*”, bem como realizar a identificação dos compostos produzidos no processo fermentativo através da extração por SPME (*Solid Phase Micro Extraction*).

2.2 Material e métodos

2.2.1 Microrganismos

Foram utilizadas duas leveduras cedidas pela “Coleção de Culturas Tropical (CCT) - Fundação André Tosello, e “Coleção de Culturas de Fungos Filamentosos (CCFF) - Fundação Oswaldo Cruz”, identificadas como *Geotrichum sp. CCT4500* e *Geotrichum sp. FC2891*, respectivamente.

2.2.2. Caracterização morfológica

Os isolados foram cultivados em Ágar *Yeast Malt Medium* (YM) por aproximadamente 12 horas a 30°C, utilizando técnica de esgotamento em estria composta para obtenção de colônias puras, onde averiguou-se as características fenotípicas de colônias isoladas em triplicata: forma da colônia (circular, irregular e filamentosa), elevação (plana, lente, convexa, pulvinada, umbonada ou umbilicada), aspecto (seca, pouco mucosa ou mucosa), tamanho (mm), coloração, borda (ondulada, lobada, denteada, filamentosa ou inteira), estrutura (lisa, enrugada, papilada ou rugosa) e brilho (transparente, translúcida, opaca ou brilhante) (Neder, 1992).

2.2.3 *Manutenção das linhagens*

As linhagens foram transferidas para placas de Petri contendo *Yeast Malt Medium* (YM, peptona bacteriológica 0,5%; glicose 1%; extrato de levedura 0,3%; ágar 2%; água destilada). As placas foram mantidas por 24 horas a 30 °C em estufa bacteriológica (Thelga, Modelo-TE64CB).

2.2.4 *Cinética de crescimento padrão das linhagens Geotrichum sp.*

As linhagens foram reativadas conforme item 2.2.3. Posteriormente, padronizou-se o inóculo a uma densidade ótica (DO 600nm) de 0,02 UA (Unidades de Absorbância) em espectrofotômetro digital (Tecnal, Modelo-UV5100). Em seguida, o inóculo foi transferido para *Erlenmeyers* de 250 mL contendo 150 mL de *Yeast Malt Medium* (YM, peptona bacteriológica 0,5%; fonte de carbono 3%; extrato de levedura 0,3%; água destilada). O experimento foi conduzido a 30 °C e 150 rpm de agitação em incubadora refrigerada (Tecnal, Modelo-TE-421), por até 72 horas.

A cinética padrão de crescimento das linhagens foi avaliada através da leitura de absorbância a 600 nm, em espectrofotômetro digital (Tecnal, UV5100). Para tal, uma alíquota de 1 mL foi retirada do meio contendo a biomassa, em duplicata, a qual foi centrifugada em micro centrífuga de bancada (Nova Instruments - Modelo NI1802) a 1008 g por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante e então ressuspendendo a biomassa em 1 mL de água destilada. Os resultados foram apresentados em unidades de absorbância (UA).

Realizou-se também a análise das amostras por gravimetria, com a retirada de 3 mL do caldo fermentado (YM), o qual foi centrifugado em centrífuga refrigerada (Nova Técnica, Modelo-NT 825) a 10 °C e rotação de 1372 g, descartando-se o sobrenadante e secando-se a biomassa em estufa bacteriológica a 70°C até peso constante. Os resultados foram expressos em gramas por litro (g/L). Os ensaios foram conduzidos em duplicata.

As concentrações de biomassa C_x (g/L) foram obtidas pela correlação entre a leitura da Densidade Ótica a um comprimento de onda de 600 nm (DO_{600}) de amostras de caldo de cultura e o peso seco referente.

2.2.5 *Testes de fonte de carbono como substrato para a fermentação*

As linhagens de *Geotrichum sp.* foram reativadas conforme descrito no item 2.2.3 Posteriormente, realizou-se fermentação submersa em *Erlenmeyers* de 250 mL, contendo 0,02 UA de biomassa microbiana em 150 mL de *Yeast Malt Medium* (YM, peptona bacteriológica 0,5%; fonte de carbono 3%; extrato de levedura 0,3%; água destilada) variando-se a fonte de carbono (glicose, frutose, sacarose, lactose e maltose). O experimento foi conduzido a 30 °C e 150 rpm de agitação em incubadora refrigerada (Tecnal, Modelo-TE-421), por até 72 horas.

2.2.6 Extração dos compostos voláteis formados

O processo de análise dos compostos voláteis formados foi realizado pela técnica de SPME (*Solid Phase Micro Extraction*) e conduzida no Laboratório de Química de Produtos Naturais do Instituto René Rachou (IRR-FIOCRUZ), em Belo Horizonte. Para a análise, foi escolhida uma fibra de revestimento PDMS/DVB (Polydimethylsiloxane-Divinylbenzene) de 65 µm de espessura de filme e com 10 mm de comprimento (Supelco, Bellefonte, PA, EUA).

As linhagens de *Geotrichum sp.* foram reativadas conforme descrito no item 2.2.3. Posteriormente, padronizou-se o inóculo e seguiu-se com a cinética de produção utilizando *Erlenmeyers* de 250 mL contendo 150 mL de *Yeast Malt Medium* (YM, peptona bacteriológica 0,5%; fonte de carbono 3%; extrato de levedura 0,3%; água destilada) variando-se a fonte de carbono (glicose, frutose). O experimento foi conduzido a 30 °C e 150 rpm de agitação em incubadora refrigerada (Tecnal, Modelo-TE-421), por até 72 horas.

Alíquotas de 2 mL foram retiradas em duplicata a cada 24 horas (0h, 24h, 48h e 72h). A biomassa foi descartada e o sobrenadante foi analisado num frasco com tampa de rosca de 4 mL, equipado com septo PTFE/silicone de tampa de orifício (Supelco, Bellefonte, EUA) ao qual foi adicionado cloreto de sódio (pureza $\geq 99\%$, Sigma Aldrich), até a saturação do meio. Em seguida, a fibra de SPME foi inserida e exposta no frasco, a uma profundidade de 2 cm no espaço de topo do frasco durante 15 min a 50 °C numa placa aquecedora (Pierce Reacti Therm III-Heating Module) para adsorção dos compostos voláteis do *headspace* da amostra. A dessorção dos compostos foi realizada diretamente no cromatógrafo gasosa acoplada a espectrometria de massa CG-MS (SHIMADZU – Modelo-QP5050A). Os resultados estão representados como unidades de área (global), assim como é simbolizado pelo equipamento utilizados para a análise dos compostos.

2.2.7 Identificação dos compostos formados no sistema fermentativo

Os compostos voláteis extraídos por SPME foram analisados por GC-MS (SHIMADZU- Modelo-QP5050A) , equipado com uma coluna capilar de sílica fundida Vocol (60 m \times 0,25 mm \times 1,5 µm; Supelco). Utilizou-se o hélio como gás de arraste, a um fluxo de 2,4 mL/min; a temperatura do injetor foi de 190 °C e a temperatura do detector foi de 250 °C. A temperatura inicial da coluna foi de 35 °C por 4 min, aumentando gradativamente 4 °C por minuto até 100 °C, posteriormente 8 °C até 210 °C onde permaneceu por 3 min. Injeção de pulso *splitless* foi usada a uma temperatura de injetor de 250 °C. Os constituintes voláteis foram identificados por comparação dos espectros de massas obtidos com os registros da biblioteca espectral de massas NIST 2011.

2.2.8 Análise estatística

Os resultados foram tratados por análise de variância (ANOVA), seguida do teste de médias de Tukey, utilizando o software Statística 7.0. Todas as análises foram realizadas considerando um nível de significância de $p \leq 0,05$.

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Caracterização morfológica dos microrganismos

O *Geotrichum sp.* é um gênero de levedura dimórfica, pertencente ao filo *Ascomycota*, classe *Saccharomycetes*, ordem *Saccharomycetales* e família *Dipodascaceae*, que exhibe comumente colônias de coloração creme (ALPER; FRENETTE; LABRIE, 2011), sendo morfológicamente caracterizado pela presença de artroconídios formados em cadeias pela fragmentação aleatória de hifas. O *Geotrichum* é um gênero heterogêneo porque possui dois teleomorfos (*Dipodascus* e *Galactomyces*). O teleomorfo, isto é, em um estágio sexual reprodutivo denominado de *Galactomyces* compreende espécies homotáticas (auto-fértil) e heterotáticas (auto-estéril) (HOOG; SMITH, 2004). O gênero *Geotrichum sp.* é o estágio anamórfico (assexual) da linhagem *Galactomyces geotrichum* (GRYGIER; MYSZKA; RUDZIŃSKA, 2017).

As linhagens de *Geotrichum sp.* CCT4500 e FC, utilizadas nesta pesquisa, apresentaram morfologias similares com algumas diferenças quanto a forma e elevação, como descrito na Tabela 1, mas para distinguir espécies, somente as características fenotípicas não são satisfatórias devido as variações morfológicas do gênero *Geotrichum* que ocorrem entre os isolados da mesma espécie e entre espécies diferentes que possuem morfologia semelhante com ausência de padrões típicos (PAES, 2016), além de algumas espécies de *Geotrichum* possuírem elevado polimorfismo (ALPER; FRENETTE; LABRIE, 2011).

Tabela 1. Caracterização morfológica das Linhagens de *Geotrichum sp.* CCT4500 e FC2891.

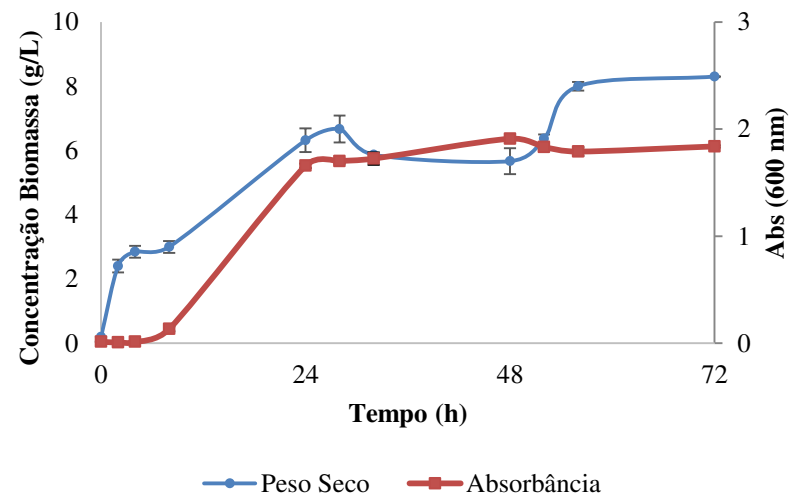
	Tamanho	Forma	Elevação	Bordas	Estrutura	Brilho	Cor	Aspecto
<i>Geotrichum sp. CCT4500</i>	1 mm	Irregular	plana	filamentosa	Rugosa	opaca	branca	seca
<i>Geotrichum sp. FC2891</i>	1 mm	Filamentosa	pulvinada	filamentosa	Rugosa	opaca	branca	seca

(NEDER, 1992)

Buscando conhecer a faixa ótima de temperatura de crescimento das linhagens, realizou-se pré-testes de crescimento dentre as faixas de temperatura de 20 a 40°C (dados não mostrados), onde observou-se que a faixa ótima de crescimento para ambas as linhagens foi de aproximadamente 30°C.

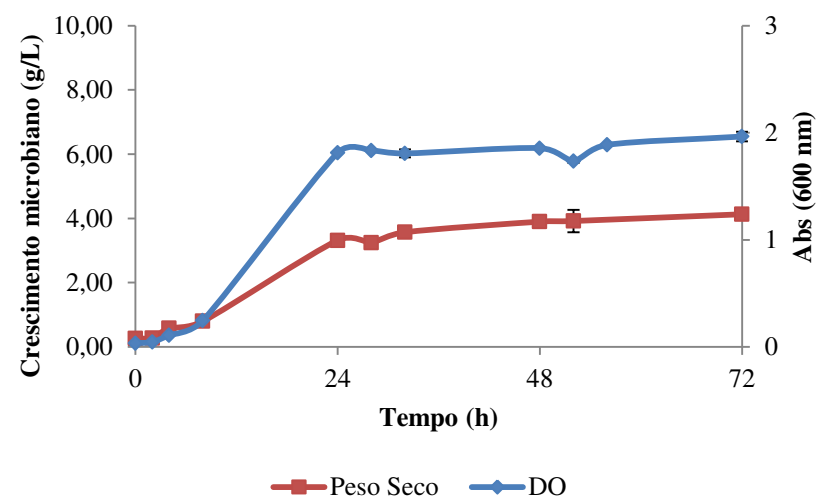
A cinética de crescimento em fermentação submersa das linhagens é demonstrada nas Figuras 1 e 2, onde se pode observar comportamentos de crescimento semelhantes, sendo que ambas linhagens apresentaram início da fase logarítmica no período de 8 horas. A linhagem *Geotrichum sp. CCT4500* (Fig 1) demonstrou um maior crescimento microbiano (8 g/L de células) quando comparada a linhagem *Geotrichum sp. FC2891* (Fig 2) (4,13 g/L de células) no período de 72 horas de processo.

Figura 1. Cinética de crescimento da linhagem *Geotrichum sp.* CCT4500



Legenda: Inoculo em *Yeast Malt Medium* (YM, peptona bacteriológica 0,5%; glicose 3%; extrato de levedura 0,3%; água destilada). O experimento foi conduzido a 30 °C e 150 rpm, por até 72 horas. Observação: Desvios menores que 0,01 não estão demonstrados no gráfico

Figura 2. Cinética de crescimento da linhagem *Geotrichum sp.* FC2891.



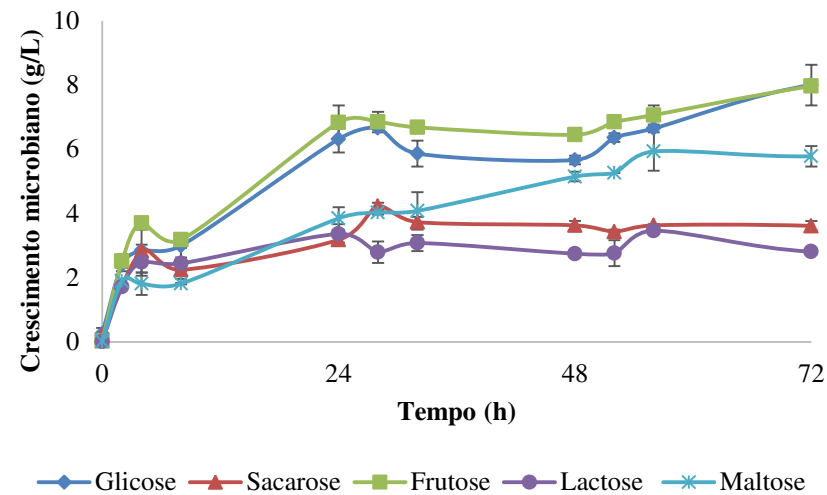
Legenda: Inoculo em *Yeast Malt Medium* (YM, peptona bacteriológica 0,5%; glicose 3%; extrato de levedura 0,3%; água destilada). O experimento foi conduzido a 30 °C e 150 rpm, por até 72 horas. Observação: Desvios menores que 0,01 não estão demonstrados no gráfico.

2.3.2 Testes de fonte de carbono como substrato para a fermentação

A fonte de carbono tem uma forte influência sobre o metabolismo microbiano, sendo assim, a natureza da fonte de carbono empregada em bioprocessos tem papel importante na formação de compostos de aroma (GARAVAGLIA et al., 2007). Desse modo, foram conduzidos testes preliminares para identificar as fonte de carbono de melhor assimilação pelas linhagens de *Geotrichum sp.* CCT e FC, avaliando-se o impacto sobre o crescimento microbiano.

A Figura 3 apresenta o comportamento do crescimento microbiano (em g/L de células) de *Geotrichum sp. CCT4500* utilizando como fontes de carbono: glicose, sacarose, frutose, lactose e maltose, nos tempos de 0 a 72 horas.

Figura 3. Cinética de crescimento do *Geotrichum sp. CCT4500*

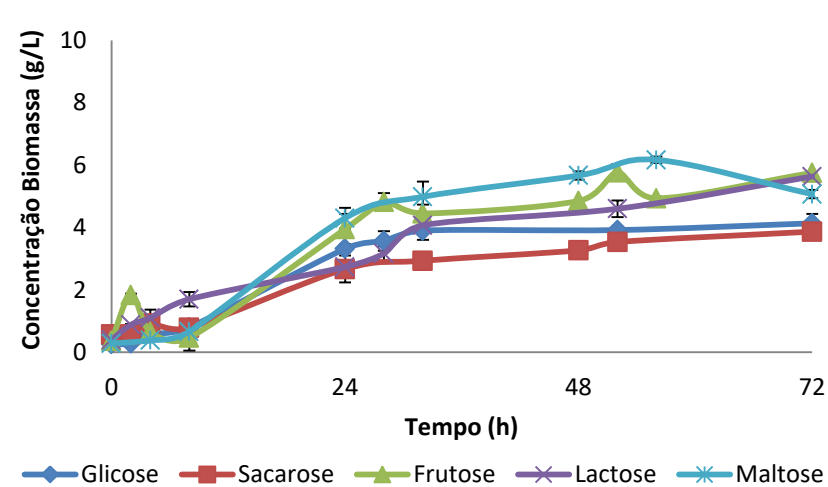


Legenda: Inoculo em *Yeast Malt Medium* (YM, peptona bacteriológica 0,5%; fonte de carbono 3%; extrato de levedura 0,3%; água destilada). Variou-se as fontes de carbono em glicose, frutose, sacarose, lactose e maltose. O experimento foi conduzido a 30 °C e 150 rpm, por até 72 horas. Observação: Desvios menores que 0,01 não estão demonstrados no gráfico.

Pode-se observar que a linhagem *Geotrichum sp. CCT4500* apresentou maior crescimento microbiano para as fontes glicose (8 g/L) e frutose (7,96 g/L) no período de 72 horas (Figura 3). Já entre as demais fontes de carbono utilizadas (sacarose, lactose e maltose) não houve diferença significativa ($p > 0,05$) no crescimento celular.

Enquanto isso, a Figuras 4 apresenta o comportamento do crescimento microbiano (g/L) do *Geotrichum sp. FC2891*, utilizando como fontes de carbono: glicose, sacarose, frutose, lactose e maltose, para o período de 0 a 72 horas.

