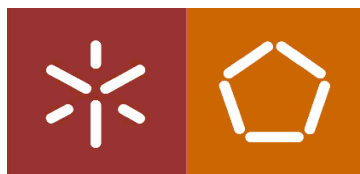


**NELMA CRISTINA RODRIGUES LAMELAS GOMES**

Efeito do oxigénio na biotransformação de lípidos  
em aromas pela levedura *Yarrowia lipolytica*

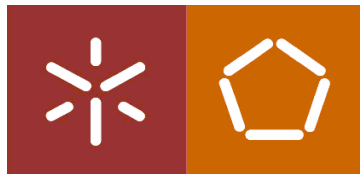
**Dissertação para obtenção do  
grau de mestre em Biotecnologia**



**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia  
Departamento de Engenharia Biológica  
2005

Tese realizada sob a orientação de:

Doutora Isabel Maria Pires Belo  
Professor Auxiliar



**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia  
Departamento de Engenharia Biológica  
2005

*"Science is facts; just as a house is made of stone, so is science made of facts; but a pile of stones is not a house, and a collection of facts is not necessarily science".*

Jules Henri Poincaré  
(1854-1912)

Aos meus pais, por todo o apoio,  
incentivo e toda a confiança que sempre  
depositaram em mim

# Agradecimentos

Gostaria de deixar registado o meu mais sincero agradecimento a todos aqueles que directa ou indirectamente contribuíram para a realização deste trabalho, nomeadamente:

À minha orientadora, que muito admiro, Doutora Isabel Belo, por todo o seu infinito apoio, ensinamentos, optimismo e pela muita paciência que sempre teve.

Ao Doutor Mário Aguedo, muito obrigada pela partilha de conhecimentos essenciais na execução deste trabalho e por todo o apoio, amizade e presença nas alturas mais importantes.

Ao Doutor António Vicente e ao Professor José Teixeira, pois sem eles nunca teria conseguido chegar onde cheguei.

À Carla Oliveira, pela amizade, apoio, ensinamentos, paciência e por estar sempre presente quando precisei.

A todos os que ainda estão ou que passaram pelo Laboratório de Fermentações. Obrigada por todo o apoio, amizade e pelo excelente ambiente de trabalho, que não poderia ser melhor!

A todo o pessoal do Laboratório de Biofilmes, pelo constante apoio, ajuda, amizade e pela companhia em todos aqueles “coffee-breaks” diários!

À menina pequenina do laboratório da frente que tanto me apoiou naqueles momentos mais difíceis e me deu excelentes “dicas” sobre qual a melhor maneira para organizar a minha escrita. Resta saber se aprendi alguma coisa...

Ao meu “explicador” de informática, pela paciência e boa-vontade na transmissão dos seus conhecimentos e pela amizade e apoio sempre presentes.

Ao Doutor José Maria, Eng<sup>a</sup> Madalena e Sr. Santos, por toda a ajuda e disponibilidade sempre que precisei.

Aos meus amigos, pela paciência interminável perante alguns momentos de desânimo e pelo apoio constante.

À minha família, por todo o seu incessante apoio e pela paciência que sempre tiveram comigo, principalmente naquelas alturas mais difíceis.

# Resumo

Vários processos biotecnológicos baseiam-se no desenvolvimento de microrganismos num meio bifásico formado por uma emulsão do tipo óleo-em-água. Um exemplo deste sistema consiste no meio utilizado na biotransformação de ricinoleato de metilo em  $\gamma$ -decalactona, pela levedura *Yarrowia lipolytica*. A  $\gamma$ -decalactona é um composto aromático de interesse industrial, que resulta da  $\beta$ -oxidação peroxisomal do ricinoleato de metilo.

A concentração de oxigénio dissolvido no meio é um factor interveniente na via metabólica implicada na biotransformação. Assim, a caracterização da capacidade de transferência de massa de oxigénio do ar para o meio bifásico reveste-se de grande importância para a optimização do processo em bioreactor.

Neste trabalho foi desenvolvida uma correlação empírica para prever o  $K_La$  em função das condições de operação (agitação e arejamento) e da composição do meio de biotransformação em fracções orgânicas de óleo e de surfactante, no biorreactor. Isto permitiu seleccionar condições de operação para estudar o efeito do  $K_La$  na produção de  $\gamma$ -decalactona. Apesar de se verificar que o  $k_La$  influencia a produção de  $\gamma$ -decalactona não foi possível estabelecer uma relação directa entre estas duas variáveis.

Foi igualmente objectivo deste trabalho avaliar a sensibilidade de *Yarrowia lipolytica* a concentrações elevadas de oxigénio, com o intuito de averiguar a possibilidade de aplicação de ar hiperbárico como forma de melhorar a capacidade de transferência de oxigénio para o meio.

Verificou-se que a aplicação de pressões de ar de 0.5 MPa na fase de crescimento da levedura estimula o crescimento celular. Porém, na fase de biotransformação, a aplicação de pressões de ar acrescidas não favorece o processo.

A acumulação de  $\gamma$ -decalactona pode variar muito com as actividades das enzimas da  $\beta$ -oxidação que degradam o seu precursor directo, o ácido 4-hidroxidecanoico. Essas actividades são influenciadas pelas condições de pressão e oxigénio aplicadas na biotransformação.

A maior produção de  $\gamma$ -decalactona (328 mg.L<sup>-1</sup>) foi obtida no biorreactor Parr, aplicando pressões de 0.1 MPa durante as fases de crescimento e biotransformação, com uma agitação e arejamento de 400 rpm e 0.9 vvm, respectivamente.

# Abstract

Numerous biotechnological processes are based on the development of microorganisms within a biphasic medium formed by an oil-in-water emulsion. One example of such a system is the medium used in the biotransformation of methyl ricinoleate into  $\gamma$ -decalactone, carried out by the yeast *Yarrowia lipolytica*.  $\gamma$ -Decalactone is an aroma compound of industrial interest, resulting from the peroxisomal  $\beta$ -oxidation of methyl ricinoleate.

The dissolved oxygen concentration in the medium is an intervening factor in the metabolic pathway involved in the biotransformation. Therefore, the characterization of oxygen mass transfer capacity from air to biphasic medium is very important to optimize the process within the bioreactor.

In this work, an empirical correlation was developed to predict  $K_La$  as a function of operating conditions (agitation and aeration) and of organic and surfactant fractions in the biotransformation medium, within the bioreactor. This enabled then to select operating conditions to study the effect of  $K_La$  on  $\gamma$ -decalactone production. Although  $K_La$  influenced  $\gamma$ -decalactone production, it was impossible to establish a direct correlation between these two variables.

Another aim of this work, was to evaluate the sensibility of *Yarrowia lipolytica* at high oxygen concentrations, with the purpose of checking the possibility of using hyperbaric air to enhance the oxygen mass transfer capacity into the medium.

It was observed that hyperbaric air applications of 0.5 MPa during the yeast growth phase, improved the cellular growth. However, the use of hyperbaric air during the biotransformation did not improve the process.

$\gamma$ -Decalactone accumulation can vary a lot with the activities of the peroxisomal  $\beta$ -oxidation enzymes, that degrade its direct precursor, 4-hidroxydecanoic acid. Those activities are influenced by pressure and oxygen conditions applied in the biotransformation.

The highest production of  $\gamma$ -decalactone (328 mg.L<sup>-1</sup>) was obtained in the Parr bioreactor, using a pressure of 0.1 MPa during the growth and biotransformation phases, with agitation and aeration conditions of respectively 400 rpm and 0.9 vvm.

# Índice

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>Revisão Bibliográfica</b>	<b>5</b>
2.1	O composto aromático $\gamma$ -decalactona	5
2.2	A levedura <i>Yarrowia lipolytica</i>	5
2.3	A via de produção de $\gamma$ -decalactona: $\beta$ -oxidação peroxisomal	5
2.4	Via de degradação de $\gamma$ -decalactona	5
2.5	Biotransformação em meios bifásicos	5
2.6	Transferência de massa gás-líquido	5
2.7	Determinação da capacidade de transferência de oxigénio	5
2.7.1	Métodos em estado transiente	5
2.7.1.1	Método estático	5
2.7.1.2	Método dinâmico	5
2.7.2	Métodos em estado estacionário	5
2.7.2.1	Método da oxidação do sulfito	5
2.7.2.2	Método dos balanços	5
2.8	Pressão moderada em biotecnologia	5
2.8.1	Efeito da pressão nos microrganismos	5
2.8.2	A toxicidade do oxigénio	5
<b>3</b>	<b>Materiais e Métodos</b>	<b>5</b>
3.1	Estirpes de leveduras, meios e condições de conservação e de cultura	5
3.1.1	Leveduras	5
3.1.2	Conservação das leveduras	5
3.1.3	Meio de produção de biomassa	5
3.2	Biotransformação	5
3.2.1	Meio de biotransformação	5
3.2.2	Biorreactores utilizados	5
3.2.2.1	Biorreactor Biolab	5
3.2.2.2	Biorreactor Parr	5

3.2.2.3	Biorreactor Biostat	5
3.3	Determinação da capacidade de transferência de oxigénio	5
3.3.1	Ensaio sem células	5
3.3.2	Ensaio com células	5
3.4	Métodos analíticos	5
3.4.1	Concentração celular	5
3.4.1.1	Peso seco	5
3.4.1.2	Número de células	5
3.4.1.3	Viabilidade celular	5
3.4.2	Quantificação dos açúcares redutores	5
3.4.3	Quantificação da $\gamma$ -decalactona	5
3.4.4	Quantificação de outras lactonas	5
<b>4</b>	<b>Resultados e Discussão</b>	<b>5</b>
4.1	Efeito do meio de biotransformação nos valores de $K_{La}$	5
4.2	Crescimento de <i>Yarrowia lipolytica</i>	5
4.3	Produção de $\gamma$ -decalactona	5
4.4	Efeito dos valores de $K_{La}$ na produção de $\gamma$ -decalactona	5
4.5	Efeito do oxigénio dissolvido na produção de $\gamma$ -decalactona	5
4.5.1	Oxigénio puro (biorreactor Biolab)	5
4.5.2	Pressão de ar (biorreactor Parr)	5
4.5.3	Oxigénio controlado (biorreactor Biostat)	5
4.6	Efeito do oxigénio na via metabólica da produção de lactona	5
4.6.1	Efeito do oxigénio à pressão atmosférica	5
4.6.2	Efeito do oxigénio a pressão aumentada	5
<b>5</b>	<b>Conclusões e Perspectivas de Trabalho Futuro</b>	<b>5</b>
<b>6</b>	<b>Bibliografia</b>	<b>5</b>
	<b>Anexos</b>	<b>107</b>



# Índice de Tabelas

Tabela 2.1 – Resumo dos microrganismos capazes de produzir $\gamma$ -decalactona (adaptado de Aguedo, 2002).	5
Tabela 2.2– Resumo das investigações realizadas em sistemas gás-líquido-líquido, com determinações de $K_La$ , $K_L$ e/ou $a$ , em que ↗, ↘ e →, significam aumento, decréscimo e manutenção dos valores das determinações, respectivamente.	5
Tabela 2.3 - Resumo dos efeitos do aumento da pressão parcial ( $P_{O_2}$ ) de oxigénio.	5
Tabela 3.1– Composição do meio de produção de biomassa de <i>Yarrowia lipolytica</i> .	5
Tabela 3.2- Composição da solução A utilizada na preparação do meio de cultura.	5
Tabela 3.3- Composição da solução B utilizada na preparação da Solução A.	5
Tabela 3.4– Composição do meio de biotransformação.	5
Tabela 4.1 – Valores de $K_La$ , $OUR$ e $q_{O_2}$ determinados nas fases exponencial e estacionária, ao longo de um crescimento de <i>Yarrowia lipolytica</i> .	5
Tabela 4.2 - Valores de $K_La$ e concentração celular a diferentes condições de operação.	5
Tabela 4.3 – Produção de $\gamma$ -decalactona a diferentes valores de $K_La$ .	5
Tabela 4.4 -Valores de $K_La$ e concentração celular, utilizando oxigénio puro.	5
Tabela 4.5 – Taxas específicas de crescimento de <i>Yarrowia lipolytica</i> a diferentes pressões.	5
Tabela 4.6 – Concentrações celular e de $\gamma$ -decalactona obtidas a diferentes tempos de biotransformação.	5