Figura 4. Cinética de crescimento do *Geotrichum sp. FC2891*



Inoculo em *Yeast Malt Medium* (YM, peptona bacteriológica 0,5%; fonte de carbono 3%; extrato de levedura 0,3%; água destilada). Variou-se as fontes de carbono em glicose, frutose, sacarose, lactose e maltose. O experimento foi conduzido a 30 °C e 150 rpm, por até 72 horas. Observação: Desvios menores que 0,01 não estão demonstrados no gráfico. Observação: Desvios menores que 0,01 não estão demonstrados no gráfico.

A linhagem *Geotrichum sp. FC2891* demonstrou menor crescimento microbiano em relação a linhagem *Geotrichum sp. CCT4500* para as fontes de carbono avaliadas, sendo que as fontes de carbono que apresentaram maior crescimento foram a frutose (5,75 g/L), a lactose (5,63 g/L) e maltose (5,06 g/L), ao nível de 5% de significância, como demonstrado na Figura 4. Foi observado ainda que não houve diferença estatística significativa ($p > 0,5$) entre as demais fontes de carbono avaliadas (glicose e sacarose).

Semelhantemente, Pastore; Park; Min (1994), realizaram um ensaio fermentativo utilizando o *Geotrichum sp.* avaliando três meios distintos, o meio G continha 5% glicose, o meio F continha 5% de frutose e o terceiro meio foi *Yeast Malt Medium* sem ágar. Neste estudo, os autores observaram maior crescimento microbiano para os meios contendo glicose (8 g/L) em comparação aos demais.

Damasceno e colaboradores (2003) realizaram um estudo semelhante, utilizando *Geotrichum fragrans*, que utilizou como fonte de carbono os açúcares redutores (glicose e frutose) presentes nas águas residuais de mandioca, com agitação de 150 rpm a 24 °C, após 12 horas de processo, alcançaram uma produção média de 12,8 g/L de biomassa.

Por fim, no estudo de Grygier; Myszka; Rudzińska (2017), foi demonstrado que *Galactomyces geotrichum* foi capaz de crescer em glicose e galactose. Além disso, nenhum crescimento de *G. geotrichum* foi detectado em maltose, celobiose, melbobiase, rafinose, manitol e eritritol, diferindo assim dos resultados obtidos neste estudo para o crescimento das linhagens *Geotrichum sp. CCT4500* e *FC2891* em meio contendo maltose (5,78 e 5,06 g/L, respectivamente).

Observou-se ainda de forma indireta a formação de compostos de aroma durante a cinética de crescimento a partir de 24 horas de processo para as fontes de carbono glicose e frutose de ambas linhagens de *Geotrichum sp.*, apresentando uma intensidade maior destes compostos para a linhagem *Geotrichum sp. CCT4500* (dados não mostrados). Com base no exposto, prosseguiu-se com testes de produção, bem como extração e identificação desses compostos para as linhagens de *Geotrichum sp. CCT4500* e *FC2891*, utilizando as fontes de carbono glicose e frutose.

2.3.3 Identificação dos compostos de aroma formados no sistema fermentativo

Os compostos de aroma produzidos pelas linhagens *Geotrichum sp. CCT4500* e *FC2891* na presença das fontes de carbono glicose e frutose durante 96 horas de fermentação submersa (conforme descrito no item 2.2.4), extraídos através da técnica de SPME e identificados através do CG-MS, estão demonstrados nos cromatogramas (Figura 5 a 20) presentes no ANEXO A.

Utilizando a frutose como fonte de carbono, foi observada a formação de compostos de aroma a partir de 24 horas (Figura 6- ANEXO A) de fermentação. sendo observado as 48 horas (Figura 7- ANEXO A) a formação de 15 compostos de aroma (Tabela 4), dentre os quais 1 ácido (Ácido Levulínico), 2 álcoois (Álcool isoamílico e 2-Feniletanol) e 12 ésteres (Isobutirato de etila, Acetato de isobutil, Butirato de etilo, Isovalerato de etilo, 1-Butanol, Isobutirato de isobutilo, 2-metil-2-butenato de etilo, Pentanoato de etil, Isobutirato de isopentilo, Hexanoato de etilo, 2-Hexanoato de etila, Isovalerato de isoamilo), com uma redução destes compostos a partir de 72 horas (Figura 8- ANEXO A) de processo, permanecendo apenas 1 éster (2-feniletano) e 2 álcoois (4-metilfenil-4-metilbenzeno e 2-Feniletanol).

Comportamento semelhante foi observado para as amostras na presença da fonte de carbono glicose, onde a partir de 24 horas (Figura 10- ANEXO A) de fermentação foram identificados a formação dos compostos de aroma, sendo observado as 48 horas (Figura 11- ANEXO A) 17 compostos de aroma (Tabela 4), sendo 1 ácido (Ácido levuliníco); 2 Álcoois (Álcool isoamílico e 2-Feniletanol) e 14 ésteres (Propionato de etilo; Isobutirato de etilo, Acetato de isobutil, Butirato de etilo, Isovalerato de etilo, Acetato de isoamilo, Pentanoato de etil, 2-metil-2-butenato de etilo, Propionato de isoamilo, Hexanoato de etilo, Isobutirato de isopentilo, 2-hexenoato de etilo, Isovalerato de isoamilo e Ftalato de bis (2-etilhexilo) com uma redução destes compostos também a partir de 72 horas (Figura 12- ANEXO A) permanecendo apenas 1 ácido (ácido oxálico) 1 éster (éster 2-etilhexil isohexílico) e 1 álcool (2-Feniletanol).

Tabela 4. Compostos de aroma produzidos pela linhagem *Geotrichum sp. CCT4500* na presença das fontes de carbono glicose e frutose.

COMPOSTO	CLASSE	AROMA	APLICAÇÃO	REFERÊNCIA
		Ácido		
Ácido levulínico	Ácido graxo		Agente aromatizante	Pubchem cid=11579
		Álcool		
2-feniletanol	Álcool	Rosa	Agente aromatizante	Pubchem CID=6054
Álcool isoamilico	Álcool	Cacau, floral, malte	Agente aromatizante	Pubchem cid=31260
		Èsteres		
1-butanol	Èster	Banana	Agente aromatizante	NIST
2-hexenoato de etilo	Èster	----	Agente aromatizante	Pubchem CID=5364778
Acetato de isoamilo	Èster	Banana	Agente aromatizante	Pubchem CID=10882
Acetato de isobutil	Èster	Maçã, banana, floral, erva	Aditivo alimentar, fragrâncias	Pubchem CID=8038
Butirato de etilo	Èster	Maçã	Agente aromatizante	Pubchem CID=7945
Ethil hexanoato,	Èster	----	Agente aromatizante	Pubchem CID=519786
Ftalato de bis (2-etilhexilo)	Èster	----	Plastificantes	Pubchem CID=20393
Hexanoato de etilo	Èster	Casca de maçã, abacaxi	Agente aromatizante	Pubchem CID=31265
Isobutirato de etilo	Èster	Frutado	Agente aromatizante	Pubchem CID=7342
Isobutirato de isobutilo	Èster	Frutado	Agente aromatizante	Pubchem CID=7351
Isobutirato de isopentilo	Èster	-----	Agente aromatizante	Pubchem CID=519786
Isovalerato de etilo	Èster	Banana	Agente aromatizante	Pubchem CID=31276
Isovalerato de isoamilo	Èster	Banana	Agente aromatizante	Pubchem CID=12613
Propionato de etilo	Èster	Abacaxi	Agente aromatizante	Pubchem cid=7749
Propionato de isoamilo	Èster	Maçã	Agente aromatizante	Pubchem CID=7772

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database (accessed on Dec. 18, 2019)(KONÉ et al., 2016)

Pode-se observar que a linhagem *Geotrichum sp. CCT4500*, na presença de ambas fontes de carbono (glicose e frutose) apresentaram uma maior formação de compostos de aroma da classe dos ésteres, como propionato de etilo (abacaxi), isobutirato de etilo, acetato de isobutil (maçã/banana/floral/erva), butirato de etila (maçã), acetato de isoamila (banana), butanoato de etila (abacaxi), 1-butanol (banana), isobutirato de isobutilo, pentanoato de etil (maçã), 2-metil-2-butenato de etilo, propionato de isoamilo (maçã), hexanoato de etilo (maçã/abacaxi) e isovalerato de isoamilo (banana).

Os ésteres da classe dos acetatos, em função da natureza hidrofóbica, baixa polaridade e baixo peso molecular como acetatos de metila, etila, e derivados propilas e butilas, são destaque no mercado de solventes e diluentes. Ao contrário dos ácidos carboxílicos, de odor desagradável, alguns ésteres são importantes compostos com aplicações nas áreas de essências e fragrâncias sintéticas. Também possuem aplicações no mercado de polímeros, por exemplo, o acetato de vinila é um importante intermediário da produção de diversos tipos de polímeros nas áreas de tintas (PVA), colas e adesivos e filmes para embalagem de alimentos. Dentre os ésteres, os de baixo peso molecular são de grande interesse para a indústria de alimentos, como compostos de aroma, devido a sua fragrância e sabor característicos (MARTINS et al., 2011; RAJENDRAN; PALANISAMY; THANGAVELU, 2009; ROMERO et al., 2007). Muitos deles são responsáveis por odores de frutas dos alimentos que são constituídos principalmente por ácidos e seus derivados de cadeia curta como acetatos, propionatos e butiratos (MACEDO & PASTORE, 1997).

A utilização dos ésteres na indústria é diversificada, um exemplo disso são os ésteres acetato de etila e butanoato de etila presentes em bebidas destiladas como a cachaça (NASCIMENTO et al., 2009). Entre todos os ésteres empregados pela indústria, o acetato de isoamila tem grande importância comercial, devido ao seu característico sabor de banana (ROMERO et al., 2007) chegando a taxas de produção de 74.000 kg/ano, segundo Güneşer e colaboradores (2015). Os ésteres acetato de etila, butanoato de etila e Hexanoato de etila são componentes voláteis importantes do espectro de sabor de queijo. Em níveis baixos, os ésteres contribuem para os atributos de sabor do queijo, mas altas concentrações podem gerar um sabor frutado em algumas variedades de queijo, como Cheddar (LIU; HOLLAND; CROW, 1998).

Os resultados do presente estudo corroboram com aqueles relatados por Mdaini e colaboradores (2006) utilizando *G. candidum* em meio MOG (30 g/L de glicose, 5 g/L de triptona, 4 g / L de (NH₄)₂SO₄, 0,25 g / L de MgSO₄ 7H₂O e 5 g/L de KH₂PO₄) a 120 rpm e 30 °C, onde dentre os ésteres com propriedades aromatizantes frutados (do tipo abacaxi) que apareceram durante o experimento foram produzidos 9,5 g/L de ácido 2-hexanóico e 1,6 g/L de benzaldeído. Os autores relataram a produção de cerca de 50 mg/kg acetato de etila e 25 mg/kg de butirato de etila após 48 a 72 horas de fermentação. No mesmo trabalho, observou-se ainda a produção de 0,174 g/L de benzaldeído (aroma de amêndoa amarga), 0,044 g/L de 2-metil propan-1-ol e 0,047 g/L de álcool isoamílico (aroma de banana).

Enquanto isso, os experimentos conduzidos por Damasceno e colaboradores (2003), utilizaram uma linhagem de *G. fragrans* isolada de manipueira (composição de açúcar de dextrina (2,6%), maltose (1,4%), sacarose (32,1%), glicose (38,3%) e frutose (25,6%). O valor médio dos açúcares totais foi de 58,2 g/L) na produção de compostos voláteis. Os autores identificaram a formação de 1-butanol, 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol, 1,3-butanediol, feniletanol, acetato de etila, propionato de etila, 2-metil propionato de etila e 2-metil propanoico.

Comparativamente, os resultados desta Dissertação corroboram com os dados publicados por Grondin e colaboradores (2017), que realizaram a análise qualitativa dos compostos voláteis produzidos após 24 horas de crescimento em meio YEPD (contendo 20 g/L de glicose, 20 g/L de peptona, 10 g/L de extrato de levedura e 15 g/L de ágar) por 12 espécies da linhagem *Geotrichum*, dentre as quais a linhagem *G.*

marinum foi uma das melhores produtoras de ésteres e, mais especificamente, ésteres insaturados, com uma produção de 30 compostos de aroma diferentes, dentre os quais destacam-se o butanoato de etilo, 2-enoato de etilo, hexanoato de etilo e etil-hex-2-enoato. Esta linhagem ainda tem a particularidade de produzir ésteres metílicos, como 2-metilbutanoato de metilo e 3-metilbutanoato de metilo.

Em concordância com o presente estudo, Koné e colaboradores (2016) avaliaram o papel das leveduras em converter açúcares de diferentes substratos em álcoois e ácidos orgânicos na fermentação do cacau. A linhagem de *G. geotrichum* produziu 19 compostos de aroma, sendo que sete compostos foram identificados, como acetato de etilo, acetato de isobutilo, acetato de isoamílo, isobutanol, álcool isoamílico, ácido acético e ácido isovalérico, foram relatados como principais responsáveis por notas desejáveis de sabor nos grãos de cacau durante os processos de fermentação e secagem.

A linhagem *Geotrichum sp. FC2891*, na presença de glicose como fonte de carbono, também apresentou a formação de compostos de aroma a partir de 24 horas (figura 14- ANEXO A) de fermentação, sendo observada as 48 horas (Figura 15- ANEXO A) a formação de 3 compostos de aroma (Tabela 5) dentre os quais 2 álcoois (Álcool isoamílico e 2-Feniletanol) e 1 éster (1-Butanol), mantendo a formação destes compostos durante as 72 horas (Figura 16-ANEXO A) de processo. Tal qual observado no presente trabalho, Lu e colaboradores (2016) utilizaram o meio definido contendo glicose, obtendo uma concentração de 75 mg/L de 2-PE, indicando que a cepa WL2002-5 de *C. glycerinogenes* é capaz de produzir 2-PE a partir da síntese “*de novo*”.

Comportamento semelhante foi observado para as amostras utilizando frutose como fonte de carbono com produção de compostos de aroma a partir de 24 horas (Figura 18-ANEXO A) de fermentação, sendo que as 72 horas (Figura 20-ANEXO A) há identificação de 5 compostos de aroma (Tabela 5), dentre os quais 2 Álcoois (Álcool isoamílico e 2-Feniletanol) e 3 Ésteres (1-Butanol, Butanoato de 2-Feniletano e Isovalerato de fenetilo).

O álcool 2-Feniletanol é um álcool líquido, incolor, aromático e volátil. Sua principal característica é o seu aroma de rosa, sendo amplamente aplicado na produção de cosméticos e fragrâncias; na indústria alimentar como agente aromatizante, melhorando o sabor de alimentos, como refrigerantes, doces, sorvetes, pudim, goma de mascar, biscoitos e dentre outros (ČERVENĀNSKÝ; MIHAL; MARKOŠ, 2017; LUO et al., 2017; OKUNIEWSKA et al., 2017a; SHEN et al., 2016; WANG et al., 2017a).

Tabela 5. Compostos aromáticos s produzidos pela linhagem *Geotrichum* sp. FC2891 na presença das fontes de carbono glicose e frutose.

COMPOSTO	CLASSE	AROMA	APLICAÇÃO	REFERENCIA
		Ácido		
Butenona	Ácido	----	Aditivo alimentar	Pubchem CID=6570
		Álcool		
2-Feniletanol	Álcool	Rosa	Agente aromatizante	Pubchem CID=6054
Álcool isoamilico	Álcool	Cacau, floral, malte	Agente aromatizante	Pubchem CID=31260
		Èsteres		
Mono(2-etil-hexil)ftalato	Èster	-	-	Pubchem CID=20393
1-Butanol	Èster	Banana	Agente aromatizante	NIST
Butanoato de 2-feniletilo	Èster	Floral	Agente aromatizante	Pubchem CID=7658
Isovalerato de fenetilo	Èster	Floral, hortelã	Agente aromatizante	Pubchem CID=8792

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. (accessed on Dec. 20,2019)

A linhagem *Geotrichum sp. FC2891* demonstrou um perfil de produção de compostos de aroma diferente do observado para a linhagem *Geotrichum sp. CCT4500* que apresentou uma maior produção de ésteres frutados, enquanto o *Geotrichum sp. FC2891* apresentou perfil floral, devido a produção de compostos como o 2-Feniletanol. Como citado anteriormente (no capítulo 1 deste documento) uma das rotas para a produção de 2-PE é a partir da síntese de novo pela via xikimato, onde açúcares simples podem ser convertidos em 2-PE, onde a Eritrose-4-fosfato a partir do caminho das pentoses-fosfato e o fosfoenolpiruvato da glicólise são respectivamente condensados com o corismato e pefenato, como intermediários que conduzem ao fenilpiruvato e finalmente a 2-PE (ETSCHMANN et al., 2002). A principal desvantagem da síntese de novo na biossíntese de 2-PE 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-PE produzidas por síntese de novo são muito baixas (GOTCHEVA, 2012).

2.4 Conclusão

A partir dos bioprocessos conduzidos, pode-se destacar que a linhagem *Geotrichum sp. CCT4500* demonstrou um maior crescimento microbiano (8 g/L de células) quando comparada a linhagem *Geotrichum sp. FC2891* (4,13 g/L de células) no período de 72 horas de processo. Sendo que as fontes de carbono que apresentaram maior crescimento microbiano para a linhagem *Geotrichum sp. CCT4500* foram a glicose (8,0 g/L) e frutose (7,96 g/L). Enquanto que as fontes de carbono que demonstraram maior crescimento microbiano para a linhagem *Geotrichum sp. FC2891* foram a frutose (5,75 g/L), a lactose (5,63 g/L) e maltose (5,06 g/L).

Ainda foram identificados a produção de compostos de aroma da classe dos ácidos, álcoois e ésteres por ambas linhagens de *Geotrichum*, na presença das fontes de carbono glicose e frutose. Dentre os compostos de aroma produzidos pela linhagem *Geotrichum sp. CCT4500*, destacam-se a classe dos ésteres (hexanoato de etila (abacaxi/maçã), butanoato de etila (abacaxi), acetato de isoamila (banana)). Em contrapartida, a classe de compostos que se destacou pela produção da linhagem *Geotrichum sp. FC2891* foram os álcoois (2-Feniletanol). Compostos esses de grande importância comercial e aplicabilidade na indústria de alimentos, cosmética e farmacêutica.

Sendo assim, conclui-se que as linhagens de *Geotrichum sp. CCT4500* e *FC2891* podem ser consideradas ótimas produtoras de compostos de aroma através da síntese “*de novo*”.

2.5 Referências

- ALPER, I.; FRENETTE, M.; LABRIE, S. Ribosomal DNA polymorphisms in the yeast *Geotrichum candidum*. **Fungal Biology**, v. 115, n. 12, p. 1259–1269, dez. 2011.
- ANGELOV, A. D.; GOTCHEVA, V. BIOSYNTHESIS OF 2-PHENYLETHANOL BY YEAST FERMENTATION. **Food Science, Engineering and Technologies**, p. 490–495, 2012.
- BRAGA, A.; GUERREIRO, C.; BELO, I. Generation of Flavors and Fragrances Through Biotransformation and De Novo Synthesis. **Food and Bioprocess Technology**, v. 11, n. 12, p. 2217–2228, 2018.
- BURDOCK, G. A. Fenaroli's handbook of flavor ingredients. **Food and Cosmetics Toxicology**, v. 14, n. 2, p. 147, jan. 1976.
- ČERVEŇANSKÝ, I.; MIHAL, M.; MARKOŠ, J. Potential application of perfusion and pertraction for in situ product removal in biocatalytic 2-phenylethanol production. **Separation and Purification Technology**, v. 183, p. 11–20, ago. 2017.
- DAMASCENO, S. et al. Production of volatile compounds by *Geotrichum fragrans* using cassava wastewater as substrate. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 4, p. 411–414, 2003.
- ETSCHMANN, M. M. W. et al. Biotechnological production of 2-phenylethanol. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 59, n. 1, p. 1–8, 1 jun. 2002.
- GAMERO, A. et al. High-throughput screening of a large collection of non-conventional yeasts reveals their potential for aroma formation in food fermentation. **Food Microbiology**, v. 60, p. 147–159, 2016.
- GARAVAGLIA, J. et al. 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.
- GRONDIN, E. et al. Flavour production by *Saprochaete* and *Geotrichum* yeasts and their close relatives. **Food Chemistry**, v. 237, p. 677–684, 2017.
- GRYGIER, A.; MYSZKA, K.; RUDZIŃSKA, M. *Galactomyces geotrichum*. n. 2015, p. 1360, 2017.
- GUBICZA, L. et al. Large-scale enzymatic production of natural flavour esters in organic solvent with continuous water removal. **Journal of Biotechnology**, v. 84, n. 2, p. 193–196, nov. 2000.
- GÜNEŞER, O. et al. Bioflavour production from tomato and pepper pomaces by *Kluyveromyces marxianus* and *Debaryomyces hansenii*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 6, p. 1143–1155, 23 jun. 2015.
- GÜVENÇ, A.; KAPUCU, N.; MEHMETOĞLU, Ü. The production of isoamyl acetate using immobilized lipases in a solvent-free system. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 3, p. 379–386, nov. 2002.
- HOOG, G. S.; SMITH, M. T. Ribosomal gene phylogeny and species delimitation in *Geotrichum* and its teleomorphs. **Studies in Mycology**, n. 50, p. 489–515, 2004.
- HOSOGLU, M. I.; GUNESER, O.; YUCEER, Y. K. **on Production of Bioflavor Compounds**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018.
- KONÉ, M. K. et al. Contribution of predominant yeasts to the occurrence of aroma compounds during cocoa bean fermentation. **Food**

Research International, v. 89, p. 910–917, 2016.

LIU, S.; HOLLAND, R.; CROW, V. L. Ethyl Butanoate Formation by Dairy Lactic Acid Bacteria. v. 6946, n. 98, p. 651–657, 1998.

LUO, C. et al. Cosynthesis of L-homophenylalanine and 2-phenylethanol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing aspartate aminotransferase from *Escherichia coli* BL21(DE3). **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 123, n. 1, p. 1–7, jan. 2017.

MACEDO, GABRIELA A. & PASTORE, GLÁUCIA, M. Lipases Microbianas na Produção de Ésteres Formadores de Aroma. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17, p. 115–119, 1997.

MAJCHER, M. A. et al. Identification of key odorants of fried cottage cheese and contribution of *Galactomyces geotrichum* MK017 to the formation of 2-phenylethanol and related rose-like aroma compounds. **International Dairy Journal**, v. 39, n. 2, p. 324–329, 2014.

MARTINS, A. B. et al. Rapid and high yields of synthesis of butyl acetate catalyzed by Novozym 435: Reaction optimization by response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 12, p. 2311–2316, 2011.

MDAINI, N. et al. Production of Natural Fruity Aroma by *Geotrichum candidum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 128, n. 3, p. 227–236, 2006.

MORAES CALVALCANTE, P. M. et al. Proposta de preparação e caracterização de ésteres: um experimento de análise orgânica na graduação. **Educación Química**, v. 26, n. 4, p. 319–329, out. 2015.

NASCIMENTO, E. S. P. et al. Artigo. v. 32, n. 9, p. 2323–2327, 2009.

OKUNIEWSKA, P. et al. Recovery of 2-phenylethanol from aqueous solutions of biosynthesis using ionic liquids. **Separation and Purification Technology**, 2017.

OLIVEIRA, C. A. et al. Synthesis of fruity flavor esters: An experiment for undergraduate courses within one of the principles of green chemistry. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 1, p. 152–167, 2014.

PAES, S. A. Diversidade Genética de Isolados de *Geotrichum* spp . Associados a Podridões Pós-colheita em Frutas e Hortaliças no Brasil. 2016.

PASTORE, G. M.; PARK, Y. K.; MIN, D. B. Production of fruity aroma by *Neurospora* from beiju. **Mycological Research**, v. 98, n. 11, p. 1300–1302, 1994.

RAJENDRAN, A.; PALANISAMY, A.; THANGAVELU, V. BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY Lipase Catalyzed Ester Synthesis for Food Processing Industries. **Arch. Biol. Technol.** v, v. 52, n. 1, p. 207–219, 2009.

ROMERO, M. D. et al. A kinetic study of isoamyl acetate synthesis by immobilized lipase-catalyzed acetylation in n -hexane. v. 127, p. 269–277, 2007.

SHEN, L. et al. Overexpressing enzymes of the Ehrlich pathway and deleting genes of the competing pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for increasing 2-phenylethanol production from glucose. **Journal of bioscience and bioengineering**, 2016.

VESPERMANN, K. A. C. et al. Biotransformation of α - and β -pinene into flavor compounds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 5, p. 1805–1817, 20 mar. 2017.

WANG, P. et al. Cofactor self-sufficient whole-cell biocatalysts for the production of 2-phenylethanol. **Metabolic Engineering**, 2017.

ZHANG, H. et al. De-novo synthesis of 2-phenylethanol by *Enterobacter* sp. CGMCC 5087. **BMC Biotechnology**, v. 14, 2014.

CAPÍTULO 3 - PRODUÇÃO DE 2-FENILETANOL A PARTIR DA BIOCONVERSÃO DE L-FENILALANINA POR LINHAGEM DE *GEOTRICHUM sp.*

RESUMO

A biotecnologia desempenha um importante papel no mercado global com a comercialização de produtos de origem microbiana sendo que, no ano de 2014, foi avaliado em US\$ 143,5 bilhões. Para o período de 2015-2020, esse mesmo mercado tem uma taxa de crescimento projetada em 14,6% ao ano, com cifras de comercialização avaliadas em US\$ 306 bilhões. No setor de ingredientes para alimentos e bebidas, os aromatizantes são empregados buscando melhorar o perfil sensorial e agregar valor ao produto, podendo ser rotulados como “naturais”, no caso de compostos de origem microbiana/enzimática ou extração direta da natureza; “idênticos ao natural”, no caso de serem sintetizados quimicamente mas apresentarem estrutura química idêntica a um composto encontrado na natureza; ou “artificial”, no caso de moléculas sintetizados quimicamente e não encontradas na natureza. O processo de biotransformação permite a acumulação significativamente aumentada do produto desejado, sendo que o precursor deve estar presente na natureza e ser facilmente isolado em quantidade suficiente da fonte natural de uma forma economicamente viável. Um dos álcoois aromáticos mais relevantes obtidos através da biotransformação é o 2-PE, um álcool aromático com uma fragrância de rosa amplamente aplicado em diversos tipos de produtos, como perfumes, cosméticos, produtos farmacêuticos, alimentos e bebidas. A rota biotecnológica usada através da via de Ehrlich para obter 2-PE por bioconversão de L-fenilalanina (L-PHE), como única fonte de nitrogênio, é uma das maneiras mais simples de produção do álcool. Desta forma o objetivo do presente trabalho foi a bioconversão de L-PHE em 2-PE utilizando linhagens de *Geotrichum sp.*, bem como a otimização do processo buscando o aumento da produção. A linhagem *Geotrichum sp. FC2891* demonstrou ter maior capacidade de bioconversão e produção de 2-PE em comparação a linhagem *Geotrichum sp. CCT4500*, com produção 5,06 g/L e 4,13 g/L de 2-PE, respectivamente. Ainda após o planejamento experimental, a produção de 2-PE atingiu 7,04 g/L utilizando a linhagem *Geotrichum sp. FC2891* nas condições otimizadas (meio YM contendo 6 g/L de L-PHE, 50 g/L de glicose, 36 °C e 200 rpm) valor este maior que o ótimo relatado na literatura até o momento através da bioconversão de L-PHE. Com base nos resultados obtidos concluímos que as linhagens de *Geotrichum sp. CCT4500* e *FC 2891* demonstraram ser capazes de realizar a bioconversão de L-PHE em 2-PE, sendo que a linhagem *Geotrichum sp. FC2891* demonstrou uma melhor produção deste composto.

Palavras-chave: via de Ehrlich, bioconversão, álcool aromático, *Geotrichum*.

3.1 Introdução

Atualmente, a biotecnologia desempenha um importante papel no mercado global com a comercialização de produtos de origem microbiana sendo que, no ano de 2014, foi avaliado em US\$ 143,5 bilhões. Para o período de 2015-2020, esse mesmo mercado tem uma taxa de crescimento projetada em 14,6% ao ano, com cifras de comercialização avaliadas em US\$ 306 bilhões. Adicionalmente, fomentado pela recente e vívida discussão a respeito dos benefícios de uma alimentação mais natural, dos alimentos funcionais e nutracêuticos, a biotecnologia tem

desempenhado um forte protagonismo na indústria de alimentos, representado majoritariamente pelos bioaditivos alimentares. No setor de ingredientes para alimentos e bebidas, os aromatizantes são empregados buscando melhorar o perfil sensorial e agregar valor ao produto, podendo ser rotulados como “naturais”, no caso de compostos de origem microbiana/enzimática ou extração direta da natureza; “idênticos ao natural”, no caso de serem sintetizados quimicamente mas apresentarem estrutura química idêntica a um composto encontrado na natureza; ou “artificial”, no caso de moléculas sintetizados quimicamente e não encontradas na natureza (FELIPE; BICAS, 2016)

As desvantagens da produção química, em relação à qualidade do produto, saúde e questões ambientais, além da incapacidade da produção natural em grande escala na indústria, associada a necessidade de produção de aromas por meio de processos de baixo custo e ambientalmente amigáveis, tornam a produção biotecnológica uma alternativa mais viável, já que as bioconversões / biotransformações podem ser mais baratas e mais ecológicas (BRAGA; GUERREIRO; BELO, 2018)

Na biotransformação, o microrganismo é induzido a seguir uma via metabólica específica através da adição de precursores, sendo que a catálise entre substrato e produto ocorre em uma única etapa, e o produto se assemelha ao substrato. Já a bioconversão pode ocorrer em duas ou mais reações químicas, em ambos os casos, o processo pode ser conduzido enzimaticamente ou com a utilização dos microrganismos (BICAS et al., 2010). Ademais, o processo de biotransformação permite a acumulação significativamente aumentada do produto desejado, sendo que o precursor deve estar presente na natureza e ser facilmente isolado em quantidade suficiente da fonte natural de uma forma economicamente viável (BIER et al., 2016; KRINGS; BERGER, 1998; MARÓSTICA; PASTORE, 2007; MOLINA, 2014).

No processo de biotransformação é possível a obtenção de inúmeros compostos, dentre os quais a classe dos álcoois, são compostos produzidos pelo metabolismo normal dos microrganismos como resultado do catabolismo de aminoácidos, dentre os quais 2-butanol, 1,2-butanodiol e 2-feniletanol (2-PE), possuem propriedades organolépticas únicas e são importantes compostos aromatizantes na indústria de alimentos (BRAGA; GUERREIRO; BELO, 2018). Um dos álcoois aromáticos mais relevantes é o 2-PE, um álcool aromático com uma fragrância de rosa (BURDOCK, 1976) amplamente aplicado em diversos tipos de produtos, como perfumes, cosméticos, produtos farmacêuticos (HUA; XU, 2011), alimentos e bebidas (ČERVENĀNSKÝ; MIHAL; MARKOŠ, 2017; LUO et al., 2017; OKUNIEWSKA et al., 2017a; STARK et al., 2002). A importância econômica de 2-PE é bastante significativa; o mercado global foi estimado em aproximadamente 10000 toneladas em 2010, sendo que 7000 toneladas são obtidas por síntese química a partir de benzeno ou estireno, isso devido ao baixo custo de produção e alto rendimento (US\$ 5/kg) (CHREPTOWICZ et al., 2016; KIM; LEE; OH, 2014; LU et al., 2016) em comparação a extração natural (US\$ 1000/kg) (LU et al., 2016).

De fato, os microrganismos são capazes de produzir 2-PE e outros álcoois pelo catabolismo de aminoácidos. A rota biotecnológica usada através da via de Ehrlich para obter 2-PE por bioconversão de L-fenilalanina (L-PHE), como única fonte de nitrogênio, é uma das maneiras mais simples de produção do álcool (ETSCHMANN et al., 2002). Desta forma o objetivo do presente capítulo foi a bioconversão de L-PHE em 2-PE utilizando linhagens de *Geotrichum sp.*, bem como a otimização do processo buscando o aumento da produção.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Microrganismos

Foram utilizadas duas leveduras cedidas pela “Coleção de Culturas Tropical (CCT) - Fundação André Tosello, e “Coleção de Culturas de Fungos Filamentosos (CCFF) - Fundação Oswaldo Cruz”, identificadas como *Geotrichum sp. CCT4500* e *Geotrichum sp. FC2891*, respectivamente.

3.2.2 Manutenção das linhagens

As linhagens foram transferidas para placas de Petri contendo *Yeast Malt Medium* (YM, peptona bacteriológica 0,5%; glicose 1%; extrato de levedura 0,3%; ágar 2%; água destilada) e as placas foram mantidas por 24 horas a 30 °C em estufa bacteriológica (Thelga, Modelo-TE64CB).

3.2.3 Reagentes e substratos

O substrato utilizado no ensaio de bioconversão foi a L-PHE (Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$ de pureza). O padrão utilizado para confirmação dos produtos foi o 2-PE (Sigma-Aldrich, 99% de pureza).

3.2.4 Testes de fonte de carbono e influência da L-PHE na produção de 2-PE

As linhagens de *Geotrichum sp.* foram reativadas conforme descrito no item 3.2.2. Posteriormente, padronizou-se o inóculo a uma densidade ótica (DO 600 nm) de 0,02 UA (Unidades de Absorbância). Em seguida, o inóculo foi transferido para *Erlenmeyers* de 250 mL contendo 150 mL de *Yeast Malt Medium* (YM, peptona bacteriológica 0,5%; fonte de carbono 3%; extrato de levedura 0,3%; água destilada) variando-se a fonte de carbono (glicose e frutose) com e sem a presença de L-PHE 1%. O experimento foi conduzido a 30 °C e 150 rpm de agitação em incubadora refrigerada, por até 96 horas, em duplicata.

3.2.5 Identificação e quantificação da L-PHE e do 2-PE

A concentração de 2-PE e L-PHE no caldo foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (Agilent Technologies 1260 Infinity), equipado com uma coluna de fase reversa ZORBAX Eclipse Plus C18 (4,6 x 100 mm, 3,5 μm) foi utilizado um detector UV/VIS SPD-10 A (Shimadzu, Japão), no comprimento de onda de 250 nm. As curvas de calibração foram realizadas com diferentes concentrações dos padrões comerciais de L-PHE e 2-PE (Sigma-Aldrich). A fase móvel foi composta por uma solução de metanol (100%, Honeywell Riedel-de Haen TM) e água (60/40, v/v) foram bombeados isocriticamente num fluxo de 0,8 mL/min. A coluna foi mantido à temperatura de 30 °C. Acidificou-se a água com 0,1%, de TFA (Ácido trifluoroacético, > 99% Sigma-Aldrich). A solução da fase móvel foi filtrada previamente com membranas de 0,45 μm (Analítica). O tempo de retenção da L-PHE é de 2 minutos enquanto do 2-PE é de 3 minutos.

Antes da análise, uma alíquota de 1 mL foi retirada do meio contendo a biomassa, em duplicata, a qual foi centrifugada em microcentrífuga de bancada (Marca Nova Instruments-Modelo NI1802) a 1008 g por 10 minutos. A biomassa foi descartada e o sobrenadante foi filtrado com filtro de membrana de politetrafluoretileno (PTFE) hidrofílico de 0,45 μm e 13 mm de diâmetro (Analítica). As amostras foram injetadas (alça de injeção de 20 μL) diretamente no injetor. As concentrações de L-PHE e 2-PE foram calculadas e expressas em g/L.

3.2.6. Planejamento experimental para otimização do bioprocesso

Foram realizados dois planejamentos experimentais independentes utilizando a linhagem *Geotrichum sp. FC2891*, um com objetivo de avaliar o efeito das variáveis de meio, utilizando concentração de glicose (x_1) e concentração de L-PHE (x_2), mantendo as condições de processo padrão para esta linhagem (segundo pré-testes não apresentados) 150 rpm e 30 °C. E o outro visando analisar o efeito das variáveis de processo, variando temperatura (x_1) e agitação (x_2), na produção de 2-PE (Y), utilizando as condições ótimas de meio obtidas no planejamento anterior. Ambos planejamentos foram realizados durante 96 horas de processo, com 2 variáveis cada, portanto, foi feito um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2 de segunda ordem para as duas variáveis independentes. Assim sendo, foram obtidos 12 experimentos: 4 ensaios na combinação das variáveis em seus diferentes níveis, 4 ensaios no ponto central e 4 ensaios com os pontos axiais ou estrela ($+\alpha$ e $-\alpha$), o valor de α foi de 1,41. Os valores reais e codificados das variáveis independentes encontram-se na TABELA 1 e 2

TABELA 1: Valores reais e codificados das variáveis independentes e seus diferentes níveis utilizados para a otimização da concentração do meio para produção de 2-PE.