# Índice de Figuras

Figura 2.1 – Intermediários da degradação do ácido ricinoleico por $\beta$ -oxidação e síntese da $\gamma$ -decalactona (adaptado de Blin-Perrin <i>et al.</i> , 2000).	5
Figura 2.2 – Enzimas da $\beta$ -oxidação peroxissomal na levedura (adaptado de Waché <i>et al.</i> , 1998).	5
Figura 2.3 – Potenciais intermediários da $\beta$ -oxidação do ricinoleato de metilo ao nível C <sub>10</sub> (adaptado de Waché <i>et al.</i> , 2001).	5
Figura 3.1 – Fotografia do biorreactor Biolab, com meio de biotransformação.	5
Figura 3.2 – Fotografia do biorreactor Parr.	5
Figura 3.3- Representação esquemática da instalação experimental do biorreactor pressurizado e acessórios: A – agitador; A.R. – circuito de refrigeração; CCM – controlador de caudal mássico; D – disco de segurança; F – filtro de ar; G – garrafa de gás; M – motor do agitador; Va – válvula anti-retorno; V1, V2, V3 e V4 – válvulas; V5 – válvula de regulação; T – transdutor de temperatura (adaptado de Belo, 1999).	5
Figura 3.4 – Evolução da concentração de oxigénio dissolvido no meio sem células após re-arejamento (A) e representação logarítmica de $1 - \frac{O}{O_S}$ ao longo do tempo (B).	5
Figura 3.5 – Evolução da concentração de oxigénio dissolvido no meio com células após interrupção do arejamento, seguida da sua retoma (A) e representação logarítmica de $\frac{O_i - O}{O_i - O_0}$ ao longo do tempo (B).	5
Figura 3.6 – Cromatograma típico de uma amostra após 10 horas de biotransformação e espectro de massa dos compostos dec-3-en-4-olido (A), $\gamma$ -decalactona (B), dec-2-en-4-olido (C), $\gamma$ -undecalactona (D) e 3-hidroxi- $\gamma$ -decalactona (E).	5
Figura 4.1 – Valores experimentais de $K_{La}$ a várias condições de operação e com diferentes fracções volúmicas de fase orgânica e de surfactante.	5
Figura 4.2- Valores experimentais de $K_{La}$ versus valores teóricos, estimados a partir da Eq. 4.2.	5
Figura 4.3- Valores experimentais de $K_{La}$ versus valores teóricos, estimados a partir da Eq. 4.4.	5
Figura 4.4- Valores experimentais de $K_{La}$ versus valores teóricos, estimados a partir da Eq. 4.5.	5
Figura 4.5 - Valores experimentais de $K_{La}$ versus valores teóricos estimados a partir da Eq. 4.7.	5
Figura 4.6 - Valores experimentais de $K_{La}$ versus valores teóricos estimados a partir da Eq. 4.9.	5
Figura 4.7 – Variação da concentração de biomassa ( $\square$ ), concentração de açúcares redutores, [AR], ( $\Delta$ ) e concentração de oxigénio dissolvido no meio, [O <sub>2</sub> ], a 27 °C, 400 rpm e com um caudal de arejamento de 0.9 vvm.	5

- Figura 4.8 – Variação, ao longo do tempo, da concentração de oxigénio dissolvido e da produção de  $\gamma$ -decalactona a diferentes velocidades de agitação e caudais de arejamento: A, 300 rpm e 0.3 vvm; B, 600 rpm e 0.9 vvm. 5
- Figura 4.9 – Crescimento de *Yarrowia lipolytica* a 400 rpm e 0.9 vvm a condições normais de pressão e temperatura (PTN), sob diferentes pressões: ( $\diamond$ ) 0.5 MPa, ( $\triangle$ ) 0.1 MPa e ( $\square$ ) 1 MPa. 5
- Figura 4.10 – Produção de  $\gamma$ -decalactona a 400 rpm e 0.9 vvm (PTN), sob diferentes condições de pressão durante o crescimento e biotransformação, respectivamente: ( $\blacklozenge$ ) 0.1 MPa, 0.1 MPa, ( $\square$ ) 0.5 MPa, 0.1 MPa, ( $\times$ ) 0.1 MPa, 1 MPa, ( $\blacktriangle$ ) 0.1 MPa, 0.5 MPa e ( $\circ$ ) 0.5 MPa, 0.5 MPa. 5
- Figura 4.11 – Variação das condições de operação (agitação e arejamento) ao longo de uma biotransformação realizada a concentração de oxigénio controlada. 5
- Figura 4.12 – Concentração dos compostos 3-dec-en-4-olido ( $\blacksquare$ ),  $\gamma$ -decalactona ( $\diamond$ ), 2-dec-en-4-olido ( $\blacktriangle$ ) e 3-hidroxi- $\gamma$ -decalactona ( $\times$ ) em diferentes condições de operação: A, 300 rpm e 0.3 vvm; B, 600 rpm, 0.9 vvm; C, 600 rpm e 1.8 vvm; D, 400 rpm e 0.6 vvm, com oxigénio puro; E, concentração de oxigénio controlada a 30 % de saturação. 5
- Figura 4.13 - Concentração dos compostos 3-dec-en-4-olido ( $\blacksquare$ ),  $\gamma$ -decalactona ( $\diamond$ ), 2-dec-en-4-olido ( $\blacktriangle$ ) e 3-hidroxi- $\gamma$ -decalactona ( $\times$ ) a 400 rpm e 0.9 vvm (PTN), a 0.1 MPa durante o crescimento e durante a biotransformação. 5
- Figura 4.14 - Concentração dos compostos 3-dec-en-4-olido ( $\blacksquare$ ),  $\gamma$ -decalactona ( $\diamond$ ), 2-dec-en-4-olido ( $\blacktriangle$ ) e 3-hidroxi- $\gamma$ -decalactona ( $\times$ ) a 400 rpm e 0.9 vvm (PTN), a 0.5 MPa durante o crescimento e 0.1 MPa durante a biotransformação. 5
- Figura 4.15 - Concentração dos compostos 3-dec-en-4-olido ( $\blacksquare$ ),  $\gamma$ -decalactona ( $\diamond$ ), 2-dec-en-4-olido ( $\blacktriangle$ ) e 3-hidroxi- $\gamma$ -decalactona ( $\times$ ) a 400 rpm e 0.9 vvm (PTN), em diferentes condições de pressão durante o crescimento e durante a biotransformação: A, 0.1 MPa e 0.5 MPa; B, 0.1 MPa e 1 MPa, respectivamente. 5
- Figura 4.16 - Concentração dos compostos 3-dec-en-4-olido ( $\blacksquare$ ),  $\gamma$ -decalactona ( $\diamond$ ), 2-dec-en-4-olido ( $\blacktriangle$ ) e 3-hidroxi- $\gamma$ -decalactona ( $\times$ ) a 400 rpm e 0.9 vvm (PTN), a 0.5 MPa durante o crescimento e durante a biotransformação. 5
- Figura 4.17 – Resumo do efeito do oxigénio na actividade das enzimas da  $\beta$ -oxidação nas várias condições operatórias testadas. 5

# Lista de Símbolos

$a$	Área interfacial de transferência de oxigénio ( $\text{m}^{-1}$ )
$A$	Área ( $\text{m}^2$ )
$A_{\text{### nm}}$	Absorvância a ### nm
$b$	Ordenada na origem
$c$	Constante empírica
$C$	Concentração celular ( $\text{g.L}^{-1}$ )
$D_a$	Diâmetro do agitador (m)
$DO$	Densidade óptica (nm)
$F_G$	Caudal volumétrico do gás ( $\text{m}^3.\text{s}^{-1}$ )
$GC$	Cromatografia gasosa
$GC-MS$	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
$H_i$	Constante de Henry para o componente $i$ no líquido
$K$	Coefficiente de resposta
$K_L$	Coefficiente de transferência de oxigénio na fase líquida ( $\text{m.h}^{-1}$ )
$K_{La}$	Coefficiente global volumétrico de transferência de oxigénio ( $\text{h}^{-1}$ )
$K_T$	Constante empírica
$m$	Declive da recta
$N$	Número de células por unidade de volume (número células. $\text{mL}^{-1}$ )
$N_A$	Velocidade de agitação (rps)
$NAD$	Nicotinamida adenina nucleótido
$NADH_2$	Nicotinamida adenina nucleótido reduzido
$N_p$	Número de potência
$O$	Concentração de oxigénio dissolvido ( $\text{mg.L}^{-1}$ )
$O_0$	Concentração de oxigénio dissolvido quando o arejamento é retomado ( $\text{mg.L}^{-1}$ )
$O_i$	Concentração de oxigénio dissolvido no início da determinação ( $\text{mg.L}^{-1}$ )
$O^s$	Concentração de saturação de oxigénio no líquido ( $\text{mg.L}^{-1}$ )
$OTR$	Oxygen transfer rate (taxa de transferência de oxigénio) ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )
$OUR$	Oxygen uptake rate (taxa de consumo de oxigénio) ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )

$P$	Pressão total
$P_g$	Potência de agitação (W)
$P_A$	Potência de agitação, sem arejamento (W)
$(P_A)_G$	Potência de agitação, com arejamento (W)
$PTN$	Pressão e temperatura normais (101.3 kPa e 0 °C)
$q_{O_2}$	Taxa específica de consumo de oxigénio (g.g.h <sup>-1</sup> )
$r$	Raio do biorreactor (m)
$Re_A$	Número de Reynolds da agitação
$rpm$	Rotações por minuto
$S_b$	Erro padrão associado à ordenada na origem
$S_m$	Erro padrão associado ao declive
$t$	Tempo (h)
$t_0$	Tempo quando o arejamento é retomado (h)
$V$	Volume (m <sup>3</sup> )
$vvm$	Volume de gás por volume útil de reactor por minuto
$v_s$	Velocidade superficial do gás (m.s <sup>-1</sup> )
$X$	Densidade celular (g.L <sup>-1</sup> )
$x_i$	Solubilidade do componente $i$ no líquido
$X_{ORG}$	Fracção de fase orgânica (L.L <sup>-1</sup> )
$X_{RM}$	Fracção de RM (L.L <sup>-1</sup> )
$X_{Tween}$	Fracção de Tween (L.L <sup>-1</sup> )
$y_i$	Fracção molar do componente $i$ na fase gasosa

### **LETRAS GREGAS**

$\alpha$	Constante a determinar
$\beta$	Constante a determinar
$\delta$	Constante a determinar
$\gamma$	Constante a determinar
$\phi$	Constante a determinar
$\tau$	Tempo de resposta da sonda de oxigénio (s <sup>-1</sup> )
$\mu$	Taxa específica de crescimento (h <sup>-1</sup> )
$\rho$	Densidade (Kg.m <sup>-3</sup> )
$\nu$	Viscosidade (Kg.m <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )

## NOTAS

De um modo geral, utilizaram-se as unidades do Sistema Internacional (SI). Recorreu-se várias vezes a múltiplos e submúltiplos das unidades fundamentais, tendo-se utilizado algumas unidades que embora não sejam do SI, a sua utilização é de uso corrente, sendo permitidas por este sistema.

Expressaram-se ainda algumas variáveis em unidades que, embora não reconhecidas pelo SI, são utilizadas comumente, razão pela qual foram utilizadas neste trabalho. Foi o caso da utilização da percentagem volúmica (% v/v), para designar a composição do meio de biotransformação, das rotações por minuto (rpm), para designar a velocidade de agitação do biorreactor e do volume de gás, por volume útil de reactor, por minuto (vvm), para designar o caudal de arejamento.

Foram adoptadas as siglas inglesas para as taxas de consumo e de transferência de oxigénio, devido à inexistência de siglas convencionais portuguesas.

# 1 Introdução

---

Neste capítulo é feita uma contextualização ao tema do trabalho, assim como a apresentação dos seus objectivos.

---

A exigência de produção de aromas tem vindo a aumentar como resultado do aumento da produção de alimentos processados. A maioria dos aromas são produzidos por meios químicos, contudo, os aromas naturais são obtidos principalmente a partir de plantas, em pequenas quantidades, sendo extremamente caros. A síntese química de compostos aromáticos geralmente requer numerosas etapas. O clima, as variações sazonais, os factores sócio-económicos e políticos podem conduzir a constantes quebras no fornecimento de aromas naturais. Por outro lado, devido às preferências dos consumidores, tornou-se importante que os aromas utilizados fossem designados por naturais. Assim, produtos derivados de bioprocessos a partir de substratos naturais são, em princípio, definidos como “naturais” caso já tenham sido identificados em plantas ou em outras fontes naturais (Schrader, 2004).

Esta percepção do “natural” como melhor do que o “artificial” levou a um aumento da exigência dos compostos de aroma naturais. Por esta razão, surgiu um forte interesse na produção biotecnológica destes compostos (Lee, 1995).

A fermentação microbiana é encarada como um meio potencial para produção de substâncias aromáticas naturais (Lee, 1999). Até agora, vários compostos aromáticos como ácidos, álcoois, aldeídos, ésteres, lactonas, pirazinas e terpenos foram descritos por serem produzidos por muitos microrganismos incluindo fungos, leveduras e bactérias (Lee, 1995).

Lactonas, como a  $\gamma$ -decalactona, são aromas bem conhecidos numa grande variedade de alimentos e bebidas, pelo que a indústria alimentar está particularmente interessada na sua produção biotecnológica. Neste campo, uma das aplicações melhor conhecidas é a biotransformação do ácido ricinoleico (derivado do óleo de rícino) em  $\gamma$ -decalactona catalisada por leveduras. Este processo envolve uma degradação do substrato pela  $\beta$ -oxidação peroxisomal, levando à formação do ácido-4-hidroxicanoico que cicliza originando  $\gamma$ -decalactona. Uma das leveduras capazes de realizar esta biotransformação é *Yarrowia lipolytica*.

Trabalhos recentes indicam que a disponibilidade de oxigénio no meio poderá ser um factor relevante na determinação dos produtos resultantes da biotransformação, pelo que se torna necessário caracterizar a transferência de massa de oxigénio do ar para o meio de biotransformação, de modo a otimizar o processo. Por outro lado, o facto da levedura *Yarrowia lipolytica* ser um microrganismo estritamente aeróbio, também contribui para a necessidade desta caracterização.



A optimização das condições de arejamento inclui o estudo do efeito das condições de operação e composição do meio no coeficiente de transferência de massa de oxigénio para um meio bifásico, como o utilizado neste trabalho, e o seu impacto na produção do aroma. A optimização do arejamento contempla ainda o estudo da aplicação de ar hiperbárico para aumentar a solubilidade do oxigénio no meio.