Variáveis independentes	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
[] glicose	1%	1,6%	3%	4,4%	5%
[] L-PHE	0%	0,09%	0,3%	0,51%	0,6%

TABELA 2: Valores reais e codificados das variáveis independentes e seus diferentes níveis utilizados para a otimização das condições de processo para produção de 2-PE.

Variáveis independentes	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
T (°C)	24	26	30	34	36
Agitação (rpm)	50	80	150	220	250

A análise dos resultados obtidos nos diferentes ensaios foi realizada com o auxílio do programa Statistica 7.0. Para a validação do modelo, foi utilizada a Tabela de Análise da Variância (ANOVA), através cálculo do valor de F (teste de Fisher), comparando-se o valor de F dos dados experimentais com o valor tabelado. A resposta para as duas variáveis foi a produção de 2-feniletanol, tomando-se os dados após 96 horas de cultivo. A análise dos dados foi realizada a um nível de significância de 95%.

A variância dos dados experimentais do modelo foi dada pelo coeficiente de correlação, R^2 . A validação experimental dos modelos propostos para produção de 2-PE foi realizada em quintuplicata, nas melhores condições de glicose, L-PHE, agitação e temperatura estabelecidas.

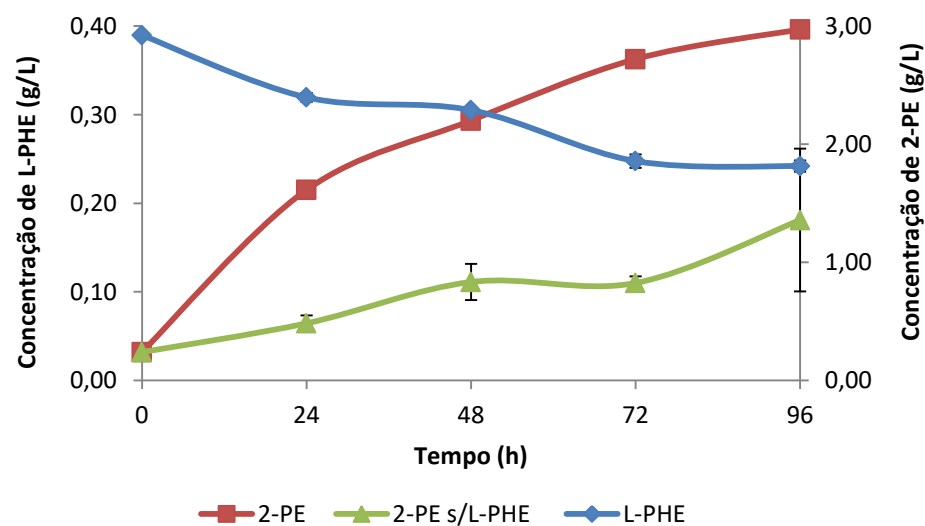
3.3 Resultados e discurso

3.3.1 Testes de fonte de carbono e influência da L-PHE na produção de 2-PE

Buscando conhecer as melhores condições de produção de 2-PE, foram realizados testes com as fontes de carbono glicose e frutose, fontes estas que demonstraram maior crescimento microbiano e produção de 2-PE através da síntese “*de novo*” para as linhagens de *Geotrichum sp.* CCT4500 e FC2891 (dados apresentados no capítulo 2), bem como a influência da L-PHE na produção deste álcool, dados apresentados nas Figuras 1 a 4.

Na Figura 1 os dados apresentados demonstraram que a linhagem *Geotrichum sp.* CCT4500 cultivada em *Yeast Malt Medium*, com frutose como fonte de carbono sem a presença de L-PHE produziu 0,18 g/L de 2-PE, enquanto que ao adicionar a L-PHE houve um aumento da produção de 2-PE para 0,40 g/L.

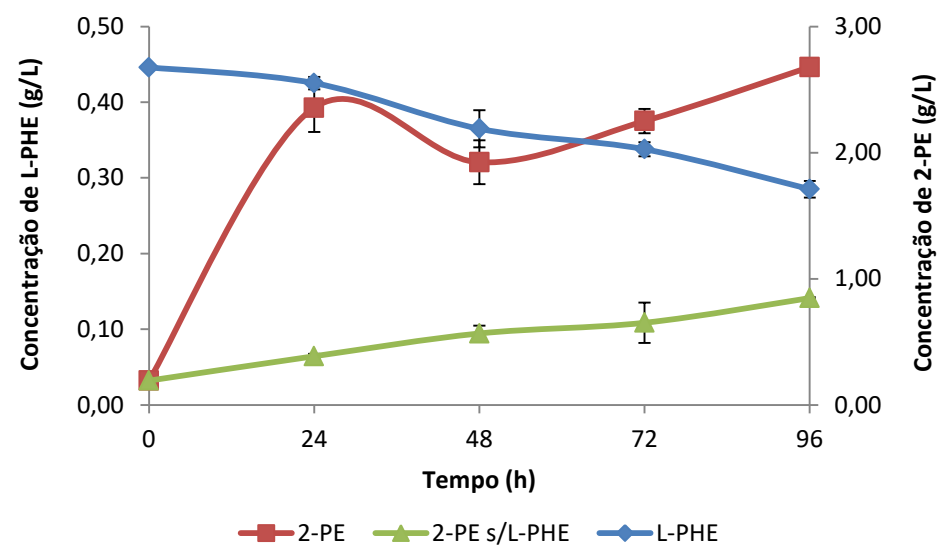
Figura.1. Produção de 2-PE e consumo de L-PHE pelo *Geotrichum sp.* CCT4500 utilizando frutose como fonte de carbono



Legenda: *Yeast Malt Medium* (peptona bacteriológica 0,5%; frutose 3%; extrato de levedura 0,3%; água destilada, com e sem a presença de L-PHE 1%). O experimento foi conduzido a 30 °C e 150 rpm, por até 96 horas. Observação: Desvios menores que 0,01 não estão demonstrados no gráfico.

Na Figura 2 pode-se observar que a linhagem *Geotrichum sp. CCT4500* cultivada em *Yeast Malt Medium*, com glicose como fonte de carbono sem a presença de L-PHE produziu 0,14 g/L de 2-PE, enquanto que ao adicionar a L-PHE houve um aumento da produção de 2-PE para 0,45 g/L, valores estes próximos aos encontrados utilizando como fonte de carbono a frutose (Fig.1), sem e com a presença de L-PHE (0,18 g/L e 0,40 g/L, respectivamente)

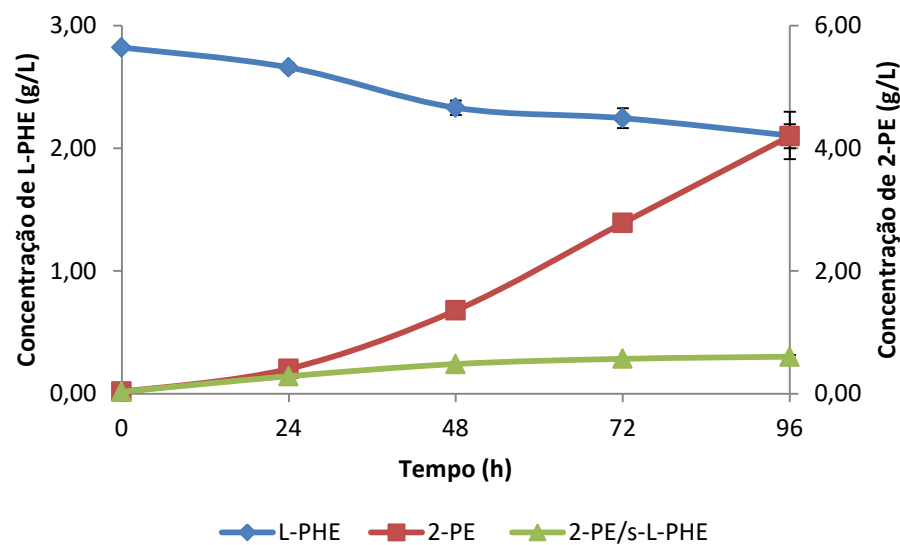
Figura.2. Produção de 2-PE e consumo de L-PHE pelo *Geotrichum sp. CCT4500* utilizando glicose como fonte de carbono



Legenda: *Yeast Malt Medium* (YM, peptona bacteriológica 0,5%; glicose 3%; extrato de levedura 0,3%; água destilada, com e sem a presença de L-PHE 1%). O experimento foi conduzido a 30 °C e 150 rpm, por até 96 horas. Observação: Desvios menores que 0,01 não estão demonstrados no gráfico.

Com base na Figura 3 onde a linhagem *Geotrichum sp. FC2891* cultivada em *Yeast Malt Medium*, com frutose como fonte de carbono sem a presença de L-PHE produziu 0,60 g/L de 2-PE, enquanto que ao adicionar a L-PHE houve um aumento da produção de 2-PE para 4,20g/L.

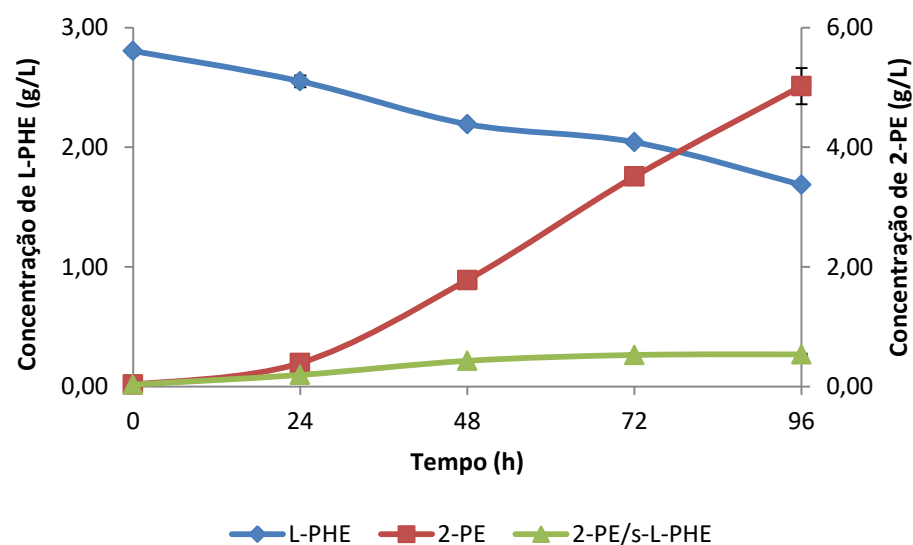
Figura.3. Produção de 2-PE e consumo de L-PHE pelo *Geotrichum sp. FC2891* utilizando frutose como fonte de carbono



Legenda: *Yeast Malt Medium* (YM, peptona bacteriológica 0,5%; frutose 3%; extrato de levedura 0,3%; água destilada, com e sem a presença de L-PHE 1%). O experimento foi conduzido a 30 °C e 150 rpm, por até 96 horas. Observação: Desvios menores que 0,01 não estão demonstrados no gráfico.

Na Figura 4 a linhagem *Geotrichum sp. FC2891* cultivada em *Yeast Malt Medium*, com glicose como fonte de carbono sem a presença de L-PHE produziu 0,54 g/L de 2-PE, enquanto que ao adicionar a L-PHE houve um aumento da produção de 2-PE para 5,02 g/L, valores estes superiores aos encontrados utilizando como fonte de carbono a frutose (Fig. 3), sem e com a presença da L-PHE (0,60 g/L e 4,20 g/L, respectivamente).

Figura.4. Produção de 2-PE e consumo de L-PHE pelo *Geotrichum sp. FC2891* utilizando frutose como fonte de carbono



Legenda: *Yeast Malt Medium* (peptona bacteriológica 0,5%; frutose 3%; extrato de levedura 0,3%; água destilada, com e sem a presença de L-PHE 1%). O experimento foi conduzido a 30 °C e 150 rpm, por até 96 horas. Observação: Desvios menores que 0,01 não estão demonstrados no gráfico.

Deste modo, pode-se observar que a linhagem *Geotrichum sp. FC2891* na presença de L-PHE demonstrou melhores resultados de produção de 2-PE para as fontes de carbono glicose (5,02 g/L) (Fig. 3) e frutose (4,20 g/L) (Fig. 4) em comparação com os experimentos sem a presença de L-PHE (glicose: 0,54 g/L e frutose: 0,60 g/L). Ademais, esta linhagem ainda demonstrou uma produção maior de 2-PE que a linhagem *Geotrichum sp. CCT4500* na presença de L-PHE (glicose: 0,45 g/L (Fig. 2) e frutose: 0,40 g/L (Fig. 1)) e sem adição de L-PHE (glicose: 0,14 g/L e frutose: 0,18 g/L). Esta menor produção de 2-PE sem a presença de L-PHE, pode acontecer em decorrência do desvio da rota de produção para rota de crescimento microbiano, já que a glicólise e a via das pentoses-fosfato são utilizadas, principalmente, para o crescimento celular, razão pela qual as quantidades relatadas de 2-PE produzidas por síntese de novo são baixas (GOTCHEVA, 2012).

Dados semelhantes foram relatados por Lu et al. (2016) que utilizaram o meio definido com a presença de glicose sem L-PHE (YNB era a única fonte de nitrogênio), eles obtiveram uma concentração de 75 mg/L de 2-PE, indicando que a cepa WL2002-5 de *C. glycerinogenes* é capaz de realizar síntese “de novo”.

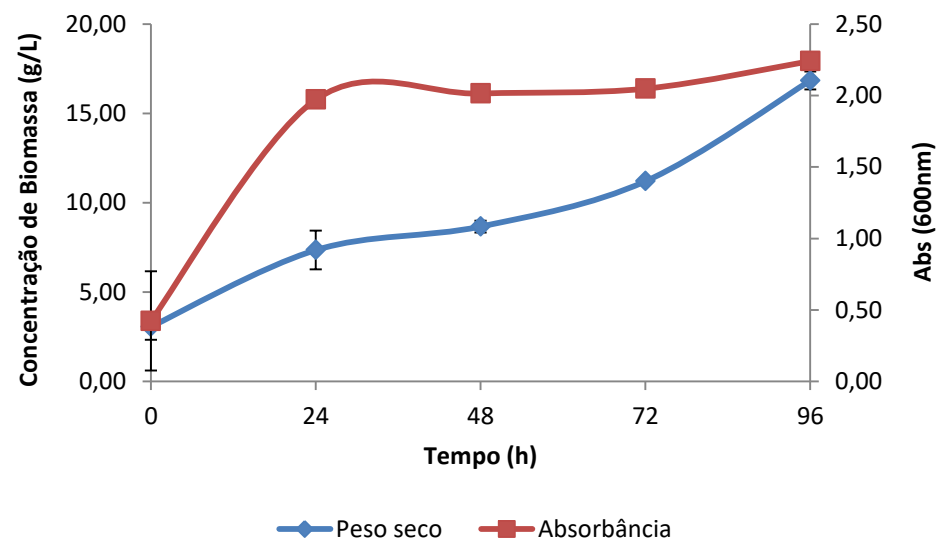
Gasnier (1987) relatou que a glicose pode atravessar a membrana celular através de dois transportadores funcionalmente distintos, sendo um transportador de glicose de alta afinidade que é o simporte glicose-próton e outro de baixa afinidade, no qual a atividade não está associada ao movimento do próton. No caso da frutose, ela é transportada pelo sistema de baixa afinidade que é também utilizado pela glicose quando presente no meio, o que justifica o maior crescimento microbiano bem como produção de 2-PE quando na presença de glicose como fonte de carbono.

Diante disso, deu-se sequência aos experimentos de produção de 2-PE, utilizando a linhagem *Geotrichum sp. FC2891* na presença de glicose como fonte de carbono com adição de L-PHE.

3.3.2 Consumo de L-PHE e produção de 2-PE

A via biotecnológica mais eficiente para obter 2-PE é através da bioconversão de L-PHE pela via de Ehrlich (Etschmann et al. 2002). No entanto, esta bioconversão foi associada ao crescimento microbiano, segundo Wittmann; Hans; Bluemke (2002) a levedura *K. marxianus* assimila a glicose como fonte de energia, a qual é direcionada tanto para a produção de biomassa como para a biossíntese de 2-PE. Contudo, 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 horas, 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-PE na fase estacionária, portanto, a biossíntese de 2-PE é parcialmente associada ao crescimento da levedura. Semelhantemente observou-se que o crescimento microbiano da linhagem de *Geotrichum sp. FC2891* atinge sua fase log as 24 horas de processo (Figura 5), apresentando um máximo de 16,83 g/L de biomassa, coincidindo com início da produção de 2-PE (Figura 6).

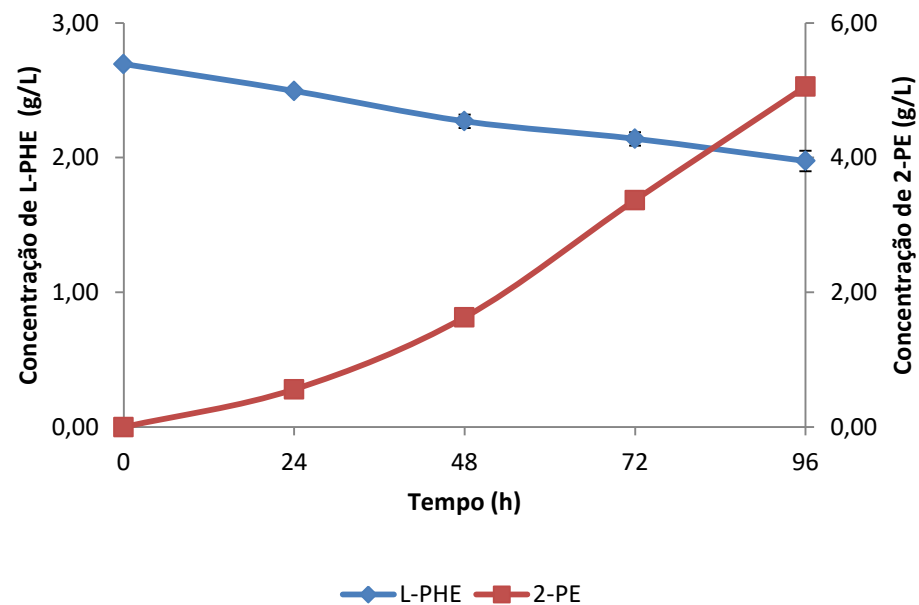
Figura5. Curva de crescimento da levedura *Geotrichum sp. FC2891* em *Yeast Malt Medium* na presença de L-PHE e glicose



Legenda: *Yeast Malt Medium* (YM, peptona bacteriológica 0,5%; glicose 3%; extrato de levedura 0,3%; água destilada, L-PHE 1%). Durante 96 horas. Observação: Desvios menores que 0,01 não estão demonstrados no gráfico.

A bioconversão de L-PHE em 2-PE pode ser influenciada pela quantidade de precursor que está disponível para a célula. Desde o início do cultivo a L-PHE é consumida gradativamente pela célula, coincidindo com o aumento gradual da formação de 2-PE (Figura 6) ao final de 96 horas de processo, com uma concentração residual de 1,98 g/L de L-PHE e um pico de produção de 5,06 g/L de 2-PE, sendo este valor maior que o ótimo (3,40 g/L) relatado por Fabre, Blanc, Goma (1998) utilizando 2 g/L de L-PHE, onde cerca de 50 % do precursor é rapidamente consumido em 24 horas.

Figura.6. Produção de 2-PE e consumo de L-PHE pela levedura *Geotrichum sp. FC2891* utilizando glicose como fonte de carbono



Legenda: *Yeast Malt Medium* (YM, peptona bacteriológica 0,5%; glicose 3%; extrato de levedura 0,3%; água destilada, L-PHE 1%). Durante 96 horas.

Observação: Desvios menores que 0,01 não estão demonstrados no gráfico.

De acordo com a Figura 6, houve um aumento gradativo da produção do 2-PE até 96 horas de fermentação, atingindo uma produção de 5,06 g/L. Contudo o efeito inibitório do produto é observado em fermentações submersas entre faixas de concentrações de 2,0 g/L a 4,0 g/L reprimindo o crescimento de algumas espécies de bactérias, fungos e levedura (ČERVENĀNSKÝ; MIHAL; MARKOŠ, 2017; ESHKOL et al., 2009; LUO et al., 2017; MIHAL et al., 2012; STARK et al., 2002; WANG et al., 2017b). Portanto o valor encontrado neste estudo está acima do máximo considerado inibitório ao crescimento das leveduras.

A taxa de crescimento de *S. cerevisiae* diminui em 75% quando uma concentração de 2,5 g/L de 2-PE está presente no meio (HUA; XU, 2011). Segundo Garavaglia e colaboradores (2007) o rendimento de 2-PE, até 48 horas (0,30 g/g) de cultivo manteve-se elevado diminuindo com o passar do tempo até o fim do cultivo (120 horas- 0,09 g/g), atribuindo essa diminuição do rendimento ao efeito inibitório do 2-PE acumulados no meio. Portanto, as concentrações de 2-PE obtidas nos processos biotecnológicos são geralmente abaixo de 4,0 g/L. Para melhorar a produção são utilizadas técnicas, que incluem mutagênese das células ou tentativa de isolamento de cepas resistentes para atingir um rendimento considerável na produção de 2-PE, bem como técnicas de extração ISPR (*In Situ Product Removal*) (HUA; XU, 2011).

A produção de 2-PE alcançada nesse estudo (5,06 g/L) através da bioconversão de L-PHE ainda foi superior a encontrada por Kim, Lee e Oh (2014a) que utilizaram a linhagem *Kluyveromyces marxianus* geneticamente modificada, onde obtiveram cerca de 1,0 g/L de 2-PE a partir de glicose. Um nível similar de 2-PE também foi produzido a partir de *K. marxianus* geneticamente modificada produzindo 1,3 g/L de 2-PE a partir de 20 g/L de glicose sem adição de fenilalanina no meio. CELÍNSKA et al. (2013) também relataram a capacidade de *Y. lipolytica* NCYC 3825 para produzir 2-PE a partir de L-PHE bioconversão atingindo 1,98 g/L.

Em sequência foram realizados dois planejamentos experimentais independentes utilizando a linhagem *Geotrichum sp. FC2891*, avaliando o efeito das variáveis condições de meio e de processo na produção de 2-PE.

3.3.4 Planejamento Experimental para otimização do bioprocesso

O planejamento experimental visa auxiliar na fabricação de produtos melhorados, na diminuição do seu tempo de desenvolvimento, aumentar a produtividade dos processos e minimizar a influência de fatores externos (MADAMBA, 2002). Trata-se de uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. A metodologia de superfície de resposta é utilizada para diminuir a quantidade de experimentos, porém é necessária para avaliar múltiplos parâmetros e suas interações (LEE; YUSOF, 2006). A otimização de um processo pode ser definida como a melhor condição onde a combinação das diferentes variáveis gera melhores rendimentos em produtos (ELIBOL; TANYILDIZI; DURSUN, 2005).

A otimização do processo pode aumentar a produtividade e minimizar a sensibilidade às variações das condições de processos, já que durante um processo de fermentação, as variáveis interagem e influenciam cada efeito na resposta (ELIBOL; TANYILDIZI; DURSUN, 2005). Levando-se em consideração que a produção de 2-PE é fortemente influenciada pelo meio de cultura (ETSCHMANN; SELL;

SCHRADER, 2004) e condições de cultivo da levedura utilizada (FABRE; BLANC; GOMA, 1998), (ELIBOL; TANYILDIZI; DURSUN, 2005), optou-se pela divisão do planejamento experimental em concentração do meio (Tabela 3) e condições de processo (Tabela 4), gerando 12 experimentos para cada planejamento experimental, sendo 4 ensaios na combinação das variáveis em seus diferentes níveis, 4 ensaios no ponto central e 4 ensaios com os pontos axiais.

3.3.4.1 Planejamento experimental para otimização das condições de meio

No planejamento fatorial para otimização das condições de meio (Tabela 3), variou-se as condições entre $-1,41$ e $+1,41$, para L-PHE (0 e 6 g/L) e glicose (10 e 50 g/L), mantendo as condições de processo padrão para esta linhagem (segundo pré-testes não apresentados) em 150 rpm e 30 °C.

Tabela 3. Planejamento fatorial completo utilizado para a otimização da concentração do meio para produção de 2-PE.

Experimento	Valores codificados		Valores Reais		
	glicose $x1$	L-PHE $x2$	glicose (g/L) $X1$	L-PHE (g/L) $X2$	2-PE (g/L)
1	-1	-1	16	0,93	2,96
2	1	-1	44	0,93	4,71
3	-1	1	16	5	6,25
4	1	1	44	5	6,55
5	-1,41	0	10	3	3,37
6	1,41	0	50	3	6,42
7	0	-1,41	30	0	0,58
8	0	1,41	30	6	6,30
9	0	0	30	3	5,31
10	0	0	30	3	5,13
11	0	0	30	3	5,35
12	0	0	30	3	4,96

O valor de F é utilizado para verificar se o modelo estatístico é significativo, além disso, através do teste F é possível verificar a relevância estatística dos fatores experimentais no valor das respostas. O teste F consiste em verificar se há uma relação entre as variáveis independentes e a resposta, ou variável dependente (Barros et al., 1995). O valor de R^2 é muito importante para determinar se o modelo pode ser ou não considerado significativo. O valor de R^2 para ter um bom ajuste no modelo, considerado ótimo para ensaios biológicos, como maior que 0,80 (SIN et al., 2006).

A TABELA 4 mostra a análise da variância (ANOVA) referente as condições de meio, onde o valor de F foi de 9,91, o que indica que o valor é 2 vezes maior que o valor de F tabelado, por isso, o modelo é considerado significativo. O p-valor foi menor que 0,1 o que confirma que o modelo foi ajustado. O valor de R^2 para o modelo proposto foi de 0,89, indicando que há uma boa reprodutibilidade e o modelo é significativo, sugerindo que uma alta proporção de variabilidade foi explicada pelo modelo estatístico

Tabela 4: Análise da variância (ANOVA) para o modelo de regressão das concentrações de meio

ANOVA							
Fonte de Variação	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F cal	F tab	Fcal/Ftab	p-valor
Regressão	30,31	5	6,06	9,91	4,39	2,26	0,007
Resíduos	3,67	6	0,61				
Falta de ajuste	3,57238	3	1,19				
Erro puro	0,09648	3	0,03				
Total	33,97649	11					
*R^2	0,892017867						

* Nível de significância de 95%.

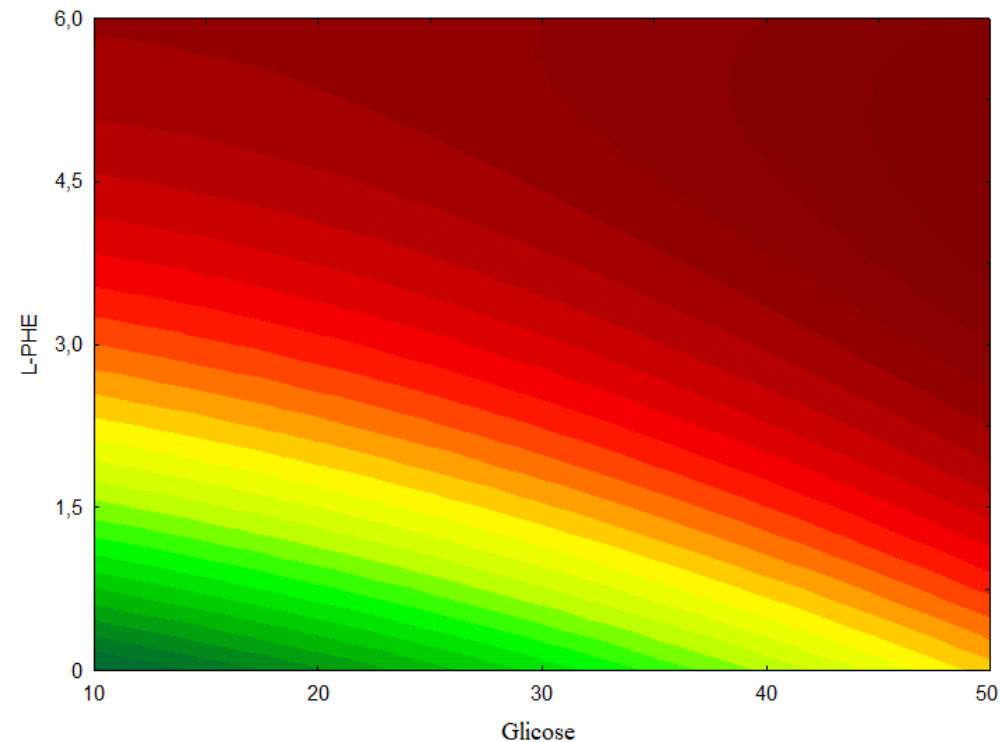
A quantidade de L-PHE no meio influencia fortemente a quantidade de 2-PE produzida FABRE; BLANC; GOMA (1998), no presente estudo, observou-se que o efeito das concentrações de L-PHE e glicose (Tabela 5) na forma linear foram considerados significativos na produção de 2-PE, demonstrando que as duas variáveis desempenham um papel importante na taxa de produção de 2-PE e ambas podem ser limitantes para a produção de 2-PE, enquanto os efeitos quadráticos da concentração de L-PHE e glicose não foram considerados significativos pelo modelo a 95% de significância.

Tabela 5: Coeficientes estimados para o modelo estatístico das concentrações de meio

Variáveis independentes	Coeficientes de regressão (β)	t (6)	Valor de P
(1) Glicose (L)	0,796	2,875	0,028222
Glicose (Q)	0,094	0,305	0,770472
(2) L-PHE (L)	1,654	5,974	0,000986
L-PHE (Q)	-0,637	-2,052	0,085936
1 L by 2 L	-0,3625	-0,927	0,389623

Os coeficientes de regressão (Tabela 5) foram utilizados para gerar as curvas de contorno para as concentrações de meio, avaliando a influência da concentração de L-PHE e glicose (Figura 7).

Figura 7. Curva de contorno para o efeito da concentração de glicose e L-PHE na produção de 2-PE por *Geotrichum sp. FC2891* em meio YM.



Analisando a Figura 7, nota-se que utilizando o maior valor de glicose (50g/L) e L-PHE (6g/L), obtém-se a região ótima de produção de 2-PE, atingindo 6,92 g/L.

Oliveira e colaboradores (2015) avaliaram a produção de 2-PE por *S. cerevisiae* em resíduo líquido de fecularia (água residuária da indústria de fécula de mandioca), os autores realizaram uma otimização variando as concentrações das fontes de carbono (glicose e frutose) e L-PHE no meio, na qual a maior concentração de 2-PE de 1,33 g/L foi obtida com a suplementação do meio com 20,0 g/L de glicose e 5,5 g/L de L-PHE, contendo 50 mL de meio de resíduo de fecularia, em agitador regulado a 150 rpm e $24 \pm 1^\circ\text{C}$.

Para a validação do modelo foi realizada mediante a comparação dos resultados experimentais obtidos pela superfície de resposta. Desta forma, o valor predito pelo modelo foi de 6,40 g/L de 2-PE, num nível de confiança de 95%. Experimentalmente, obteve-se o valor de 6,92 g/L de 2-PE, confirmando a aproximação dos resultados experimentais e do modelo estatístico, com um desvio relativo de 7,52%, validando assim o modelo proposto.

3.3.4.2 Planejamento experimental para otimização das condições de processo

No planejamento fatorial para otimização das condições de processo (Tabela 6), variou-se as condições entre $-1,41$ e $+1,41$, para temperatura (24 e 36 °C) e agitação (50 e 250 rpm), para as condições de meio foram utilizadas 50 g/L de glicose e 6 g/L de L-PHE (valores validados no planejamento fatorial do tópico anterior).

Tabela 6: Planejamento fatorial completo utilizado para a otimização das condições de processo para produção de 2-PE.

Experimento	Valores Codificados		Valores Reais		2- PE (g/L)
	T (°C)	Agitação (rpm)	T (°C)	Agitação (rpm)	
	$x1$	$x2$	$X1$	$X2$	
1	-1	-1	26	80	0,9
2	1	-1	34	80	1,7
3	-1	1	26	220	3,58
4	1	1	34	220	5,26
5	-1,41	0	24	150	2,51
6	1,41	0	36	150	8,05
7	0	-1,41	30	50	0,63
8	0	1,41	30	250	4,97
9	0	0	30	150	4,87
10	0	0	30	150	4,82
11	0	0	30	150	6,39
12	0	0	30	150	4,63

A TABELA 7 mostra a análise da variância (ANOVA) referente as condições de processo, onde o valor de F foi de 13,83, o que indica que o valor é 3 vezes maior que o valor de F tabelado, por isso, o modelo é considerado significativo. O p-valor foi menor que 0,1 o que confirma que o modelo foi ajustado. O valor de R^2 para o modelo proposto foi de 0,83, indicando que há uma boa reprodutibilidade e o modelo é significativo, sugerindo que uma alta proporção de variabilidade foi explicada pelo modelo estatístico

Tabela 7: Análise da variância (ANOVA) para o modelo de regressão cultivo das condições de processo

ANOVA							
Fonte de Variação	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F cal	F tab	Fcal/Ftab	p-valor
Regressão	46,21	3	15,40	13,83	4,07	3,40	0,002
Resíduos	8,91	8	1,11				
Falta de ajuste	6,91726	5	1,38				
Erro puro	1,99228	3	0,66				
Total	55,11469	11					
*R²	0,83834551						

* Nível de significância de 95%.

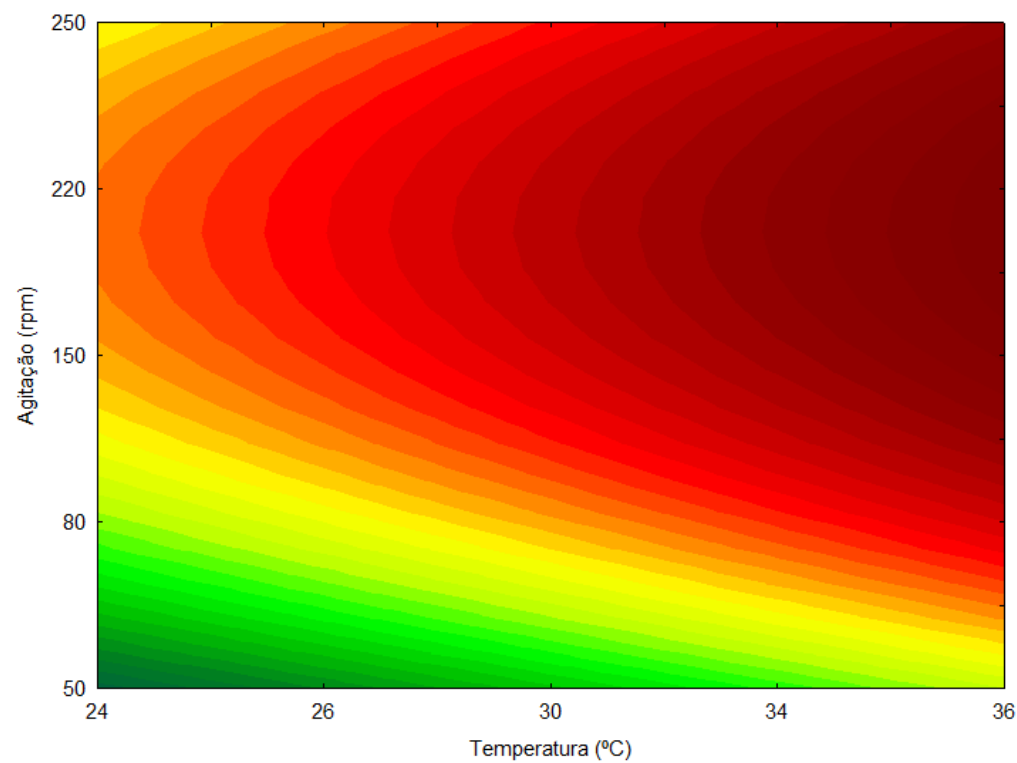
De acordo com os coeficientes de regressão para as condições de processo (Tabela 8), observou-se que para a variável agitação o efeito linear e quadrático foram significativos, enquanto para temperatura somente os efeitos lineares foram significativos na produção de 2-PE, segundo modelo a 95% de significância. Portanto, as duas variáveis desempenham um papel importante na taxa de produção de 2-PE e ambas podem ser limitantes para a produção de 2-PE.