O aumento da pressão total de ar (dentro de certos limites), em biorreactores utilizados para cultura de leveduras, é um meio eficiente de resolver as limitações de oxigénio que condicionam muitos processos biotecnológicos (Belo, 1999).

Neste trabalho pretende-se caracterizar a transferência de oxigénio num meio de cultura bifásico (fase aquosa e orgânica), de modo a que, recorrendo a essa informação, seja possível optimizar as condições de operação da biotransformação do ricinoleato de metilo em  $\gamma$ -decalactona pela levedura *Y. lipolytica*. É ainda objectivo deste trabalho, avaliar a sensibilidade desta levedura a concentrações elevadas de oxigénio dissolvido, com o intuito de investigar a aplicabilidade de pressões acrescidas de ar como meio de aumentar a disponibilidade de oxigénio no meio de cultura.

## 2 Revisão Bibliográfica

---

Numa primeira fase, é realizada, neste capítulo, uma caracterização do composto aromático  $\gamma$ -decalactona, assim como da levedura utilizada neste trabalho para o produzir, *Yarrowia lipolytica*. São igualmente abordadas as vias de produção e degradação de  $\gamma$ -decalactona.

Numa fase posterior, é feita uma breve abordagem sobre o processo de biotransformação em meios bifásicos e sobre a transferência de massa nestes sistemas.

Por fim, devido à importância do oxigénio nos processos aeróbios, dá-se especial relevo à utilização de pressão nestes processos, discutindo-se as consequências do aumento da pressão parcial de gases dissolvidos em culturas de levedura *Yarrowia lipolytica*.

2.1	O composto aromático $\gamma$ -decalactona	5
2.2	A levedura <i>Yarrowia lipolytica</i>	5
2.3	A via de produção de $\gamma$ -decalactona: $\beta$ -oxidação peroxisomal	5
2.4	Via de degradação de $\gamma$ -decalactona	5
2.5	Biotransformação em meios bifásicos	5
2.6	Transferência de massa gás-líquido	5
2.7	Determinação da capacidade de transferência de oxigénio	5
2.8	A pressão em biotecnologia	5

---

## 2.1 O composto aromático $\gamma$ -decalactona

As lactonas são moléculas que possuem um ciclo carbonado que comporta um átomo de oxigénio. Esta estrutura resulta da esterificação intramolecular (ou ciclização) de um ácido hidroxilado. As lactonas são muito interessantes na indústria alimentar devido ao seu aroma a fruta. Encontram-se naturalmente numa vasta variedade de alimentos (frutas, leite e seus derivados, carnes e alguns alimentos fermentados).

A produção de lactonas a partir de derivados de óleos por meio de leveduras tem sido efectuada a nível industrial. Geralmente, as patentes e artigos sobre este assunto descrevem a bioconversão<sup>1</sup> de um ácido gordo hidroxilado em que a posição do grupo hidroxilo (carbono  $\gamma$  ou carbono  $\delta$ ) determina que lactona será produzida ( $\gamma$  ou  $\delta$ ) (Feron, 1997).

A produção microbiana de lactonas resulta na mesma configuração enantiomérica das lactonas encontradas em pêssegos e noutros frutos (Schrader, 2004).

A lactona mais importante para aplicação aromática é a  $\gamma$ -decalactona ( $C_{10}H_{18}O_2$ ), com um volume de mercado de várias centenas de toneladas por ano. Tem um aroma a pêssego, um odor extraordinariamente persistente e um sabor muito forte a pêssego em concentrações abaixo dos 5 mg.L<sup>-1</sup>. No início dos anos 80, a  $\gamma$ -decalactona natural era um aroma raro e extremamente caro (> US\$ 10 000 Kg<sup>-1</sup>). A subsequente introdução e optimização de processos microbianos resultou numa descida de preço para aproximadamente US\$ 300 Kg<sup>-1</sup> e numa quota anual de mercado, de várias toneladas (Schrader, 2004).

É considerada como um aditivo alimentar GRAS (Generally Regarded As Safe) pela organização US Food and Drug Administration (Arctander, 1969).

O ácido ricinoleico (ácido 12-hidroxióctadec-9-enoico), é um ácido gordo hidroxilado C<sub>18</sub> que, na forma esterificada, é o maior constituinte (cerca de 80 %) do óleo de rícino (o que faz dele um composto abundante), sendo o precursor mais vulgarmente utilizado na produção de  $\gamma$ -decalactona. Esta pode ser produzida por biotransformação<sup>2</sup> a partir desse ácido hidroxilado por diversas espécies de microrganismos, principalmente por leveduras.

---

<sup>1</sup> Entenda-se por bioconversão, uma modificação bioquímica, compreendendo uma única etapa, de um precursor natural, para obter um composto pretendido.

<sup>2</sup> Entenda-se por biotransformação, uma modificação bioquímica, ao longo de várias etapas, de um precursor natural, para obter um composto pretendido.

O ácido ricinoleico é degradado por quatro ciclos sucessivos da  $\beta$ -oxidação em ácido-4-hidroxicanoico que lactoniza originando  $\gamma$ -decalactona (Gatfield, 1993). A produção de  $\gamma$ -decalactona a partir daquele ácido por leveduras do género *Candida*, foi inicialmente observada por Okui *et al.* (1963).

Embora vários compostos de lactona sejam produzidos por vários microrganismos, os processos com maiores concentrações de produto utilizam estirpes de *Yarrowia lipolytica*.

Por exemplo, usando uma estirpe auxotrófica em relação ao uracilo, geneticamente modificada de *Y. lipolytica*, designada PO1D, Nicaud *et al.* (1996) obtiveram uma produção elevada de  $\gamma$ -decalactona a partir de ricinoleato de metilo. No final da fase de crescimento, transferiram a biomassa concentrada para um meio de biotransformação com concentração limitada de uracilo. Após 75 horas, obtiveram 9.5 g de  $\gamma$ -decalactona.L<sup>-1</sup>.

Num processo de produção estabelecido por Haarmann e Reimer GmbH (H&R), na Alemanha, reportaram a obtenção de 11 g de  $\gamma$ -decalactona.L<sup>-1</sup> em 55 horas, com óleo de rícino em bruto como substrato, e sem utilizar uma estirpe geneticamente modificada (Schrader, 2004).

Outros organismos que realizam o mesmo processo, mas com rendimentos de produto muito menores, são *Monilia fructicola*, *Sporobolomyces odorus* e *Rhodotorula glutinis* (Schrader, 2004).

Foi estudada a produção de  $\gamma$ -decalactona com diferentes espécies de *Sporidiobolus*, como *Sporidiobolus salmonicolor*, *Sporidiobolus ruinenii*, *Sporidiobolus johnsonii* e *Sporidiobolus pararoseus* (Dufossé *et al.*, 1998). Estas estirpes revelaram-se muito sensíveis à  $\gamma$ -decalactona. Já a forma aberta, isto é, o ácido-4-hidroxicanoico, revelou-se menos tóxico para as leveduras. As concentrações obtidas de  $\gamma$ -decalactona em fermentações com estas leveduras foram sempre muito baixas (< 1 g.L<sup>-1</sup>).

Kümin e Münch (1997) usaram *Mucor circillenioides* em decanoato de etilo como substratos para a produção de  $\gamma$ -decalactona. Reportaram uma produção de 10.5 g de  $\gamma$ -decalactona.L<sup>-1</sup> após 60 horas.

Na Tabela 2.1 apresenta-se um resumo dos microrganismos, mencionados na literatura, capazes de produzir  $\gamma$ -decalactona.

Tabela 2.1 – Resumo dos microrganismos capazes de produzir  $\gamma$ -decalactona (adaptado de Aguedo, 2002).

<b>Bactérias</b>	<i>Lactococcus lactis</i>	Ambid <i>et al.</i> (1999)
	<i>Candida albicans</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. parakrusei</i> , <i>C. pseudotropicalis</i> , <i>C. rugosa</i> , <i>C. stellatoidea</i> , <i>C. tropicalis</i>	Farbood e Willis (1983); Farbood <i>et al.</i> (1990)
	<i>Candida molischiana</i> , <i>C. rhagii</i> , <i>C. intermedia</i> , <i>C. nemomendra</i> , <i>Malassezia furfur</i>	Endrizzi-Joran (1994)
	<i>Cladosporium suaveolens</i>	Cardillo <i>et al.</i> (1991)
	<i>Geotrichum fragrans</i> , <i>Geotrichum sp.</i>	Neto <i>et al.</i> (2004)
	<i>Hansenula saturnus</i>	Farbood e Willis (1983); Meyer (1993)
	<i>Pichia etchellsii</i>	Cardillo <i>et al.</i> (1990)
	<i>Pichia guilliermondii</i>	Pagot (1997); Endrizzi-Joran (1994)
	<i>Pichia ohmeri</i>	Ercoli <i>et al.</i> (1992)
<b>Leveduras</b>	<i>Pityrosporum sp.</i>	Labows <i>et al.</i> (1979)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Gatfield (1995); Boog <i>et al.</i> (1990); Ambid <i>et al.</i> (1999)
	<i>Sporidiobolus ruinenii</i> , <i>Sp. pararoseus</i> , <i>Sp. johnsonii</i> , <i>Candida tenuis</i>	Feron (1993)
	<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	Endrizzi-Joran (1994); Feron (1993)
	<i>Sporobolomyces odoratus</i>	Cheetham <i>et al.</i> (1988; 1993); Lee e Chou (1994); Haffner e Tressl (1996); Ambid <i>et al.</i> (1999)
	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Farbood e Willis (1983; 1985); Meyer (1993); Ambid <i>et al.</i> (1999); Nicaud <i>et al.</i> (1996); Pagot (1997); Rabenhorst e Gatfield (2000; 2001)
	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Geotrichum klebahnii</i>	Farbood e Willis (1983; 1985); Meyer (1993)
	<i>Ceratocystis moniliformis</i>	Lanza <i>et al.</i> (1976)
	<i>Fusarium moniliforme</i> , <i>Penicillium sp.</i> , <i>Streptomyces dimorphogenes</i> , <i>Claviceps purpurea</i>	Ambid <i>et al.</i> (1999)
	<i>Fusarium poae</i>	Sarris e Latrasse (1985); Latrasse <i>et al.</i> (1993); Spinnler <i>et al.</i> (1994)
<b>Fungos</b>	<i>G. ramanniana var. angulispora</i> , <i>Syncephalastrum racemosum</i>	Meyer (1993)
	<i>Mucor sp.</i>	Page e Eilerman (1989); Kumin e Münch (1998)
	<i>Phoma.</i> , <i>Thermomyces</i> , <i>Neurospora sp.</i>	Nozaki (1994)
	<i>Polyporus durus</i>	Berger <i>et al.</i> (1986)
	<i>Trichoderma harzianum</i>	Serrano-Carréon <i>et al.</i> (1997)
	<i>Tyromyces sambuceus</i>	Hädrich-Meyer e Berger (1994)

## 2.2 A levedura *Yarrowia lipolytica*

*Yarrowia lipolytica* é um microrganismo estritamente aeróbio, não patogénico, eucariótico, do reino Fungi, pertencente à classe dos Ascomycetes, subclasse Hemiascomycetes. Foi originalmente classificada como *Candida lipolytica*, uma vez que não foi descrito nenhum estado sexual, e depois reclassificada como *Endomycopsis lipolytica*, *Saccharomycopsis lipolytica* e, finalmente, *Yarrowia lipolytica* (Barth e Gaillardin, 1997).

Este microrganismo é uma das espécies de leveduras “não convencionais”<sup>3</sup> melhor estudada.

*Yarrowia lipolytica* é uma levedura que apresenta dimorfismo. Este refere-se à capacidade de os fungos crescerem em duas formas morfológicas distintas, geralmente como células ovais individuais, ou como hifas filamentosas, sendo reversíveis entre as duas formas. Dependendo das condições ambientais e nutricionais, pode crescer na forma de células ovais, pseudo-hifas ou hifas septadas. Acredita-se que o dimorfismo apresentado por esta levedura, assim como por outras espécies, constitui um mecanismo de resposta a condições adversas, tendo sido atribuído a mudanças na temperatura e condições nutricionais (Kawasse, 2003).

A morfologia das colónias é determinada tanto por condições de crescimento (arejamento, fontes de carbono e azoto, pH, concentração de oxigénio dissolvido no meio, etc.) bem como pelas características genéticas da estirpe (Cruz *et al.*, 2000).

Esta levedura é assim considerada um modelo adequado para o estudo de dimorfismo em leveduras, assim como para outras áreas de desenvolvimento celular e morfológico, pois é uma espécie susceptível a manipulação genética e possui um eficiente sistema de transformação (Szabo, 2001).

Devido à sua capacidade de produzir vários intermediários metabólicos biotecnologicamente importantes (entre os quais, ácidos orgânicos, lisina, proteases extracelulares, lipases, esterases, fosfatases e RNAses), à sua intensiva actividade secretora de proteínas e biossíntese de peroxissomas, *Yarrowia lipolytica* tem sido estudada desde meados do século XX (Szabo, 2001), justificando os esforços para a usar na indústria como biocatalisador, na biologia molecular e em estudos genéticos (Kawasse, 2003).

---

<sup>3</sup> O termo “não convencional” foi inicialmente usado para diferenciar este grupo de leveduras das mais frequentemente utilizadas – “convencionais” – e bem estudadas, *Saccharomyces cerevisiae* e, com algumas restrições, *Schizosaccharomyces pombe* (Wolf, 1996).

Como não é considerada patogénica, esta levedura já foi utilizada em aplicações industriais como na produção de proteínas unicelulares, aroma de pêssego e ácido cítrico, em processos considerados pela American Food and Drug Administration como GRAS (Tsugawa *et al.*, 1969).

O facto da gama de substratos utilizada pela *Yarrowia lipolytica* incluir alcanos, ácidos gordos, ácidos orgânicos, proteínas e alguns açúcares (principalmente glucose) também torna esta estirpe muito interessante. Apesar de alguns trabalhos terem reportado a inclusão de sacarose nessa gama de substratos (Nicaud *et al.*, 1989), algumas estirpes não apresentam actividade invertásica detectável (Pereira-Meirelles *et al.*, 1997).

A levedura *Yarrowia lipolytica* é capaz de transformar o ácido ricinoleico em  $\gamma$ -decalactona. Como a maioria das leveduras capazes de realizar esta biotransformação, também é capaz de degradar a lactona produzida.

Graças à sua maquinaria enzimática excepcional de degradação lipídica, esta espécie foi escolhida para estudar esta degradação. A via de biotransformação envolve a  $\beta$ -oxidação e requer a lactonização a nível do C<sub>10</sub> (quando o grupo hidroxilo se encontra na posição  $\gamma$ ) (Waché *et al.*, 2003).

### 2.3 A via de produção de $\gamma$ -decalactona: $\beta$ -oxidação peroxisomal

A via metabólica da levedura envolvida na biotransformação foi proposta por Okui *et al.* (1963). Estes autores identificaram em *Candida* a presença de intermediários que comportavam 18 a 8 carbonos, derivados do catabolismo do ácido ricinoleico (Figura 2.1). Admitiram a hipótese da degradação do ácido ricinoleico em ácido 4-hidroxicanoico (precursor directo da  $\gamma$ -decalactona) ser realizada pelas enzimas da  $\beta$ -oxidação, via exclusivamente peroxisomal nas leveduras. Os mesmos intermediários foram evidenciados em *Yarrowia lipolytica* (Gatfield *et al.*, 1993) e em *Sporidiobolus ruinenii* (Spinnler *et al.*, 1996).

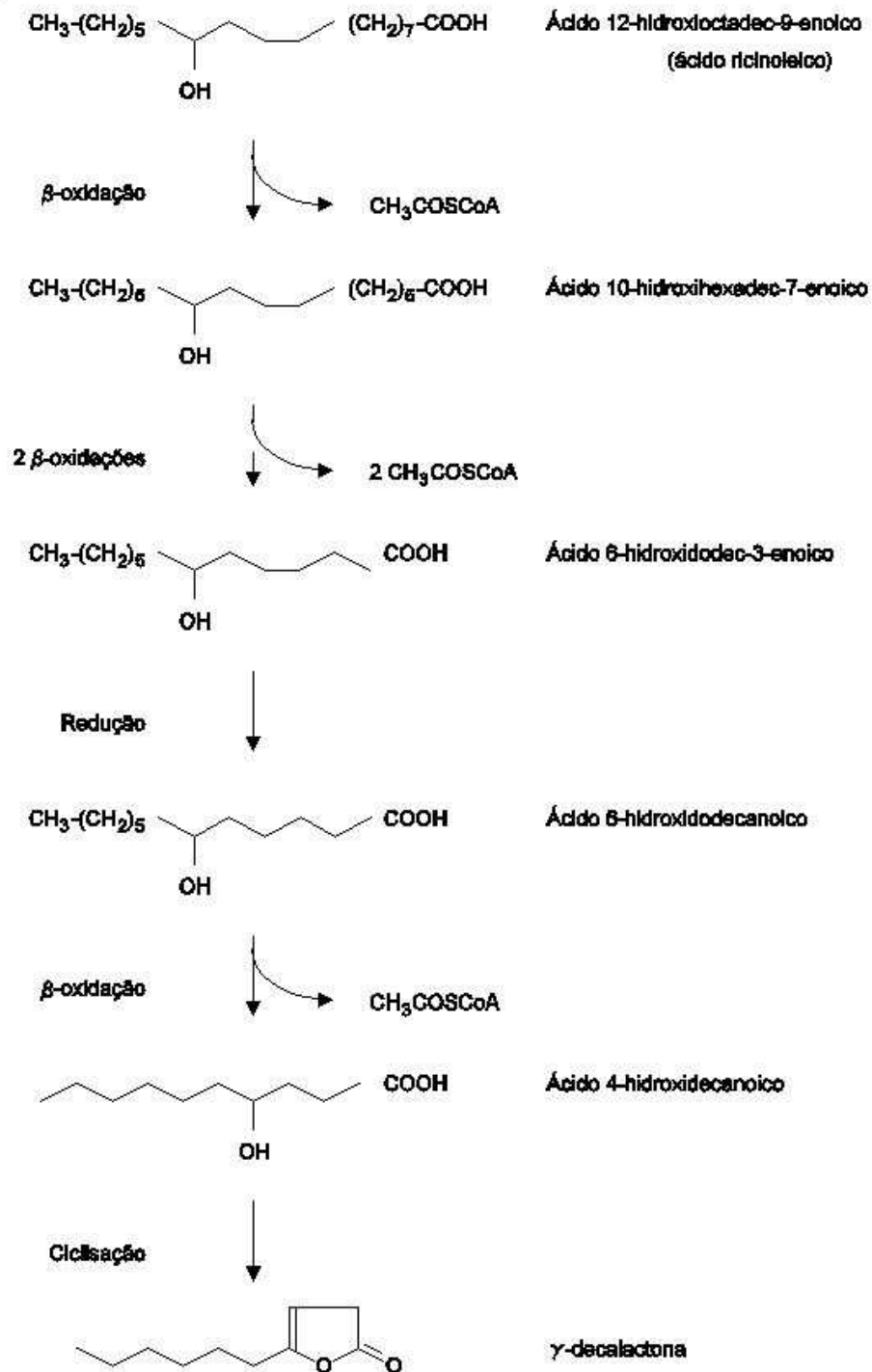


Figura 2.1 – Intermediários da degradação do ácido ricinoleico por  $\beta$ -oxidação e síntese da  $\gamma$ -decalactona (adaptado de Blin-Perrin *et al.*, 2000).

A  $\beta$ -oxidação é um sistema de oxidação cíclica de ácidos gordos que consiste numa sequência de quatro etapas, repetida várias vezes, geralmente até à degradação do substrato em unidades de acetil-CoA.



Os ácidos gordos, antes de entrarem nos peroxisomas, são activados no citoplasma em ésteres de coenzima A, por acção de uma acetil-CoA sintetase. A  $\beta$ -oxidação é catalisada, nos peroxisomas das leveduras, pela acetil-CoA oxidase e depois, por duas actividades de uma enzima multifuncional, 2-enoil-CoA hidratase e 3-hidroxiacetil-CoA desidrogenase, e pela 3-cetoacetil-CoA tiolase (Figura 2.2).

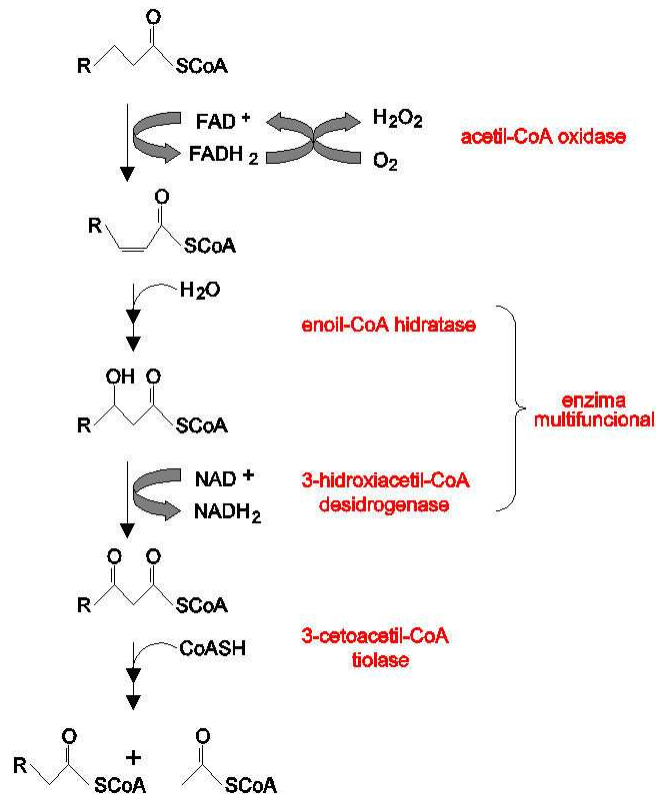


Figura 2.2 – Enzimas da  $\beta$ -oxidação peroxisomal na levedura (adaptado de Waché *et al.*, 1998).

Um ciclo de  $\beta$ -oxidação de um ácido gordo termina com a diminuição da molécula de 2 carbonos da posição  $\beta$  e com a libertação de uma acetil-CoA (Figura 2.2).

A levedura *Yarrowia lipolytica* apresenta a particularidade de possuir uma família de cinco membros de acetil-CoA oxidases (Aox1p a Aox5p, codificadas pelos genes POX1 a POX5), a enzima que catalisa a primeira reacção da  $\beta$ -oxidação, algumas das quais são específicas de cadeias longas (Aox2p) (Wang *et al.*, 1999) ou específicas de cadeias curtas (Aoxp3) (Luo *et al.*, 2000; 2002). A especificidade resulta apenas de um pequeno número de aminoácidos.

O papel de cada uma dessas enzimas na degradação dos ácidos gordos pode ser estudada graças à obtenção de estirpes mutantes em que um ou mais genes foram retirados ou amplificados. A compreensão dos papéis específicos de cada acetil-CoA oxidase é importante para construir uma estirpe de levedura que cresça a uma boa taxa e seja capaz de produzir, sem degradar, o composto aromático  $\gamma$ -decalactona (Groguenin, 2004).

## 2.4 Via de degradação de $\gamma$ -decalactona

As concentrações de  $\gamma$ -decalactona obtidas a partir da biotransformação do ricinoleato de metilo (RM) são bastante baixas, raramente atingindo valores acima de 4-5 g.L<sup>-1</sup>. Há duas hipóteses para essas baixas concentrações. Primeiro, a levedura pode reconsumir a lactona à medida que é sintetizada. Segundo, só uma parte do ricinoleato de metilo é oxidado para o nível C<sub>10</sub>, e o produto do nível C<sub>10</sub> serve de precursor para várias lactonas. Muitas hipóteses foram propostas para explicar o reconsumo, todas envolvendo a  $\beta$ -oxidação, algumas incluindo  $\omega$ -oxidação ou deslactonização, como etapas iniciais ou limitantes. Os fluxos da  $\beta$ -oxidação ainda não estão bem esclarecidos. Na  $\beta$ -oxidação peroxisomal, que é utilizada por leveduras, podem-se acumular intermediários, dependendo do substrato e das concentrações de CoA (Figura 2.3) (Waché *et al.*, 2001).

Gatfield *et al.* (1993) observaram, com a levedura *Yarrowia lipolytica*, o desaparecimento concomitante de  $\gamma$ -decalactona e a acumulação de 3-hidroxi- $\gamma$ -decalactona e decen-4-olidos, diminuindo os rendimentos. Colocaram a hipótese do ácido 4-hidroxi-decanoico sofrer uma oxidação seguida de uma hidratação, terminando em ácido 3,4-dihidroxi-decanoico, que se lactoniza em 3-hidroxi- $\gamma$ -decalactona (composto sem propriedades sensoriais). A desidratação deste último composto permite a formação de dois decenolidos, dec-2-en-4-olido (composto com aroma a fungos) e dec-3-en-4-olido (composto com aroma a fruta). As concentrações destes compostos no meio variam principalmente com a actividade das enzimas acetil-CoA oxidase e 3-hidroxiacetil-CoA desidrogenase. Assim, quando uma destas enzimas possui uma actividade reduzida, limita o fluxo da via da  $\beta$ -oxidação, exercendo controlo na via, pelo que ocorrerá acumulação dos compostos que estão directamente relacionados com a sua actividade, nomeadamente de  $\gamma$ -decalactona, cuja acumulação está relacionada com a actividade da acetil-CoA oxidase, e de 3-hidroxi- $\gamma$ -decalactona, cuja acumulação está relacionada com a actividade da 3-hidroxiacetil-CoA desidrogenase. A formação de dec-2-en-4-olido pode ainda resultar da acção directa da

enzima enoil-CoA hidratase (Figura 2.3). De forma idêntica, se esta enzima possuir baixa actividade, controla o fluxo da via a este nível, tornando-se a enzima limitante da via, o que vai permitir a acumulação de dec-2-en-4-olido (Waché *et al.*, 2002).

Endrizzi-Joran (1994) observou que estirpes de *Candida spp.* com ou sem indução de peroxissomas degradavam a  $\gamma$ -decalactona da mesma forma. Sugeriu que, em virtude de só as estirpes que continham o citocromo P-450 conseguirem reconsumir  $\gamma$ -decalactona, ocorria  $\omega$ -oxidação antes, seguida da  $\beta$ -oxidação (Waché *et al.*, 2001).