Tabela 8: Coeficientes estimados para o modelo estatístico das condições de processo

Variáveis independentes	Coeficientes de regressão (β)	t (6)	Valor de P
(1) Temperatura (L)	1,290	0,288	4,471
Temperatura (Q)	-0,245	0,323	-0,758
(2) Agitação (L)	1,549	0,288	5,370
Agitação (Q)	-1,492	0,323	-4,614
1 L by 2 L	0,220	0,407	0,539

Os coeficientes de regressão (Tabela 8) foram utilizados para gerar as curvas de contorno para as condições de processo, onde foram avaliadas a influência da agitação e temperatura (Figura 8).

Figura 8: Curva de contorno para o efeito da temperatura e agitação na produção de 2-PE por *Geotrichum sp. FC2891* em meio YM



Analisando a Figura 8, nota-se que utilizando o maior valor de temperatura (36 °C) e 220 rpm de agitação, obtém-se a região ótima de produção de 2-PE, atingindo 7,04 g/L.

Lu e colaboradores (2016) que observaram a temperatura ideal para a biossíntese de 2-PE foi de 30 °C atingindo 3,6 g/L deste álcool, a partir da linhagem *C. glycerinogene* WL2002-5. O título de 2-PE diminuiu significativamente com o aumento da temperatura (acima de 37 °C) e o crescimento celular foi completamente reprimido na faixa de 47 °C onde foram detectados 1,5 g/L de 2-PE .

Huang; Lee; Chou (2000b) afirmam que a porcentagem de consumo de L-PHE diminui quando a concentração inicial do precursor no meio é aumentada. Porém, a quantidade total de L-PHE nunca é completamente convertida em 2-PE, observaram que a maior produção de 2-PE (515,2 mg/L) foi obtida na faixa de temperatura de 30-35 ° C, enquanto uma menor produção de 2-PE (88,7 mg/L) foi observada em 40 °C. Verificou-se que a produção de 2-PE aumentava à medida que a velocidade de agitação aumentava, a produção de 2-PE (524,4 mg/L) a 250 rpm, era 10 vezes maior que o rendimento obtido em uma cultura estática. Assim, a temperatura ideal, o pH e a velocidade de agitação para a produção de 2-PE por *P. fermentans* L-5 foram 30-35 °C, pH 8,5 e 250 rpm, respectivamente, com um rendimento máximo de 515,2 mg/L de 2-PE.

Para a produção de 2-PE, Garavaglia e colaboradores (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-1 de 2-PE nas condições ótimas de 37 °C, concentração de 3,0 g/L de L-PHE, pH 7,0, sob aeração de 1 vvm e agitação de 250 rpm por *K. marxianus* CBS 6556.

A validação do modelo foi realizada mediante a comparação dos resultados experimentais obtidos da superfície de resposta. Foram utilizadas as seguintes condições: 6,0 g/L de L-PHE, 50 g/L de glicose, temperatura de 36 °C e agitação de 200 rpm, os quais foram considerados os valores ótimos para o modelo sugerido. Desta forma, o valor predito pelo modelo foi de 7,17 g/L de 2-PE, num nível de confiança de 95%. Experimentalmente, obteve-se o valor de 7,04 g/L de 2-PE, confirmando a aproximação dos resultados experimentais e do modelo estatístico, com um desvio relativo de -1,85%, validando assim o modelo proposto.

3.4 Conclusão

As linhagens de *Geotrichum sp.* CCT4500 e FC289 demonstraram ser capazes de realizar a bioconversão de L-PHE em 2-PE, utilizando meio YM (*Yeast Malt Medium*) na presença das fontes de carbono glicose e frutose. Sendo que a linhagem *Geotrichum sp.* FC2891 demonstrou uma maior produção deste composto em comparação a linhagem *Geotrichum sp.* CCT4500, com produção 5,06 g/L e 4,13 g/L de 2-PE, respectivamente.

O planejamento experimental realizado para otimização das condições de meio utilizando a linhagem *Geotrichum sp.* FC2891, demonstrou que utilizando 6g/L de L-PHE e 50 g/L de glicose, houve um aumento da produção de 2-PE, atingindo 6,92 g/L. Quando utilizou-se estas variáveis de meio para a otimização das condições de processo, observou-se que a 36 °C e 200 rpm, atingia-se 7,04 g/L de 2-PE, valor este maior que o ótimo relatado na literatura até o momento através da bioconversão de L-PHE, sendo ainda superior alguns estudos que utilizaram extração *In Situ* ou engenharia metabólica. Sendo assim, a linhagem de *Geotrichum sp.* FC2891 demonstrou ser resistente a altas concentrações deste álcool no meio, bem como uma excelente produtora do mesmo.

Como perspectivas futuras, visa-se elevar a produção de 2-PE, para tal fim é importante buscar alternativas econômicas, como a utilização de meios de cultivo e fontes de carbono não convencionais (resíduos), visando reduzir os custos de produção, bem como o uso de técnicas de extração que sejam economicamente e ambientalmente viáveis.

3.5 Referências

- BICAS, J. L. et al. Integrated process for co-production of alkaline lipase and R-(+)- α -terpineol by *Fusarium oxysporum*. **Food Chemistry**, v. 120, n. 2, p. 452–456, maio 2010.
- BIER, J. et al. Biotransformation of limonene by an endophytic fungus using synthetic and orange residue-based media. v. 1, 2016.
- BRAGA, A.; GUERREIRO, C.; BELO, I. Generation of Flavors and Fragrances Through Biotransformation and De Novo Synthesis. **Food and Bioprocess Technology**, v. 11, n. 12, p. 2217–2228, 2018.
- BURDOCK, G. A. Fenaroli's handbook of flavor ingredients. **Food and Cosmetics Toxicology**, v. 14, n. 2, p. 147, jan. 1976.
- CELÍŃSKA, E. et al. *Yarrowia lipolytica*: The novel and promising 2-phenylethanol producer. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 3–4, p. 389–392, 2013.
- ČERVEŇANSKÝ, I.; MIHAL, M.; MARKOŠ, J. Potential application of perfusion and pertraction for in situ product removal in biocatalytic 2-phenylethanol production. **Separation and Purification Technology**, v. 183, p. 11–20, ago. 2017.
- CHREPTOWICZ, K. et al. Production of natural 2-phenylethanol: From biotransformation to purified product. **Food and Bioprocess Technology**, v. 100, p. 275–281, 2016.
- ELIBOL, M.; TANYILDIZI, M. S.; DURSUN, O. Optimization of α -amylase production by *Bacillus* sp. using response surface methodology. v. 40, p. 2291–2296, 2005.
- ESHKOL, N. et al. 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. M. W. et al. Biotechnological production of 2-phenylethanol. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 59, n. 1, p. 1–8, 1 jun. 2002.
- 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.; BLANC, P. J.; GOMA, G. Production of 2-phenylethyl alcohol by *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology Progress**, v. 14, n. 2, p. 270–274, 1998.
- FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. O Mercado de Bioaditivos para a Indústria de Alimentos. **Revista Processos Químicos**, p. 25–38, 2016.
- GARAVAGLIA, J. et al. 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.
- HUA, D.; XU, P. Recent advances in biotechnological production of 2-phenylethanol. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 654–660, 2011.
- HUANG, C. J. R.; LEE, S. L.; CHOU, C. C. Production and Molar Yield of 2-Phenylethanol by *Pichia fermentans* L-5 as Affected by Some Medium Components. v. 90, n. 2, p. 142–147, 2000.
- KANG, Z. et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of 2-phenylethanol from renewable glucose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 4, p. 2012–2021, 2014.
- KIM, B.; CHO, B. R.; HAHN, J. S. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of 2-phenylethanol via Ehrlich pathway. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, n. 1, p. 115–124, 2014.
- 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, 1 jul. 2014.
- KRINGS, U.; BERGER, R. G. Biotechnological production of α -flavours and fragrances. p. 1–8, 1998.
- LEE, W. C.; YUSOF, S. Optimizing conditions for enzymatic clarification of banana juice using response surface methodology (RSM). v. 73, p. 55–63, 2006.
- LIMA, L. A. DE et al. Screening of Yeasts Isolated from Brazilian Environments for the 2-Phenylethanol (2-PE) Production. v. 332, p. 326–332, 2018.

LU, X. et al. 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.

LUO, C. et al. Cosynthesis of L-homophenylalanine and 2-phenylethanol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing aspartate aminotransferase from *Escherichia coli* BL21(DE3). **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 123, n. 1, p. 1–7, jan. 2017.

MADAMBA, P. S. The Response Surface Methodology : An Application to Optimize Dehydration Operations of Selected Agricultural Crops. v. 592, p. 584–592, 2002.

MARÓSTICA, M. R.; PASTORE, G. M. **Biotransformação de limoneno: Uma revisão das principais rotas metabólicas** *Quimica Nova*, 2007.

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, 2009.

MIHAL, M. et al. Intensification of 2-phenylethanol production in fed-batch hybrid bioreactor: Biotransformations and simulations. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 57–58, p. 75–85, 2012.

MOLINA, G. **Biotechnological production of aroma compounds by the biotransformation of terpenes**. [s.l.] UNICAMP, 2014.

OKUNIEWSKA, P. et al. Recovery of 2-phenylethanol from aqueous solutions of biosynthesis using ionic liquids. **Separation and Purification Technology**, 2017.

OLIVEIRA, S. M. M. et al. Production of natural aroma by yeast in wastewater of cassava starch industry. **Engenharia Agrícola**, v. 35, n. 4, p. 721–732, ago. 2015.

SHEN, L. et al. Overexpressing enzymes of the Ehrlich pathway and deleting genes of the competing pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for increasing 2-phenylethanol production from glucose. **Journal of bioscience and bioengineering**, 2016.

SIN, H. N. et al. Optimization of hot water extraction for saptodilla juice using response surface methodology. v. 74, p. 352–358, 2006.

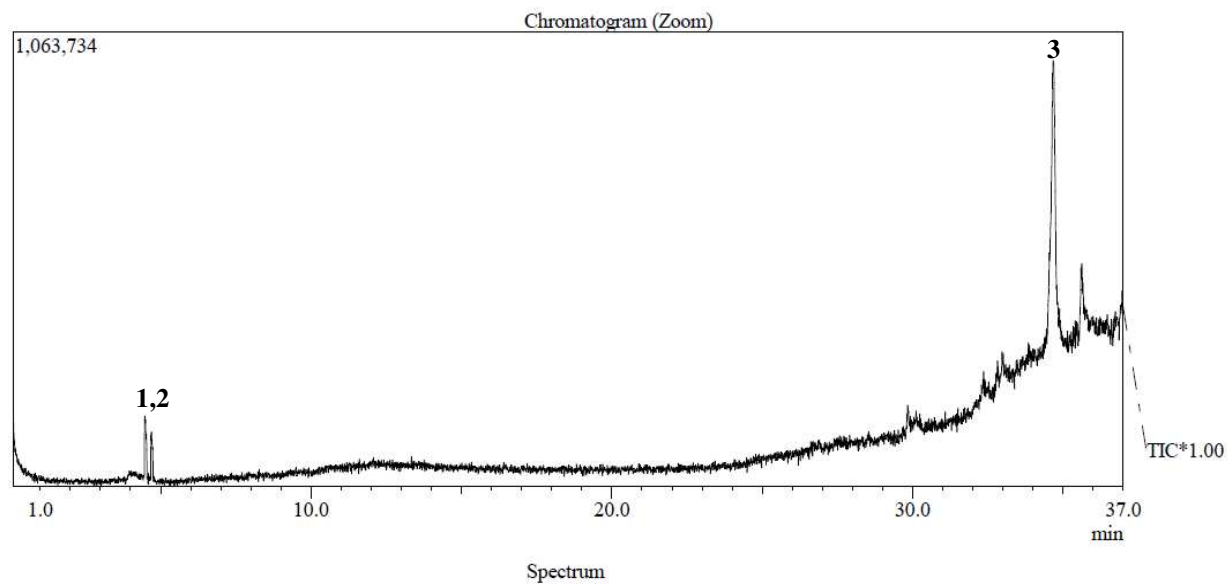
STARK, D. et al. Extractive Bioconversion of 2 Phenylethanol from L Phenylalanine by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Prog.**, v. 18, p. 514–523, 2002.

WANG, Z. et al. Regulation of crucial enzymes and transcription factors on 2-phenylethanol biosynthesis via Ehrlich pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 44, n. 1, p. 129–139, 21 jan. 2017.

WITTMANN, C.; HANS, M.; BLUEMKE, W. Metabolic physiology of aroma-producing *Kluyveromyces marxianus*. **Yeast**, v. 19, n. 15, p. 1351–1363, 2002.

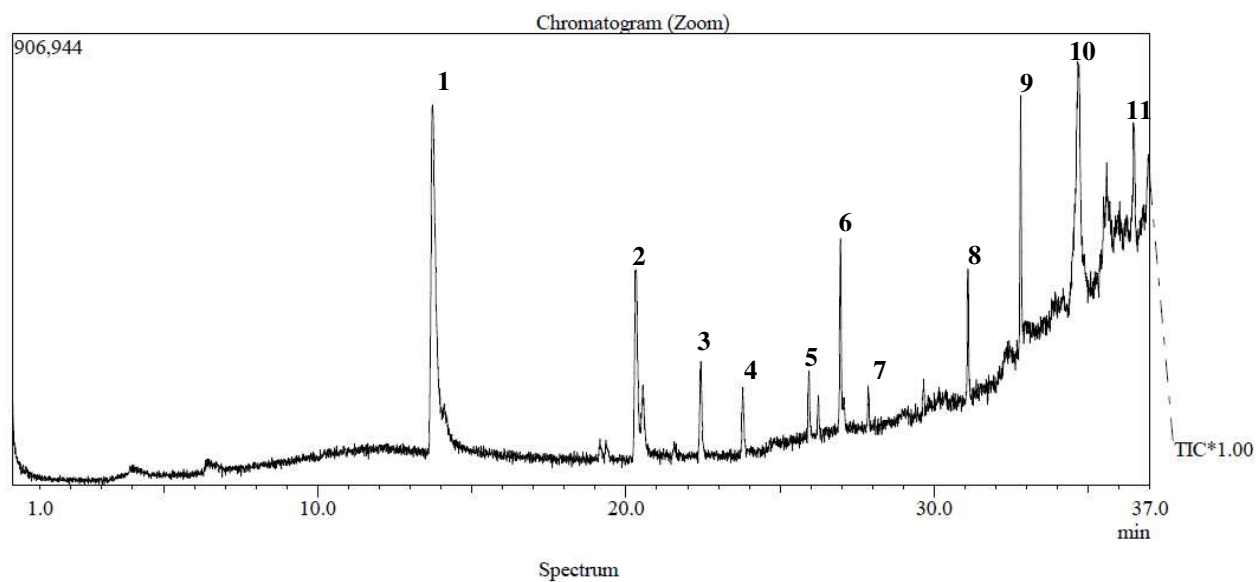
ANEXO A- CROMATOGRAMAS REFERENTE AS FERMENTAÇÃO DAS LINHAGENS DE *GEOTRICHUM SP.* UTILIZANDO AS FONTES DE CARBONO GLIGOSE E FRUTOSE.

Figura 5. Cromatograma da amostra as 0 horas de processo utilizando a linhagem *Geotrichum sp.* CCT na presença de Frutose como única fonte de carbono.