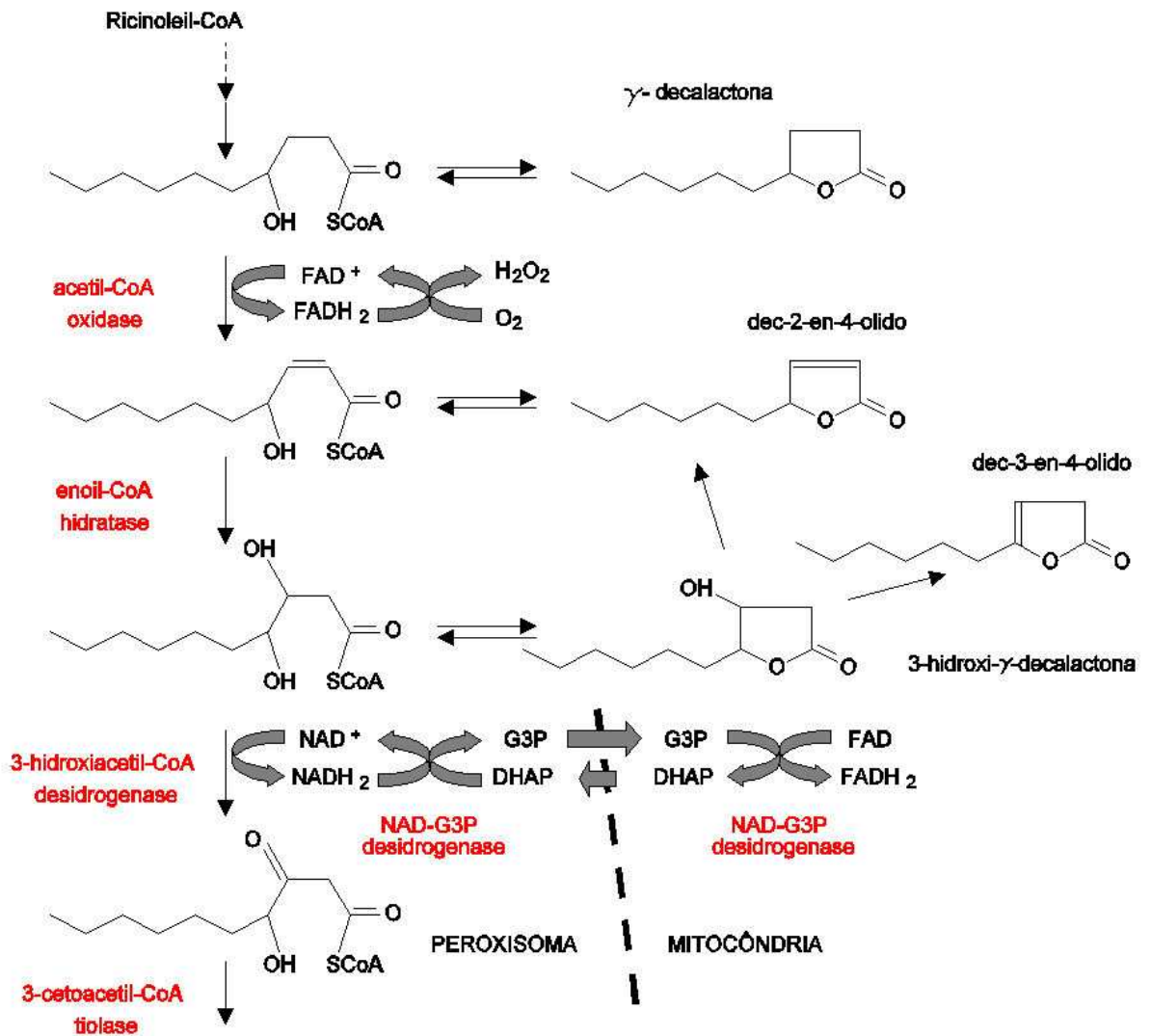


Figura 2.3 – Potenciais intermediários da  $\beta$ -oxidação do ricinoleato de metilo ao nível C<sub>10</sub> (adaptado de Waché *et al.*, 2001).

## 2.5 Biotransformação em meios bifásicos

O meio de biotransformação utilizado neste trabalho é bifásico, contendo ricinoleato de metilo (RM) que, tal como já foi referido, constitui cerca de 80 % do óleo de rícino. Este meio, agitado mecanicamente, não forma uma emulsão estável, pelo que é necessária a presença de um emulsionante para favorecer a miscibilidade das duas fases e para aumentar as transferências entre o meio e as leveduras. Os agentes tensio-activos, também denominados surfactantes, favorecem a dispersão aquosa dos compostos hidrofóbicos e podem melhorar a sua assimilação pelos microrganismos (Zhang e Miller, 1992).

### 2.5.1 Surfactantes

Os surfactantes constituem uma classe importante de compostos químicos amplamente utilizados em diversos sectores industriais (Nitschke e Pastore, 2002).

Os agentes emulsionantes ou tensio-activos podem ser de origem comercial, ajustando-se ao meio de biotransformação ou ainda de origem biológica, sendo sintetizados naturalmente pelas células.

Os surfactantes são moléculas anfipáticas constituídas por um grupo apolar hidrofóbico e um polar hidrofílico. O grupo apolar é frequentemente uma cadeia hidrocarbonada, enquanto o polar pode ser iónico (aniónico ou catiónico), não-iónico, ou anfotérico (Nitschke e Pastore, 2002).

Em função da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os surfactantes tendem a distribuir-se nas interfaces entre fases líquidas com diferentes graus de polaridade (óleo-água e água-óleo). A formação de um filme molecular, ordenado nas interfaces, reduz a tensão interfacial e superficial, sendo responsável pelas propriedades únicas dos surfactantes (Nitschke e Pastore, 2002). A tensão superficial surge nos líquidos como resultado do desequilíbrio entre as forças agindo sobre as moléculas da superfície em relação àquelas que se encontram no interior da solução (Behring *et al.*, 2004).

Aguedo (2002) testou vários surfactantes (Tween 80, Triton X-100 e Saponina, com carácter neutro; SDS, com carácter aniónico; e CTAB, com carácter catiónico) para averiguar o seu efeito na viabilidade das leveduras, na interacção com as suas membranas, na emulsão, na hidrofobicidade da superfície das leveduras e na biotransformação. Concluiu que o Tween 80 era o surfactante ideal, visto ter sido o composto que permitiu obter maior produção de  $\gamma$ -decalactona. Para além disso, não interferiu na viabilidade das leveduras e não interagiu com as suas membranas, conferindo ao meio a maior superfície interfacial, e às células, a

maior hidrofobicidade relativa, entre todos os compostos testados. A produção de  $\gamma$ -decalactona obtida com concentrações testadas de 0.1 % e 0.2 % de Tween 80 foi da mesma ordem, porém a hidrofobicidade conferida às células foi superior no segundo caso e a superfície interfacial da emulsão foi muito semelhante nos dois casos.

Assim, o meio com RM que permite obter a melhor produção de  $\gamma$ -decalactona é o que contém 0.1 % de Tween 80. Este composto é de natureza neutra e, tal como já foi referido, possui um grupo polar hidrofílico e um apolar hidrofóbico.

Quando os compostos tensio-activos se encontram em solução, devido à presença do grupo lipofílico, ocupam preferencialmente a superfície do líquido, diminuindo a força de coesão entre as moléculas do solvente, e consequentemente, diminuindo a tensão superficial, permitindo que a fase orgânica se espalhe melhor na aquosa. Entretanto, após saturar a superfície, a adição de novas moléculas do composto tensio-activo praticamente não tem efeito sobre o valor da tensão superficial (Behring *et al.*, 2004).

### 2.5.2 Interação lípidos-leveduras

O crescimento das leveduras num meio com lípidos é influenciado pelo tamanho das bolhas da emulsão: quanto mais pequeno for o seu tamanho, maior é a taxa de crescimento (Bakhuis e Bos, 1969). A superfície interfacial das bolhas aumenta de forma inversa ao tamanho da emulsão, parecendo que a superfície entre as duas fases é um factor determinante para a degradação do substrato hidrofóbico e para o crescimento das leveduras. O tamanho das bolhas lipídicas é influenciado por numerosos parâmetros que podem estar ligados às características físico-químicas do meio (pH, força iónica, presença de agentes tensio-activos, etc.) (Wilde, 2000) ou dos microrganismos (tamanho do inóculo, concentração celular, propriedades da superfície das células, etc.). Durante a biotransformação do RM em  $\gamma$ -decalactona pela levedura *Yarrowia lipolytica*, ocorre um contacto directo entre a superfície das células e pequenas bolhas de substrato. Esse contacto pode assumir duas formas: pela aderência das células sobre a superfície das bolhas lipídicas de maior tamanho, ou pela adsorção de microbolhas na superfície das leveduras (Bakhuis e Bos, 1969). A assimilação dos lípidos poderá ocorrer por difusão ou transporte activo a partir dos pontos de contacto entre as leveduras e os lípidos. Para que a adesão seja possível, a superfície celular deve apresentar uma afinidade para a fase lipídica, ou seja, ter globalmente, ou parcialmente, um carácter hidrofóbico, ou que o meio contenha agentes emulsionantes que se situem nas interfaces, com propriedades hidrofóbicas e hidrofílicas, como é o caso do emulsionante

utilizado, o Tween 80. A hidrofobicidade da superfície das células é considerada como um dos factores mais importantes na assimilação de compostos hidrofóbicos (Kim *et al.*, 2000). Assim, o papel dos agentes emulsionantes é primordial para uma degradação óptima dos lípidos. As propriedades da superfície das bactérias ou leveduras revelam-se determinantes. Na interacção entre os microrganismos e os lípidos interferem forças de van der Waals. Parece também que outros factores físico-químicos podem intervir nas interacções entre as leveduras e os lípidos, como o carácter ácido-base de Lewis das células (Aguedo *et al.*, 2003) ou as propriedades hidrostáticas das células (van der Mei *et al.*, 1995; Bellon-Fontaine *et al.*, 1996; Pelletier *et al.*, 1997).

## 2.6 Transferência de massa gás-líquido

Os processos que envolvem a cultura de microrganismos e acumulação de produtos, são frequentemente influenciados pela taxa de transferência de oxigénio (*OTR*) no meio de cultura, principalmente no caso dos microrganismos aeróbios, como é o caso da levedura *Yarrowia lipolytica*.

Em processos aeróbios, o oxigénio é um substrato fundamental e devido à sua baixa solubilidade em soluções aquosas, é necessária uma transferência contínua de oxigénio da fase gasosa para a líquida, de modo a manter o metabolismo oxidativo das células (Nielsen e Villadsen, 1994). Genericamente, a variação da concentração do oxigénio dissolvido num reactor aeróbio é descrita pela equação de balanço de massa (Equação 2.1).

$$\frac{dO}{dt} = OTR - OUR \quad (2.1)$$

Sendo:

$O$ , a concentração de oxigénio dissolvido no reactor

$t$ , o tempo

$OTR$ , a taxa de transferência de oxigénio

$OUR$ , a taxa de consumo de oxigénio

Enquanto a taxa de transferência de oxigénio para o meio exceder a taxa de consumo de oxigénio pelas células ( $OUR$ ) e mais nenhum nutriente for limitante, o crescimento celular prossegue a uma taxa exponencial.

A taxa de consumo de oxigénio pelas células depende da densidade celular ( $X$ ) e da taxa específica de consumo de oxigénio ( $q_{O_2}$ ), como indicado na Equação 2.2.

$$OUR = q_{O_2} \cdot X \quad (2.2)$$

A uma concentração celular crítica, o oxigénio pode deixar de ser fornecido ao meio de forma suficientemente rápida para responder às necessidades de oxigénio. Nestas condições, o oxigénio torna-se o nutriente limitante para o crescimento celular, sendo responsável por baixas densidades celulares e por reduzidas produtividades (Junker *et al.*, 1990a). Devido a este impacto crucial na produtividade, foram propostas várias soluções para aumentar as taxas de transferência de oxigénio da fase gasosa para o meio líquido como, por exemplo, através do projecto de diferentes geometrias do biorreactor, das velocidades de agitação, das taxas de arejamento, do uso de diferentes tipos de dispersores ou do uso de ar enriquecido com oxigénio puro (Junker *et al.*, 1990a). A atenção virou-se também para o aumento da pressão parcial da fase gasosa para aumentar a transferência de oxigénio para as células no meio, o que é conseguido pela adição de oxigénio puro fornecido ao biorreactor, ou pelo aumento da pressão total de ar (Yang e Wang, 1992). Nestas condições, as necessidades de oxigénio de uma dada cultura podem ser satisfeitas com baixos valores de  $K_La$  e, conseqüentemente, com reduzido atrito hidrodinâmico, que resulta das tensões de corte provocadas por elevadas velocidades de agitação (Henzler e Kauling, 1993). Vários investigadores demonstraram a existência de limites de tolerância dos microrganismos às tensões de corte (Toma *et al.*, 1991; Märkl *et al.*, 1991).

A transferência de massa de oxigénio depende das propriedades físicas do fluido, temperatura, pressão, composição da solução, agitação, velocidade superficial do gás e da configuração do reactor e do seu interior (Baldwin, 2000). A taxa de transferência de oxigénio é dependente do coeficiente global volumétrico de transferência de oxigénio,  $K_La$ , que é o produto do coeficiente de transferência de oxigénio na fase líquida,  $K_L$ , pela área interfacial gás-líquido,  $a$ , e da força directriz devida à diferença entre o oxigénio dissolvido e as condições de saturação (Tribe *et al.*, 1995; Rols *et al.*, 1990).

$$OTR = K_La(O^S - O) \quad (2.3)$$

Sendo:

$K_La$ , o coeficiente global volumétrico de transferência de oxigénio

$O^s$ , a concentração de saturação de oxigénio dissolvido

Para um biorreactor de desenho já otimizado, é possível aumentar o  $K_La$  e, conseqüentemente a  $OTR$ , pela utilização de velocidades de agitação e caudais de arejamento elevados, podendo ser correlacionado de acordo com a Equação 2.4.

$$K_La = \delta \cdot \left( \frac{P_g}{V} \right)^\alpha \cdot (v_s)^\beta \quad (2.4)$$

Sendo:

$K_La$ , o coeficiente global volumétrico de transferência de oxigénio ( $h^{-1}$ )

$P_g$ , a potência necessária para o biorreactor arejado (W)

$V$ , o volume de trabalho do biorreactor ( $m^3$ )

$v_s$ , a velocidade superficial do gás ao longo do biorreactor ( $m.s^{-1}$ )

$\delta$ ,  $\alpha$  e  $\beta$ , constantes empíricas a determinar

Porém, a utilização de valores elevados de  $K_La$  por variação destes parâmetros acarreta um elevado consumo energético, aumentando significativamente os custos de operação. Outra limitação da utilização de agitações e arejamentos elevados consiste na sensibilidade das células ao atrito hidrodinâmico gerado pela excessiva turbulência.

A adição de uma segunda fase líquida imiscível ao meio aquoso, com elevada solubilidade de oxigénio, aumenta a solubilidade deste no meio, permitindo aumentar a taxa de transferência de oxigénio da fase gasosa para os microrganismos, sem ser necessário um fornecimento extra de energia (Tabela 2.2).

A coexistência de uma fase orgânica no meio de cultura e de uma fase aquosa, onde estão presentes nutrientes e células, torna o sistema mais complicado do ponto de vista de transferência de oxigénio. Para estudar o fenómeno inerente ao efeito da adição de uma fase líquida imiscível na taxa de transferência de um gás num sistema gás-líquido, considera-se necessário separar os efeitos da área interfacial,  $a$ , dos do coeficiente de transferência de massa na fase líquida,  $K_L$  (Cents, 2001).

Vários mecanismos foram propostos para explicar os resultados experimentais, com base no efeito do aumento da transferência do gás. Na literatura foram sugeridos dois tipos de



mecanismos. O primeiro mecanismo baseia-se na ideia de que as gotas da fase dispersa entram no filme de transferência de massa na interface gás-líquido, aumentando a transferência do gás devido à sua elevada solubilidade para o componente da fase gasosa a ser transferido (Cents, 2001). O segundo mecanismo proposto para descrever o aumento da transferência de massa é o mecanismo coalescência/re-dispersão, que é baseado no contacto directo entre o gás e a fase dispersa pela formação de complexos gás-líquido (Rols *et al.*, 1990). A taxa de transferência do gás é assim aumentada devido à introdução desta segunda via de transferência (Cents, 2001).

As reacções que envolvem sistemas com três fases são frequentemente encontradas na indústria de processos químicos. Em geral, a terceira fase (sólida ou líquida) dispersa num sistema gás-líquido pode ser um reagente, substrato ou um catalisador heterogéneo (Dumont e Delmas, 2003). Embora a maioria dos trabalhos se dediquem a reacções gás-líquido-sólido, as reacções gás-líquido-líquido têm ganho muita importância devido ao aumento deste tipo de aplicações na indústria de bioprocessos, nomeadamente em áreas em que uma fase líquida inerte é adicionada com o objectivo de aumentar a taxa de transferência de massa do sistema gás-líquido (Cents, 2001). Na transferência de massa gás-líquido, tanto o reagente gasoso como o líquido têm que se dissolver na fase aquosa, originando possíveis limitações da transferência de massa gás-líquido e líquido-líquido (Lekhal, 1997). Pode, no entanto, ocorrer uma situação muito interessante na presença de pequenas partículas sólidas ou quando o segundo líquido está bem emulsionado na fase aquosa e a solubilidade do gás na fase orgânica é maior do que na fase aquosa. Nestes casos, a presença de partículas sólidas ou de gotas de fase orgânica podem aumentar significativamente a taxa de transferência de gás na fase aquosa (Dumont e Delmas, 2003).

Os resultados experimentais publicados na literatura mostram que o valor de  $K_L a$  pode aumentar, manter-se constante ou diminuir após adição de uma segunda fase líquida com maior solubilidade para o componente a ser transferido.

Na Tabela 2.2 apresenta-se um resumo das investigações em sistema gás-líquido-líquido em que se determinou a variação no  $K_L a$ . Em alguns casos, alguns investigadores separaram o efeito da adição da fase líquida orgânica dispersa na área interfacial,  $a$ , do efeito no coeficiente de transferência de massa,  $K_L$ .

Tabela 2.2– Resumo das investigações realizadas em sistemas gás-líquido-líquido, com determinações de  $K_L a$ ,  $K_L$  e/ou  $a$ , em que ↗, ↘ e →, significam aumento, decréscimo e manutenção dos valores das determinações, respectivamente.

Autores	Tipo de absorção	Condições de operação				Resultados		
		Fase aquosa	Fase orgânica	Fracção fase orgânica	Fase gasosa	$K_L a$	$K_L$	$a$
Sharma e Mashelkar (1968)	Com reacção química	NaOH	2-Etil-hexanol	0 - 0.15	CO <sub>2</sub>	↘	↘	↗
Mehta e Sharma (1971)	Com reacção química	NaOH	2-Etil-hexanol	0 - 0.15	CO <sub>2</sub>			↗
Das <i>et al.</i> (1985)	Com reacção química	NaOH	Tolueno MIBK 2-Etil-hexanol	0 - 0.5 0 - 0.5 0 - 0.5	CO <sub>2</sub>			↗ ↘
Linek e Benes (1976)	Com reacção química	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	n-Alcanos Ácido oleico	0 - 1 0 - 1	O <sub>2</sub> Árgon		→	↘
Cents <i>et al.</i> (2001)	Com reacção química	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> / KHCO <sub>3</sub>	Tolueno n-Dodecano n-Heptano 1-Octanol	0 - 0.4	CO <sub>2</sub>	↘ ↗		
Yoshida <i>et al.</i> (1970)	Física	Água	Querosina Parafina Tolueno Ácido oleico	0.01 - 0.2 0.01 - 0.21 0.01 - 0.2 0.0001 - 0.22	O <sub>2</sub>	↘ ↗		
Hassan e Robinson (1977)	Física	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	n-Dodecano n-Hexadecano	0 - 0.1 0 - 0.1	O <sub>2</sub>	↗ → ↘ ↗ →		
Lekhal <i>et al.</i> (1997), Lekhal (1998)	Física	Água	Octano	0 - 0.3	H <sub>2</sub>	↗ ↘		
MacMillan e Wang (1987, 1990)	Física, em sistemas biológicos	Água	PFC40	0.1 - 0.425	O <sub>2</sub>			→
Ju <i>et al.</i> (1991)	Física, em sistemas biológicos	Água	PFC40 PFC77	0.15 - 0.25	O <sub>2</sub>	↘		
Van der Meer <i>et al.</i> (1992)	Física, em sistemas biológicos	Água	n-Octano	0 - 0.11	O <sub>2</sub>	→		
Rols <i>et al.</i> (1990)	Física, em sistemas biológicos	Água	n-Dodecano	0 - 0.33	O <sub>2</sub>	↗ ↘		

A grande diversidade de resultados pode ser devida parcialmente à variedade dos sistemas gás-líquido-líquido assim como às definições dos parâmetros de transferência de massa.

## 2.7 Determinação da capacidade de transferência de oxigénio

A determinação de  $OTR$  e  $K_{La}$  é fundamental para a caracterização de biorreactores em processos aeróbios. Através destes parâmetros é possível estabelecer o arejamento óptimo e quantificar os efeitos de cada um dos factores que influenciam a transferência de oxigénio (Stanbury e Whitaker, 1984).

Idealmente, a taxa de transferência de oxigénio deve ser avaliada num biorreactor, incluindo o meio de cultura e a população de células de interesse (Bailey e Ollis, 1986). No entanto, nem todos os métodos disponíveis são aplicáveis a sistemas com culturas activas.

Existem diversas formas de determinar o coeficiente global de transferência de oxigénio num biorreactor. Os métodos tradicionais mais utilizados dividem-se em dois tipos, com base no estado em que são realizados: estado transiente e estado estacionário (Stanbury e Whitaker, 1984). Neste trabalho só foram realizados métodos em estado transiente, pelo que os restantes apenas serão vagamente referidos.

### 2.7.1 Métodos em estado transiente

Estes métodos, também conhecidos como “métodos de degaseificação”, baseiam-se na introdução de uma perturbação nas condições de arejamento do sistema, monitorizando-se a consequente alteração na concentração de oxigénio dissolvido.

De forma a medir o oxigénio dissolvido sobre uma gama de valores adequados, é necessário, numa primeira fase, diminuir o oxigénio até um valor baixo. Existem dois métodos que permitem atingir esta diminuição: o método estático e o dinâmico. A aplicação destes dois métodos exige a monitorização da concentração do oxigénio dissolvido através de uma sonda de oxigénio, razão pela qual foram utilizados apenas na caracterização do biorreactor Biolab, uma vez que no biorreactor Parr não é possível a introdução de uma sonda.

### 2.7.1.1 Método estático

Este método, inicialmente proposto por Wise (1951), permite avaliar o efeito das variáveis de operação (velocidade de agitação e caudal de arejamento) na eficiência da transferência de oxigénio.

Neste método, o oxigénio presente no meio é inicialmente removido através da introdução de azoto. De seguida, o meio é novamente arejado e agitado, sendo a concentração de oxigénio dissolvido monitorizada.

O método baseia-se na equação de balanço material ao oxigénio (Equação 2.5) que, na ausência de células e em modo descontínuo, se reduz à igualdade entre a variação no tempo da concentração de oxigénio dissolvido e da taxa de transferência de oxigénio do gás para o líquido.

$$\frac{dO}{dt} = K_L a (O^s - O) \quad (2.5)$$

A forma integrada desta equação permite a obtenção do valor de  $K_L a$ , o qual é igual ao simétrico do declive da recta resultante da representação de  $\ln (O^s - O)$  em função de  $t$  (Stanbury e Whitaker, 1984).

### 2.7.1.2 Método dinâmico

Na presença de células activas e na ausência de arejamento, Taguchi e Humphrey (1966) utilizaram a actividade respiratória dos microrganismos para removerem o oxigénio do meio. Este método tem a vantagem de ser realizado durante uma fermentação fornecendo um resultado mais realista do  $K_L a$ .

O procedimento envolve duas etapas, uma de paragem do arejamento e outra de retoma do arejamento nas condições de operação. Assim, na primeira etapa, a monitorização do decréscimo da concentração de oxigénio dissolvido permite determinar a taxa específica de consumo de oxigénio através da Equação 2.6.

$$\frac{dO}{dt} = -OUR \quad (2.6)$$

O arejamento é retomado antes de ser atingido o valor crítico da concentração de oxigénio, valor abaixo do qual o consumo de oxigénio é limitado. Segundo Tribe *et al.* (1995) é aconselhável retomar o arejamento, quando se atinge 1.5 vezes o valor da concentração crítica para uma dada estirpe. Isto limita a aplicabilidade do método a culturas com elevadas necessidades de oxigénio, próximas da capacidade máxima de transferência do sistema, onde a concentração de oxigénio dissolvido está próxima da concentração crítica.

A necessidade em oxigénio do microrganismo depende da natureza bioquímica da célula e do seu ambiente nutricional. Porém, quando o nível de oxigénio dissolvido no meio é menor do que a concentração crítica de oxigénio, a taxa específica de consumo de oxigénio é também dependente da concentração de oxigénio. Pelo contrário, quando a concentração de oxigénio na fase líquida é maior do que a concentração crítica de oxigénio, a taxa de consumo de oxigénio é independente da concentração de oxigénio.

O valor da concentração crítica de oxigénio depende do microrganismo e do substrato utilizado. Segundo Bailey e Ollis (1986) a concentração crítica de oxigénio para leveduras é de  $0.12 \text{ mg.L}^{-1}$  a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  e de  $0.15 \text{ mg.L}^{-1}$  a  $34.8 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Após o reinício do arejamento (2ª etapa), o balanço de massa ao oxigénio na fase líquida é expresso pela Equação 2.7.

$$\frac{dO}{dt} = K_L a(O^S - O) - OUR \quad (2.7)$$

Considerando o estado pseudo-estacionário imediatamente antes da determinação,  $OUR$  pode ser substituído por:

$$K_L a(O^S - O_i) = OUR \quad (2.8)$$

Em que  $O_i$  é a concentração de oxigénio dissolvido no início da determinação.

Integrando-se em seguida a Equação 2.7, resulta:

$$\ln\left(\frac{O_i - O}{O_i - O_0}\right) = -K_L a(t - t_0) \quad (2.9)$$

Sendo  $O_0$  e  $t_0$  a concentração de oxigénio dissolvido e o tempo, respectivamente, quando o arejamento é retomado.

A representação do termo do lado esquerdo da Equação 2.9, em função do tempo, origina uma recta cujo declive é  $-K_L a$ .

Tribe *et al.* (1995) demonstraram que a utilização da Equação 2.9 no cálculo de  $K_L a$  introduz menos erros do que a utilização de outros arranjos da Equação 2.7, que envolvam a derivada no tempo da resposta da sonda de oxigénio.