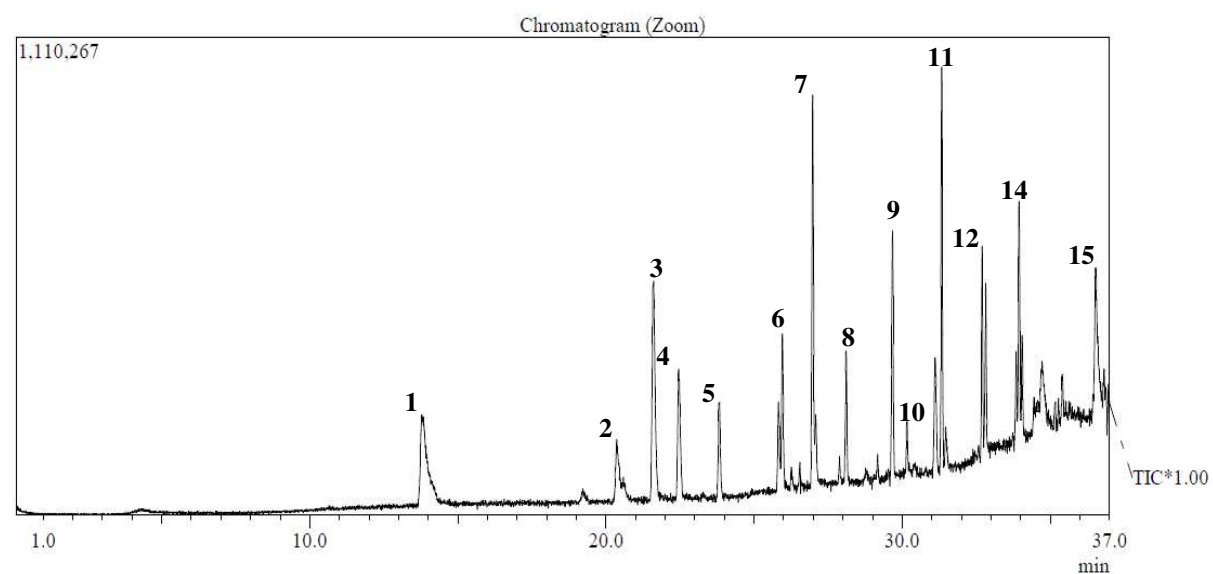
*1, 2: Diclorometano; 3: Ftalato de dietila

Figura 6. Cromatograma da amostra as 24 horas de processo utilizando a linhagem *Geotrichum sp.* CCT na presença de Frutose como única fonte de carbono



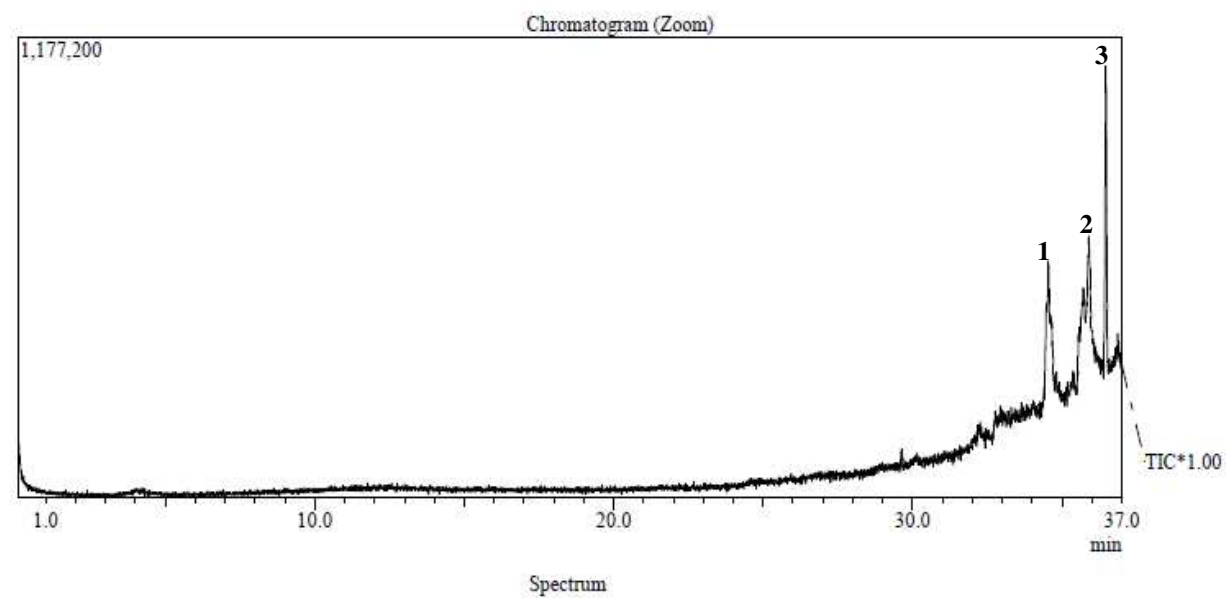
*1: Ácido Levulinico; 2: 1-Butanol; 3: Acetato de isobutil; 4: Butirato de etilo; 5: Isovalerato de etilo; 6: Ácido 2- butanoico; 7: Acetato de isoamilo; 8: Hexanoato de etila; 9: 2-Hexanoato de etila; 10: Ftalato de dietila; 11: 2-Feniletanol.

Figura 7. Cromatograma da amostra as 48 horas de processo utilizando a linhagem *Geotrichum sp.* CCT na presença de Frutose como única fonte de carbono.



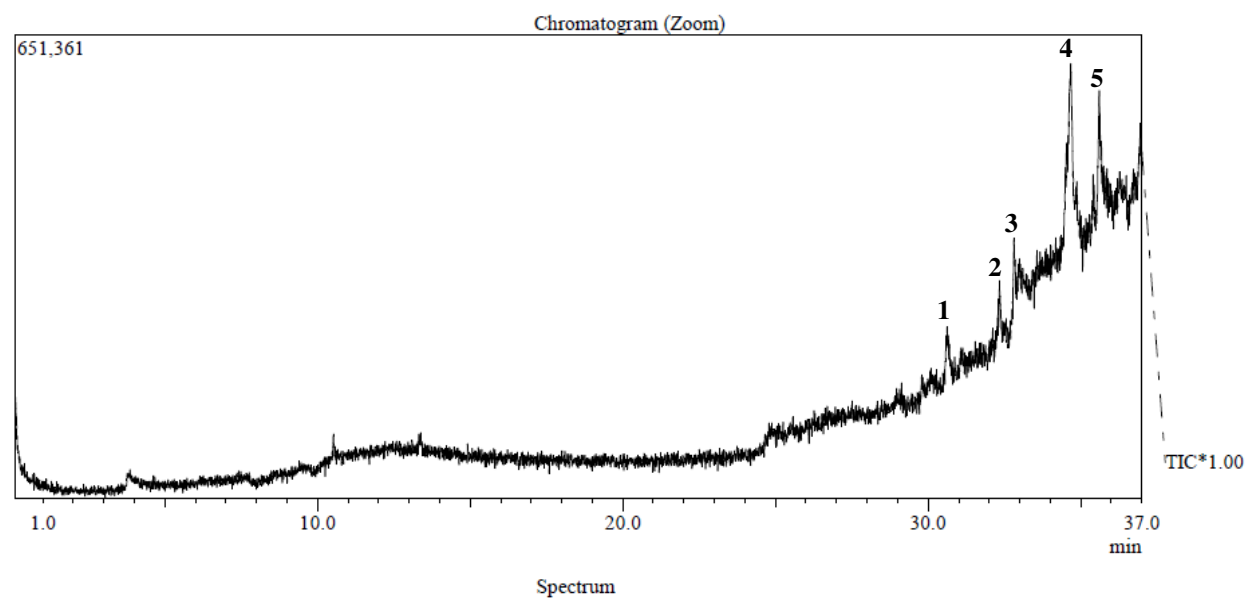
*1: Ácido Levulinico; 2: Álcool isoamilico; 3: Isobutirato de etila; 4: Acetato de isobutil; 5: Butirato de etilo; 6: Isovalerato de etilo; 7: 1-Butanol; 8: Isobutirato de isobutilo; 9: 2-metil-2-butenato de etilo; 10: Pentanoato de etil; 11: Isobutirato de isopentilo; 12: hexanoato de etila; 13: 2- hexanoato de etila; 14: Isovalerato de isoamilico; 15: 2-Feniletanol.

Figura 8. Cromatograma da amostra as 72 horas de processo utilizando a linhagem *Geotrichum sp.* CCT na presença de Frutose como única fonte de carbono.



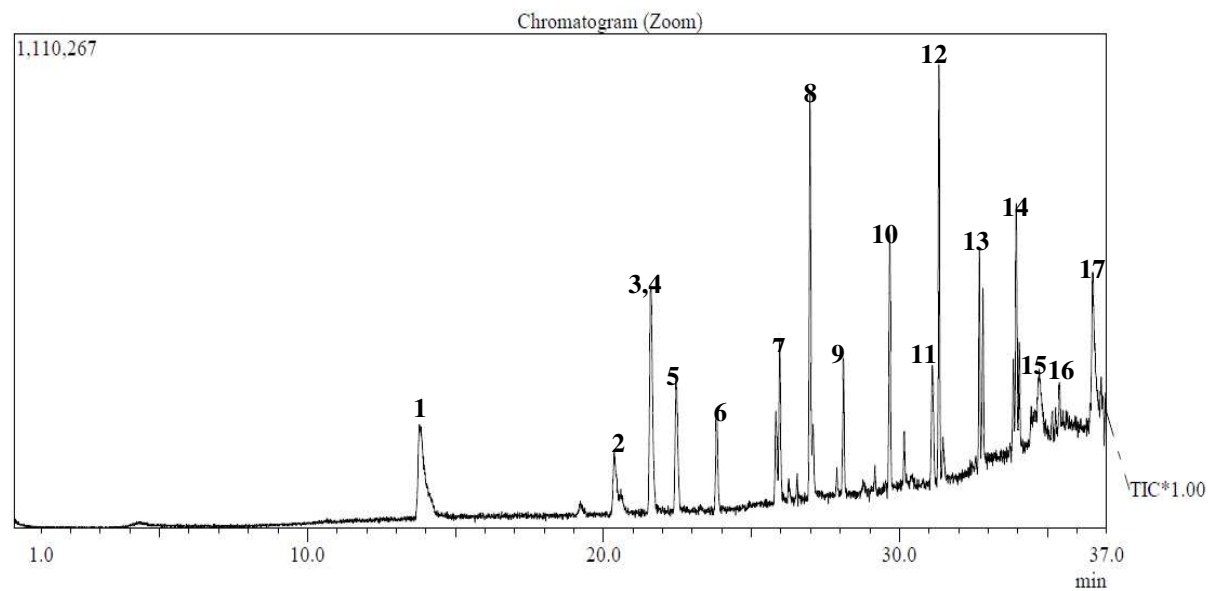
*1: 4-metilfenil 4-metilbenzeno sulfonato; 2: Propionato de 2-feniletilo; 3: 2-Feniletanol.

Figura 9. Cromatograma da amostra as 0 horas de processo utilizando a linhagem *Geotrichum sp.* CCT na presença de Glicose como única fonte de carbono.



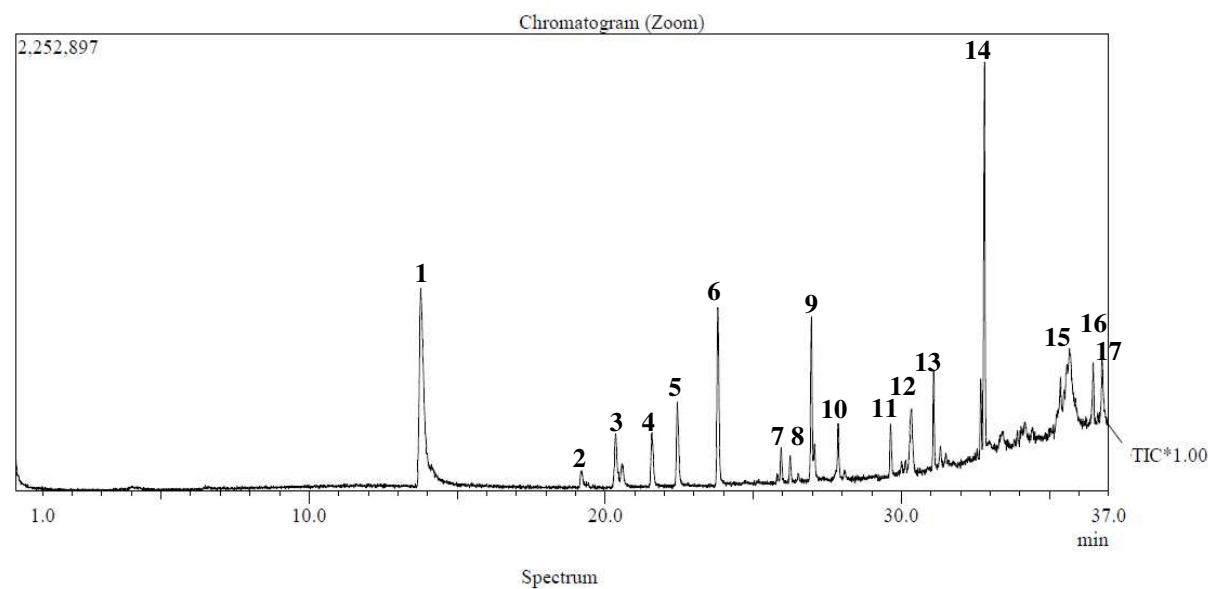
*1: 3,4,4-Trimetil-2-hexeno; 2: Ácido 9-Octadecen-12-ynoic, éster metílico; 3:Ácido decanóico; 4:Ftalato de etila; 5: Ácido não-ananóico

Figura 10. Cromatograma da amostra as 24 horas de processo utilizando a linhagem *Geotrichum sp.* CCT na presença de Glicose como única fonte de carbono.



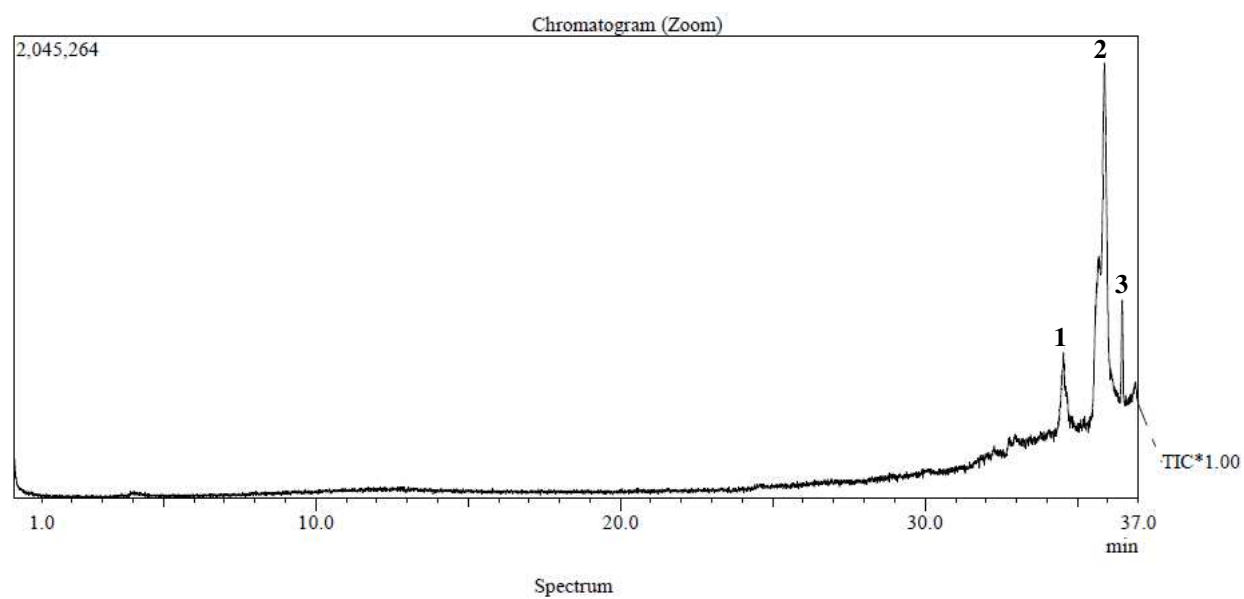
*1: Ácido levulinico; 2: Propionato de etilo; 3: Álcool isoamílico; 4: Isobutirato de etilo; 5: Acetato de isobutil; 6: Butirato de etilo; 7:Isovalerato de etilo; 8: Acetato de isoamilo; 9: Pentanoato de etil; 10: 2-metil-2-butenato de etilo; 11: Propionato de isoamilo; 12: Hexanoato de etilo; 13:Isobutirato de isopentilo; 14: 2-hexenoato de etil; 15: Isovalerato de isoamilo; 16: Ftalato de bis (2-etilhexilo); 17: 2-Feniletanol.

Figura 11. Cromatograma da amostra as 48 horas de processo utilizando a linhagem *Geotrichum sp.* CCT na presença de Glicose como única fonte de carbono.



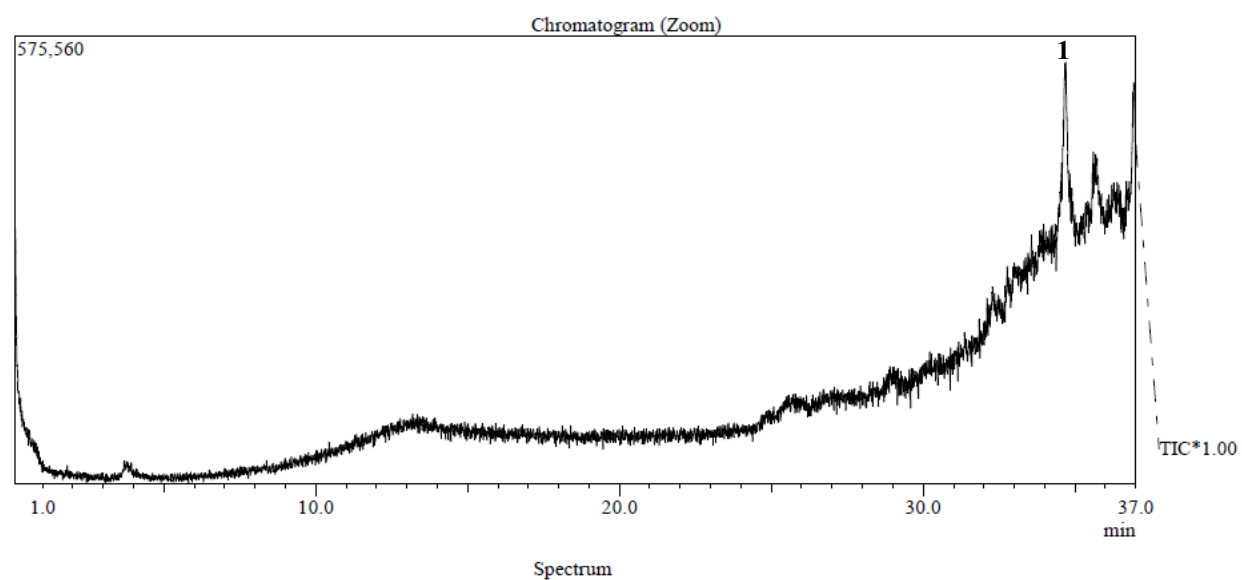
*1: Acetato de etila; 2: Propionato de etil; 3: Álcool isoamilico; 4: Isobutirato de etilo; 5: Acetato de isobutil; 6: Butirato de etilo; 7: Isovalerato de etilo; 8: Ácido 2-butenóico; 9: Acetato de isoamilo; 10: Pentanoato de etil; 11: Isobutirato de isobutilo; 12: Acetato de fenetila; 13: Hexanoato de etila; 14: 2-hexenoato de etil; 15: (2Z, 6E)-Farnesol; 16: 2-Feniletanol; 17: 9-acetoxinonanal.