## 2.7.2 Métodos em estado estacionário

### 2.7.2.1 Método da oxidação do sulfito

Este método envolve uma reacção química rápida que consome o oxigénio, neste caso utiliza-se a oxidação do  $SO_3^{2-}$  a  $SO_4^{2-}$  (Equação 2.10).

A concentração de oxigénio no meio é praticamente nula enquanto é medido o decréscimo da concentração do reagente, isto é do sulfito.



### 2.7.2.2 Método dos balanços

Este método baseia-se no balanço global à fase gasosa (Equação 2.11), envolvendo a determinação da composição do gás à entrada e à saída do biorreactor. A determinação do  $K_L a$  requer a medida da concentração do oxigénio dissolvido no meio.

$$OTR = K_L a (O^S - O) \quad (2.11)$$

## 2.8 Pressão moderada em biotecnologia

O adequado fornecimento de oxigénio a culturas densas de microrganismos aeróbios constitui um dos factores determinantes na optimização de muitos bioprocessos. Dada a baixa solubilidade do oxigénio nos meios de cultura, por vezes torna-se necessário o aumento da

pressão parcial de oxigénio acima dos 210 mbar (valor correspondente a 1 bar de pressão total de ar) quer pela adição de oxigénio puro ao ar que alimenta o biorreactor (Lee *et al.*, 1997) quer pelo aumento da pressão total do sistema (Yang e Wang, 1992; Belo *et al.*, 2003). Contudo, em muitos casos, o aumento da pressão parcial de oxigénio poderá originar problemas de toxicidade para as células e inibir o seu crescimento, assim como a formação de produtos, pelo que se torna necessário aprofundar o conhecimento destes efeitos, para ser possível e viável a sua transposição para a escala industrial (Onken e Liefke, 1989).

### 2.8.1 Efeito da pressão nos microrganismos

Segundo Belo *et al.* (1996), a utilização de biorreactores pressurizados apresenta potencial interesse de aplicação industrial, pelo que o estudo a nível laboratorial dos efeitos de pressões moderadas sobre o comportamento dos microrganismos reveste-se de grande importância. Os seus efeitos em culturas celulares são muito variados e de difícil explicação, já que dependem de vários factores, como da estirpe microbiana, do modo e das condições de cultura e, principalmente, da composição da fase gasosa. O tipo de gases envolvidos nos processos e os efeitos de variação das respectivas concentrações em solução são tanto ou mais importantes que os efeitos de pressão total (Belo, 1999). Assim, um comportamento encontrado pode não ser um resultado directo da pressão total, mas sim das pressões parciais dos componentes gasosos envolvidos no processo. Nos processos aeróbios, estão envolvidos dois gases diferentes, o oxigénio e o dióxido de carbono, tendo grande influência no metabolismo celular. Enquanto que o primeiro é um nutriente indispensável à respiração, o último é basicamente um produto das actividades metabólicas das células. Assim, deve-se ter em conta o efeito das pressões parciais destes dois compostos (Onken e Liefke, 1989).

Especial atenção tem sido prestada aos efeitos da pressão parcial CO<sub>2</sub> dado que este gás é bastante mais solúvel que o oxigénio em soluções aquosas (Knoll *et al.*, 2005).

O efeito da pressão sobre o crescimento e o metabolismo dos microrganismos depende também dos métodos e sistemas de pressurização utilizados. A pressão pode ser aplicada hidrostáticamente (compressão de um líquido) e hiperbaricamente (compressão de gases).

A pressões baixas (que constituem a maioria dos processos industriais), a solubilidade de um gás num líquido, pode ser obtida usando uma relação muito útil, conhecida como lei de Henry (Murad e Gupta, 2000). De acordo com esta lei, a solubilidade de um gás no líquido é representada pela Equação 2.10:

$$x_i = \frac{y_i \times P}{H_i} \quad (2.10)$$

Sendo:

$x_i$ , a solubilidade do componente  $i$  no líquido

$y_i$ , a fracção molar do componente  $i$  na fase gasosa (geralmente igual a 1 para gases puros, se o líquido não for volátil)

$P$ , a pressão total

$H_i$ , a constante de Henry para o componente  $i$  no líquido

Analisando esta lei verifica-se que a concentração máxima dos gases dissolvidos no meio de cultura aumenta com a pressão total. Como já foi referido, o aumento da pressão parcial de oxigénio acima dos valores atmosféricos normais pode ter efeitos nefastos para as células a partir de determinados limites, dependendo do tipo de microrganismo.

Os efeitos inibitórios de pressões moderadas de oxigénio puro foram demonstrados por Caldwell (1965). A exposição de várias estirpes de fungos e bactérias a 1 MPa de oxigénio mostraram que, em ambos os grupos de microrganismos, o crescimento celular foi totalmente inibido sob pressão, mas que este efeito foi reversível, ou seja, as células retomaram o seu crescimento quando cultivadas em condições atmosféricas normais, tendo-se verificado que a recuperação foi mais rápida para as bactérias.

Além do crescimento celular, também o metabolismo pode ser afectado pelo aumento da pressão. Há uma grande variedade nos efeitos do aumento da pressão parcial de oxigénio sobre a formação de produtos. Os efeitos positivos da pressão podem estar directamente relacionados com a melhoria da taxa de transferência de oxigénio, ou podem estar de alguma forma relacionados com a indução do metabolismo celular, enquanto os efeitos negativos estão somente relacionados com mecanismos metabólicos (Onken e Liefke, 1989).

Na Tabela 2.3 apresenta-se um resumo dos efeitos do aumento da pressão parcial de oxigénio observados por vários autores.



Tabela 2.3 - Resumo dos efeitos do aumento da pressão parcial ( $P_{O_2}$ ) de oxigénio.

Autores	Microrganismos	Observações
Clark e Lentz (1961)	<i>Aspergillus niger</i>	Melhoria no rendimento na produção de ácido cítrico, com uma $P_{O_2}$ de 70 kPa.
Hartmeier <i>et al.</i> (1971)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	60 % de diminuição no rendimento em biomassa, com uma $P_{O_2}$ de 81 kPa.
Ghosh <i>et al.</i> (1993)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Aumento de cerca de 30 % no rendimento em biomassa, num reaktor <i>airlift</i> , com uma $P_{O_2}$ de 60 kPa.
Lee e Hassan (1987)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25 % a 40 % de diminuição na concentração celular, dependendo da diluição, com $P_{O_2}$ de 100 kPa.
Liefke <i>et al.</i> (1990)	<i>Streptomyces</i> spp. e <i>Micromonospora purpurea</i>	Aumento do crescimento e da formação de produtos com $P_{O_2}$ superiores a 100 kPa.
Matsumura <i>et al.</i> (1980)	<i>Candida</i> EY-12	Inibição total do crescimento com $P_{O_2}$ de 50 kPa.
Matsumura <i>et al.</i> (1982)	<i>Candida brassicae</i>	Aumento da produtividade em biomassa de 10 $Kg.m^{-3}.h^{-1}$ para o dobro, aumentando a $P_{O_2}$ de 100 kPa para 200 kPa.
Onken e Jostmann (1984)	<i>Candida utilis</i>	Diminuição do rendimento em biomassa e aumento da formação de $CO_2$ , com $P_{O_2}$ de 147 kPa.
Onken (1990)	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Inibição total do crescimento com $P_{O_2}$ de 168 kPa e aumento da taxa específica de crescimento com uma $P_{O_2}$ de 92 kPa.
Páca e Gregr (1979)	<i>Candida utilis</i>	Máximo rendimento de biomassa com $P_{O_2}$ de 35 kPa.
Pinheiro <i>et al.</i> (1997)	<i>S. cerevisiae</i>	Redução da produtividade em biomassa com o aumento da $P_{O_2}$ .
Pinheiro <i>et al.</i> (1999)	Diferentes estirpes de <i>Kluyveromyces</i>	Optimização da produtividade em biomassa com o aumento da $P_{O_2}$ até certos limites.
Sato <i>et al.</i> (1984)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	60 % de diminuição no rendimento em biomassa com $P_{O_2}$ de 150 kPa.
Wayman e Wein (1969)	<i>Candida lipolytica</i>	Inibição do crescimento com aumento da $P_{O_2}$ .

### 2.8.2 A toxicidade do oxigénio

O oxigénio é um nutriente essencial para todos os organismos aeróbios, no entanto, quando em excesso pode tornar-se um agente tóxico para as células. A toxicidade do oxigénio deve-se à acção das espécies reactivas de oxigénio (ERO) que são formadas por reduções sucessivas do oxigénio molecular, como por exemplo, o radical superóxido e o radical hidroxilo. Estas moléculas são subprodutos do metabolismo normal das células mas a sua formação pode ser estimulada por diversas condições de stresse, entre as quais, presença de oxidantes químicos, metais pesados, stresse térmico e obviamente pelo aumento da pressão parcial de oxigénio. As ERO são moléculas altamente instáveis que têm um ou mais electrões desemparelhados que se ligam às biomoléculas intracelulares causando diversos danos entre os quais peroxidação lipídica das membranas e oxidação de proteínas. Contudo, as células aeróbias possuem diversos mecanismos de defesa contra os danos celulares causados pelas ERO (Belo *et al.*, 2005).

O stresse oxidativo resulta quando a concentração das ERO excede a capacidade de defesa antioxidante das células (Santoro e Thiele, 1997). Este fenómeno tem sido alvo de diversos estudos, nomeadamente com células de levedura, pois estas constituem um excelente modelo para estudos de adaptação celular como resposta a condições de stresse oxidativo em células eucariotas (Jamieson, 1998; Pinheiro *et al.*, 2002).

Entre os vários mecanismos de adaptação a condições de stresse, incluem-se alterações fisiológicas e morfológicas (Belo *et al.*, 2005).

## 3 Materiais e Métodos

---

Neste capítulo serão descritos os métodos, condições e equipamentos utilizados para a realização das experiências de biotransformação em biorreactor, tanto em condições de pressão normais como hiperbáricas.

São ainda apresentados os métodos utilizados na determinação da capacidade de transferência de oxigénio para o meio de biotransformação, assim como nas análises efectuadas que permitiram monitorizar o crescimento celular e a biotransformação.

3.1	Estirpes de leveduras, meios e condições de conservação e de cultura	5
3.2	Biotransformação	5
3.3	Determinação da capacidade de transferência de oxigénio	5
3.4	Métodos analíticos	5

---

### 3.1 Estirpes de leveduras, meios e condições de conservação e de cultura

#### 3.1.1 Leveduras

Neste trabalho foi utilizada a estirpe *Yarrowia lipolytica* W29 (ATCC20460: CLIB89).

#### 3.1.2 Conservação das leveduras

A estirpe foi conservada a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  em tubos criogénicos (Microbank, Pro-Lab Diagnostics). Após descongelação, realizou-se uma pré-cultura durante 48 horas a  $27^{\circ}\text{C}$  em agar inclinado com  $50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de agar de extracto de malte (Malt Extract Agar).

Conservaram-se as colónias a  $4^{\circ}\text{C}$ , servindo posteriormente para inocular os meios de cultura.

#### 3.1.3 Meio de produção de biomassa

Na Tabela 3.1 apresenta-se a composição do meio de produção de biomassa. O pH deste meio foi ajustado a 5.6. A esterilização foi feita em autoclave, a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante 20 minutos.

**Tabela 3.1– Composição do meio de produção de biomassa de *Yarrowia lipolytica*.**

Composto	Quantidade (1 L)
Solução A	100 mL
Glucose	15 g
NH <sub>4</sub> Cl	2.5 g
Extracto de levedura	0.1 g

A composição da solução A utilizada na preparação do meio de cultura é apresentada na Tabela 3.2. O pH desta solução foi ajustado a 5.6.

**Tabela 3.2- Composição da solução A utilizada na preparação do meio de cultura.**

Composto	Quantidade (500 mL)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10.5 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	17.99 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1 g
NaCl	0.5 g
Solução B	5 mL

Na Tabela 3.3 apresenta-se a composição da solução B utilizada na preparação da Solução A.

**Tabela 3.3- Composição da solução B utilizada na preparação da Solução A.**

Composto	Quantidade (100 mL)
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.914 g
ZnCl <sub>2</sub>	0.05 g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.156 g

Efectuou-se o crescimento das leveduras em 200 mL de meio contido em matrizes de 500 mL, inoculados com uma concentração celular de 0.1 g.L<sup>-1</sup> (correspondente a valores de absorvância a um comprimento de onda de 600 nm (A<sub>600</sub>) de aproximadamente 0.25). Os matrizes foram mantidos a uma temperatura de 27 °C e agitação constante de 140 rpm.

Ao longo deste trabalho, todos os valores de absorvância foram lidos a partir do espectrofotómetro ELISA, Spectra & Rainbow, Tecan.

### 3.2 Biotransformação

Após a fase de produção de biomassa, as leveduras foram transferidas para um meio de biotransformação contido num biorreactor, numa concentração final de 0.62 g.L<sup>-1</sup> (A<sub>600</sub>≈1.2). As células foram separadas do meio de crescimento no fim da fase exponencial de crescimento (após 19 horas de cultura) por centrifugação (6000 g, 5 min) e lavadas 3 vezes com água estéril antes de serem colocadas no novo meio.

### 3.2.1 Meio de biotransformação

Na Tabela 3.4 é apresentada a composição do meio de biotransformação. O volume é completado, até ao volume final pretendido, com tampão fosfato 0.1 M, a pH 7.