Figura 12. Cromatograma da amostra as 72 horas de processo utilizando a linhagem *Geotrichum sp.* CCT na presença de Glicose como única fonte de carbono



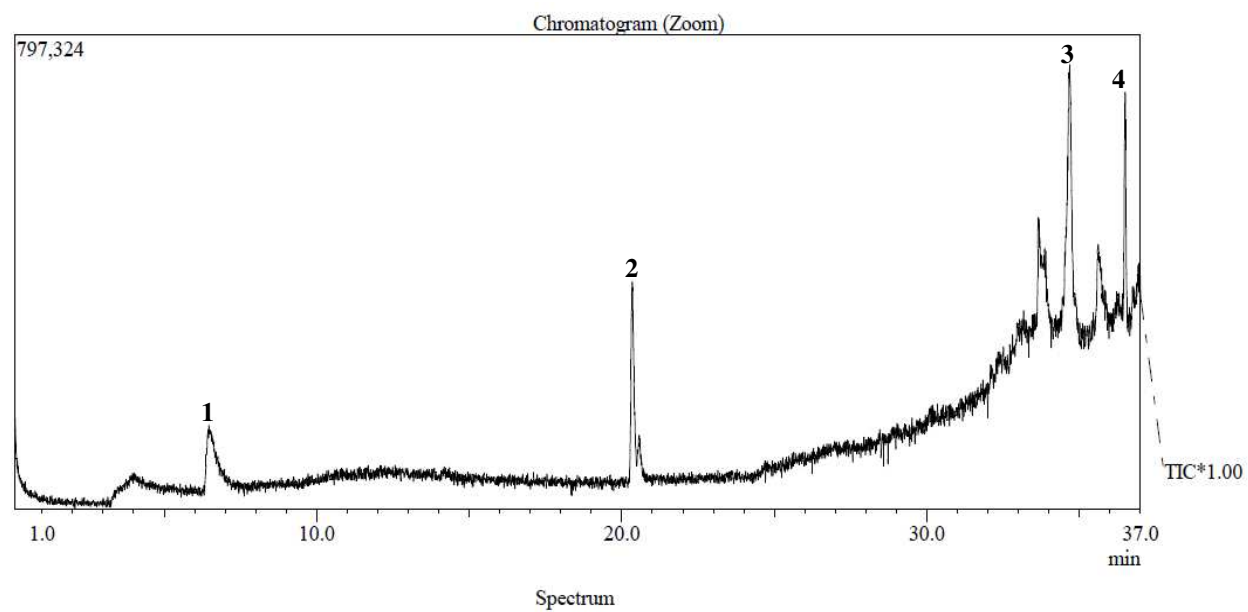
*1: Ftalao de etila; 2: Ácido oxálico, éster 2-etilhexil isohexilico; 3: 2-Feniletanol

Figura 13. Cromatograma da amostra as 0 horas de processo utilizando a linhagem *Geotrichum sp.* FC na presença de Glicose como única fonte de carbono.



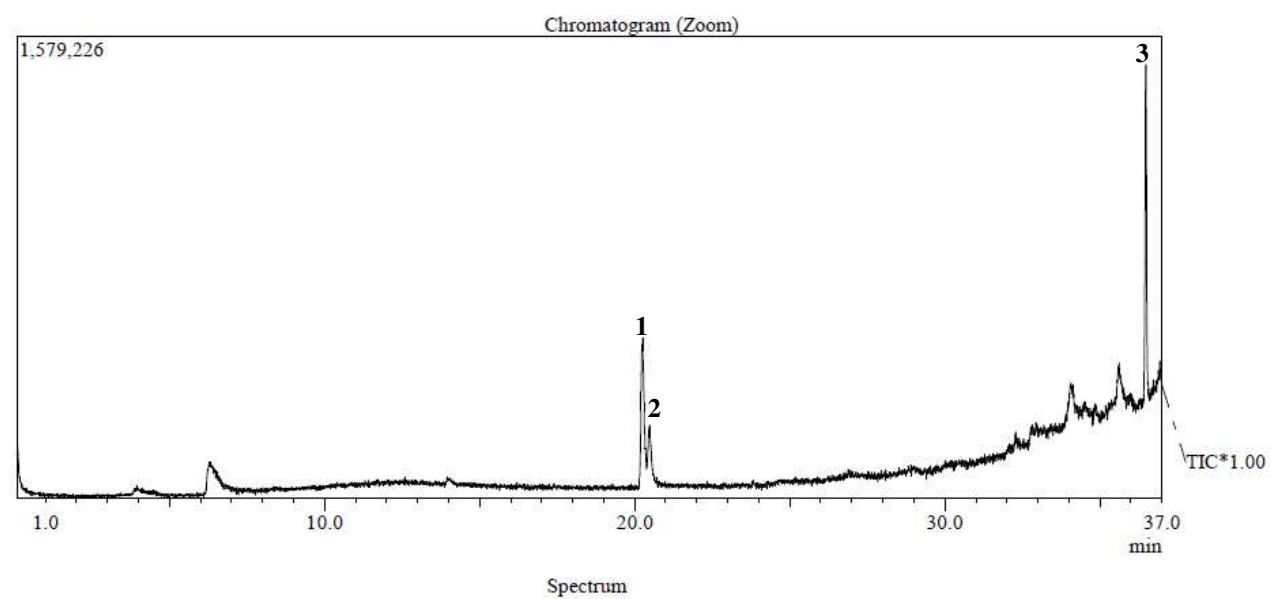
*1: mono (2-etil-hexil)

Figura 14. Cromatograma da amostra as 24 horas de processo utilizando a linhagem *Geotrichum sp.* FC na presença de Glicose como única fonte de carbono.



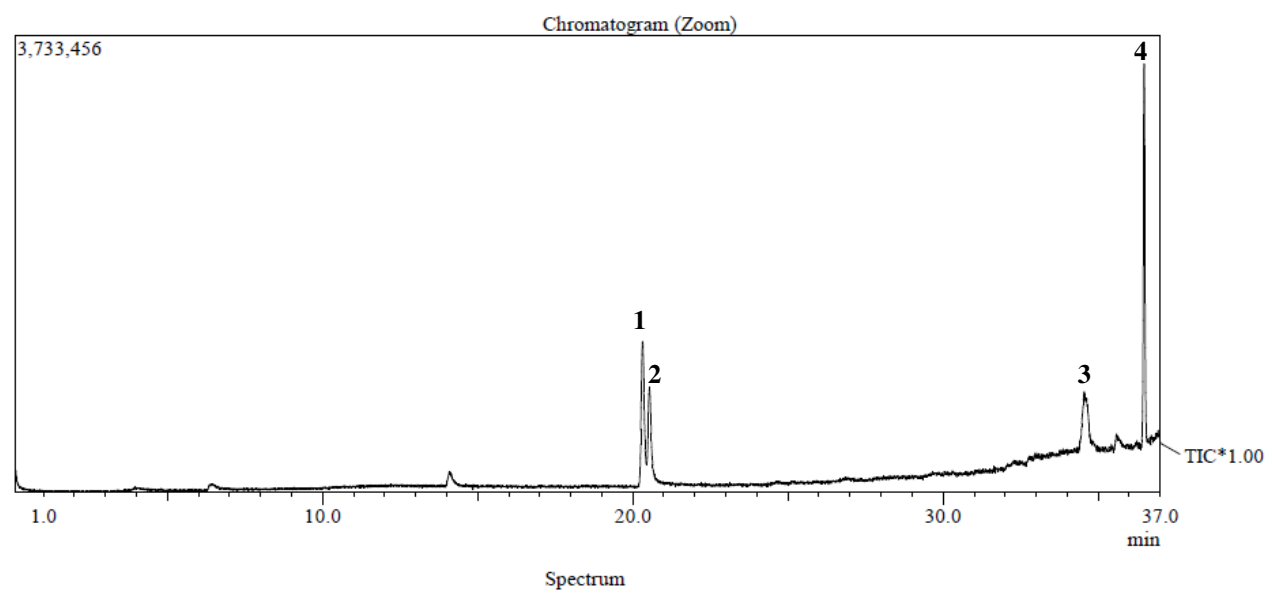
*1: Diclorometano; 2: Álcool isoamilico; 3- Ftalao de etila; 4: 2-Feniletanol.

Figura 15. Cromatograma da amostra as 48 horas de processo utilizando a linhagem *Geotrichum sp.* FC na presença de Glicose como única fonte de carbono.



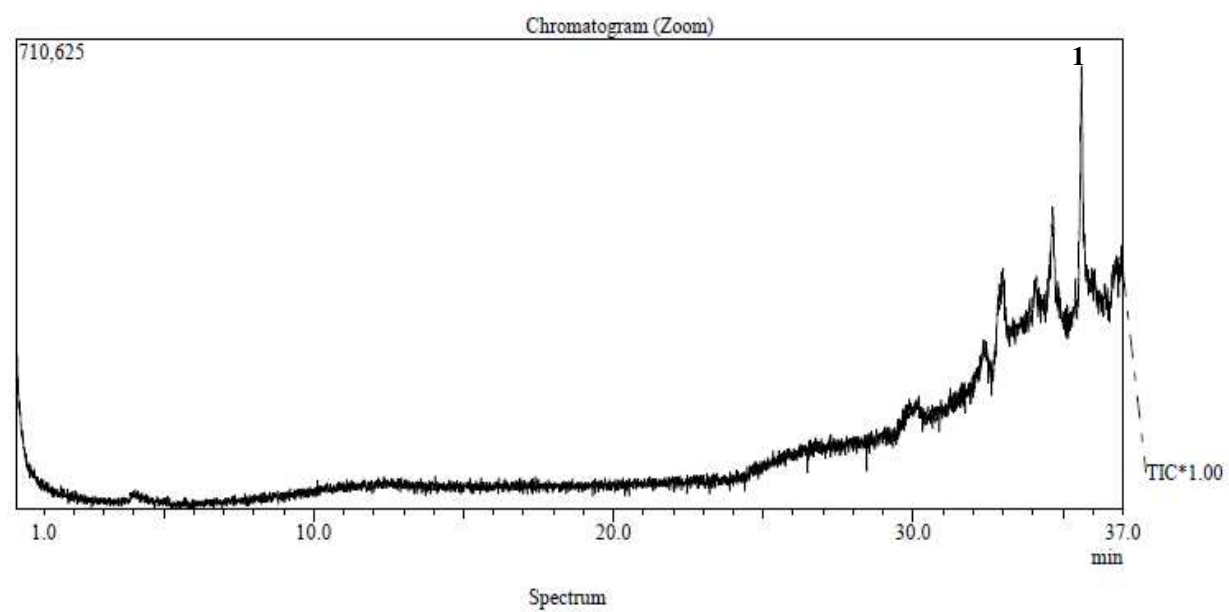
*1: Álcool isoamilico; 2: 1-butanol; 3: 2-Feniletanol

Figura 16. Cromatograma da amostra as 72 horas de processo utilizando a linhagem *Geotrichum sp.* FC na presença de Glicose como única fonte de carbono



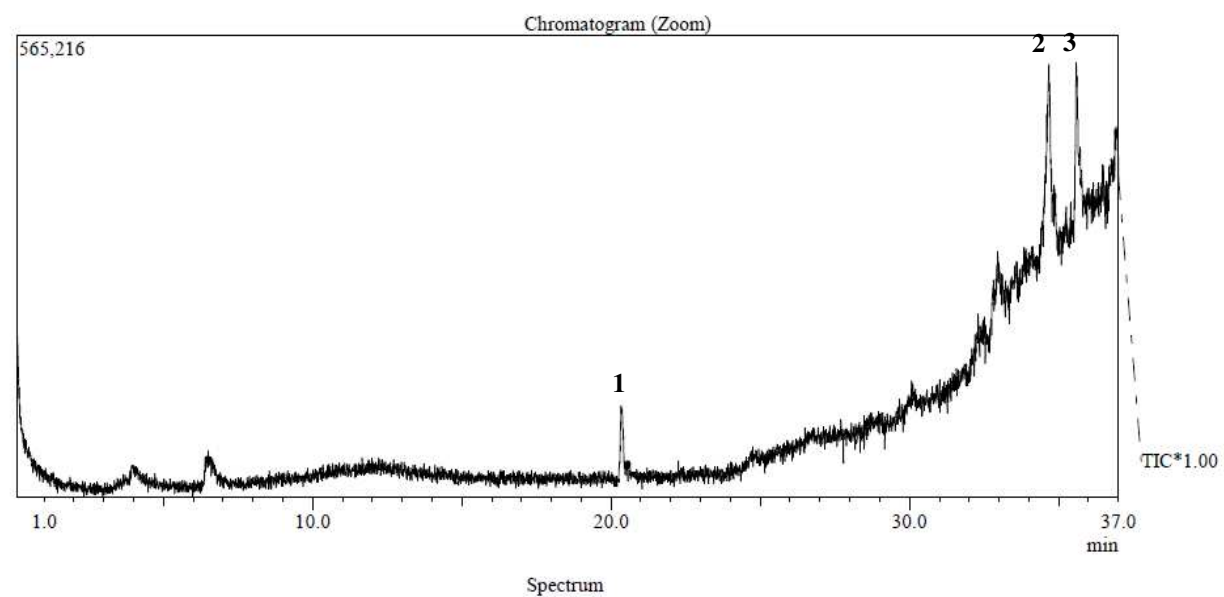
*1: Álcool isoamilico; 2: 1-butanol; 3: Ftalato de etila; 4: 2-Feniletanol

Figura 17. Cromatograma da amostra as 0 horas de processo utilizando a linhagem *Geotrichum sp.* FC na presença de Frutose como única fonte de carbono.



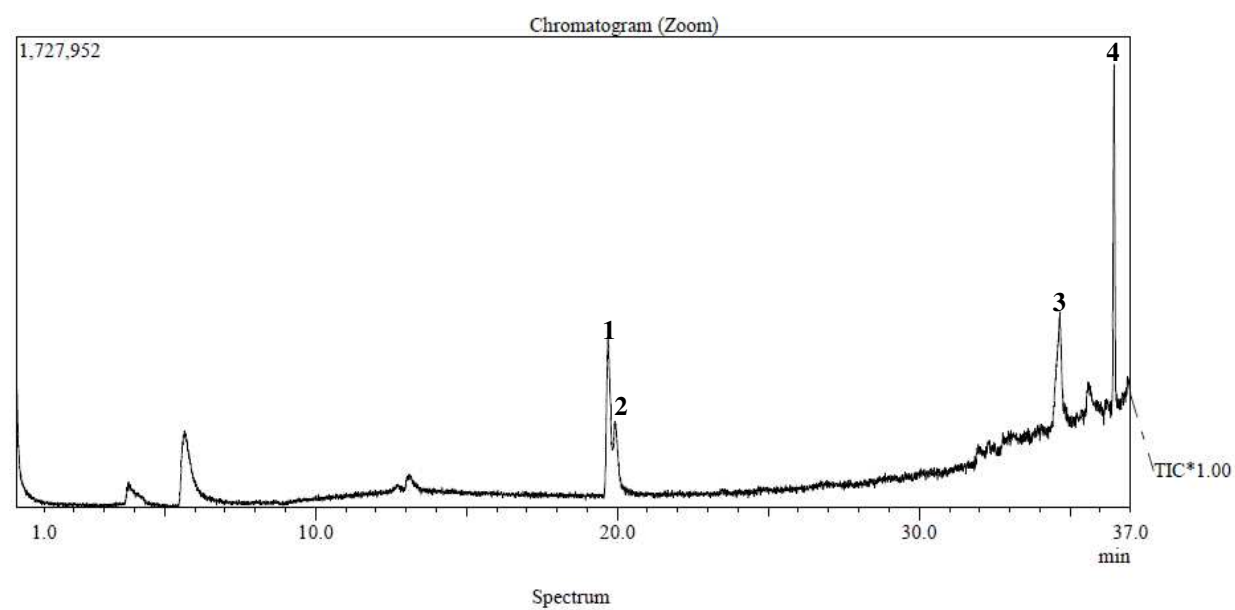
*1: Ácido 2-hendecenóico

Figura 18. Cromatograma da amostra as 24 horas de processo utilizando a linhagem *Geotrichum sp.* FC na presença de Frutose como única fonte de carbono



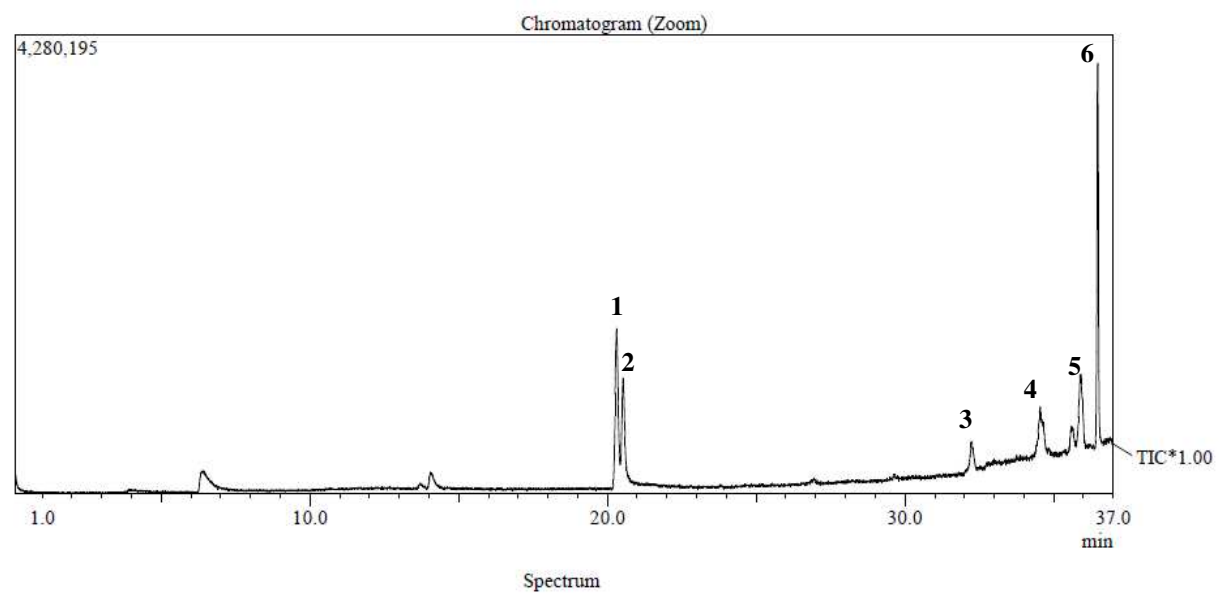
*1: Butenona; 2:Ftalato de etila; 3:2-Feniletanol

Figura 19. Cromatograma da amostra as 48 horas de processo utilizando a linhagem *Geotrichum sp.* FC na presença de Frutose como única fonte de carbono.



*1: Álcool isoamilico; 2: 1-butanol; 3: Ftalato de etila; 4: 2-Feniletanol

Figura 20. Cromatograma da amostra as 72 horas de processo utilizando a linhagem *Geotrichum sp.* FC na presença de Frutose como única fonte de carbono.



*1: Álcool isoamilico; 2: 1-Butanol; 3: Ftalato de etila; 4: 2-Feniletanol.