**Tabela 3.4– Composição do meio de biotransformação.**

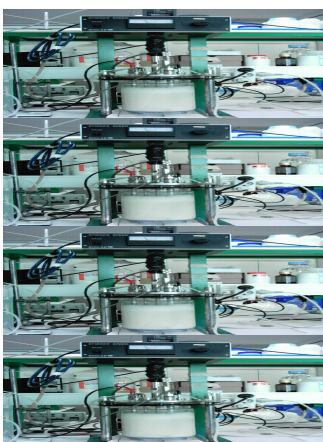
Composto	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )
RM (pureza 80 %) (*)	10
Tween 80	1
NH <sub>4</sub> Cl	2.5
YNB (Yeast Nitrogen Base)	6.7

(\*) Este reagente foi gentilmente cedido pela Stéarinerie Dubois, Boulogne, França.

### 3.2.2 Biorreactores utilizados

#### 3.2.2.1 Biorreactor Biolab

Este biorreactor (Biolab, B. Braun, Alemanha) é constituído por um vaso de vidro de capacidade máxima de 2 L ( $D_t = 11$  cm); um agitador com dois impulsores tipo turbina com seis lâminas ( $D_i = 5.7$  cm,  $H_i = 1.5$  cm); um dispersor em anel perfurado para promover o arejamento; uma unidade de medida e controlo de temperatura (o controlo é efectuado através de uma resistência instalada no vaso do biorreactor); e um motor com controlador de velocidade de agitação.



**Figura 3.1 – Fotografia do biorreactor Biolab, com meio de biotransformação.**

O caudal de arejamento é controlado automaticamente por um fluxímetro (Hastings; caudal máximo de 3 L/min). Este está ligado a uma placa electrónica (CIO-DAS08JR, Computer Boards, EUA) instalada num computador. O caudal é controlado pelo programa de aquisição e controlo (LABtech Notebook, Datalab Solution). À entrada e à saída do biorreactor, o ar atravessa um filtro (Pall Corporation, com uma porosidade de 0.2 µm) para remover partículas e microrganismos.

Para a medição da concentração de oxigénio dissolvido recorreu-se a uma sonda polarográfica de oxigénio (12/220 T, Mettler Toledo, Suíça), tendo sido os valores monitorizados num medidor externo (170, Mettler Toledo, Suíça), cujos sinais foram convertidos e adquiridos através da placa electrónica e programa utilizados com os fluxímetros.

O biorreactor foi esterilizado com o meio (sem YNB) em autoclave, a uma temperatura de 121 °C durante 25 minutos. O YNB foi adicionado posteriormente, sendo esterilizado por filtração (acrodiscos de 0.2 µm de porosidade, Orange Scientific).

O medidor de temperatura e a sonda de oxigénio foram desinfectados à parte, tendo sido mergulhados numa solução de hipoclorito de sódio 10 % (v/v) durante 1 hora e passados por água estéril antes de serem inseridos no meio de cultura.

A calibração da sonda de oxigénio foi efectuada antes de ser desinfectada.

O volume de meio de biotransformação utilizado neste biorreactor foi de 1700 mL.

### 3.2.2.2 Biorreactor Parr

Os ensaios efectuados com pressão absoluta superior à ambiente foram realizados na instalação experimental da Figura 3.2, representada esquematicamente na Figura 3.3.

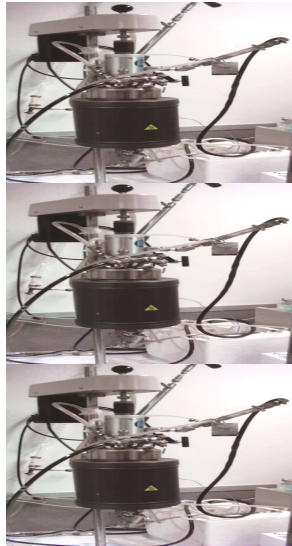


Figura 3.2 – Fotografia do biorreactor Parr.

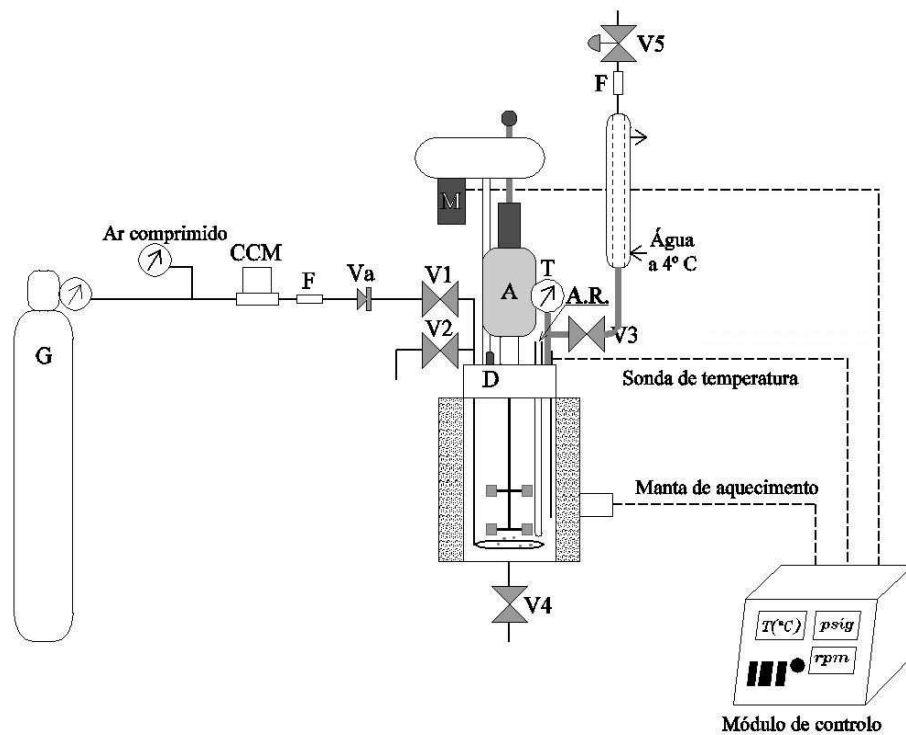


Figura 3.3- Representação esquemática da instalação experimental do biorreactor pressurizado e acessórios: A – agitador; A.R. – circuito de refrigeração; CCM – controlador de caudal mássico; D – disco de segurança; F – filtro de ar; G – garrafa de gás; M – motor do agitador; Va – válvula anti-retorno; V1, V2, V3 e V4 – válvulas; V5 – válvula de regulação; T – transdutor de temperatura (adaptado de Belo, 1999).



O biorreactor (Parr, modelo 4563, EUA) é constituído por um tanque de aço inox 316, de capacidade máxima de 600 mL; um agitador (A) com dois impulsores tipo turbina com lâminas inclinadas, accionado por um motor (M); um circuito de água de refrigeração (A.R.); uma sonda de temperatura; e um tubo dispersor para promover o arejamento.

A espessura e o sistema de vedação do biorreactor permitem operar até valores máximos de pressão e temperatura de 20.8 MPa e 350 °C, respectivamente. Caso a pressão exceda o limite de segurança, pode proceder-se à descompressão do biorreactor, graças à existência de um disco de ruptura (D) no topo do mesmo.

Acoplado ao biorreactor, existe um módulo de controlo que permite monitorizar a pressão no interior daquele, assim como regular a sua agitação e temperatura, sendo esta controlada por uma manta de aquecimento que envolve o biorreactor e pelo circuito de água de refrigeração (A.R.) que é alimentado com água corrente.

A fixação dos valores de pressão relativa é efectuada manualmente pela abertura ou fecho das válvulas de saída do gás (V3 e V5). Estes valores são monitorizados no módulo de controlo através de um transdutor de pressão (T).

Associado ao sistema de pressurização está ainda um controlador de caudal mássico (CCM) (Hastings Instruments, EUA), um filtro de ar em aço inox (0.45 µm de porosidade) e uma válvula anti-retorno (Va). Estas peças encontram-se nos tubos de entrada de gás, que podem ser ligados ao posto de ar comprimido (permitindo valores máximos de pressão de 0.7 MPa) ou a garrafas (G) de ar comprimido ou de ar puro.

Acoplou-se um condensador de tubos concêntricos, em aço inox, à válvula de saída de gás (V3), assim como um filtro (0.45 µm de porosidade), igualmente em aço inox, e uma válvula de agulha (V5) que permite uma regulação mais fina da pressão.

O volume de meio de biotransformação utilizado neste biorreactor foi de 400 mL.

### 3.2.2.3 Biorreactor Biostat

Utilizou-se este biorreactor para realizar ensaios de biotransformação a níveis de oxigénio controlado, uma vez que tais ensaios não podiam ser realizados no biorreactor Biolab, por limitações do equipamento.

Este biorreactor (Biostat MD, B. Braun, Alemanha) é constituído por um vaso de vidro com uma capacidade máxima de 5 L. Está equipado com uma camisa para controlo de temperatura, um rotor de agitação com dois impulsores tipo turbina, com seis lâminas e um controlador de fluxo de massa para o arejamento (Hi-TecF201C-FB, Bronkhorst, Holanda).

Inclui também sensores para a concentração de oxigénio dissolvida (Mettler Toledo, Suíça) e temperatura. O biorreactor está ligado a uma unidade de controlo digital que permite a monitorização e controlo das condições de operação. Esta unidade de controlo digital também realiza funções como a amplificação dos sinais dos sensores e a calibração dos mesmos, assim como actua no controlo final dos elementos, nomeadamente no aquecimento da camisa para controlo da temperatura e na velocidade de agitação e/ou caudal de arejamento para controlo da concentração do oxigénio dissolvido.

À entrada do biorreactor, o ar atravessa dois sistemas de filtração: um filtro (Swagelok, com uma porosidade de 1  $\mu\text{m}$ ) é utilizado antes do controlador de fluxo de massa para remover partículas sujas e um filtro (Pall Corporation, com uma porosidade de 0.2  $\mu\text{m}$ ) é colocado antes do biorreactor para remover partículas e microrganismos. À saída, o ar atravessa um condensador.

O programa de aquisição e controlo foi construído em LabVIEW Professional Development System, versão 6.1. Os dados são adquiridos através de uma placa electrónica (6024E, National Instruments, EUA).

O volume de meio de biotransformação utilizado neste biorreactor foi de 3400 mL.

### 3.3 Determinação da capacidade de transferência de oxigénio

#### 3.3.1 Ensaios sem células

A determinação do  $K_La$  em ensaios sem células foi efectuada recorrendo ao método estático (sub-capítulo 2.7.1.1).

Tal como já foi referido, o oxigénio presente no meio é removido pela introdução de azoto. De seguida, o meio é novamente arejado e agitado, monitorizando-se a concentração de oxigénio dissolvido.

Na Figura 3.4 apresenta-se, a título ilustrativo, a evolução da concentração de oxigénio dissolvido, após re-arejamento no meio sem células, e a representação gráfica do logaritmo de  $1 - \frac{O}{O^s}$  em função do tempo. O declive da recta resultante desta representação fornece o valor de  $-K_La$ .

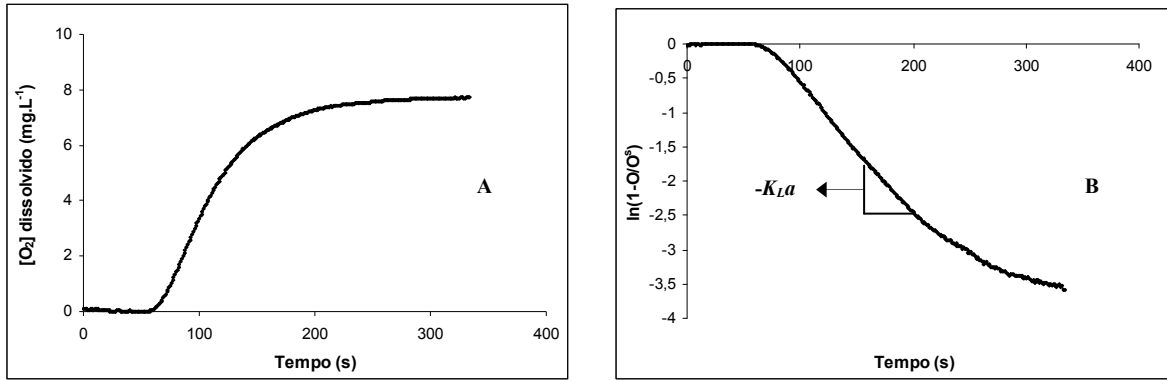


Figura 3.4 – Evolução da concentração de oxigénio dissolvido no meio sem células após re-arejamento (A) e representação logarítmica de  $1 - \frac{O}{O_s}$  ao longo do tempo (B).

### 3.3.2 Ensaios com células

A determinação do  $K_L a$  em ensaios com células foi efectuada recorrendo ao método dinâmico (sub-capítulo 2.7.1.2).

Como já foi referido, este método envolve duas etapas: uma de paragem do arejamento e outra de retoma do arejamento nas condições de operação. Assim, na primeira etapa, o declive da recta correspondente ao decréscimo da concentração de oxigénio dissolvido, permite determinar a taxa específica de consumo de oxigénio ( $OUR$ ). O valor de  $K_L a$  é igual ao simétrico do declive da recta resultante da representação gráfica do logaritmo de  $\frac{O_i - O}{O_i - O_0}$  em função do tempo (Figura 3.5).

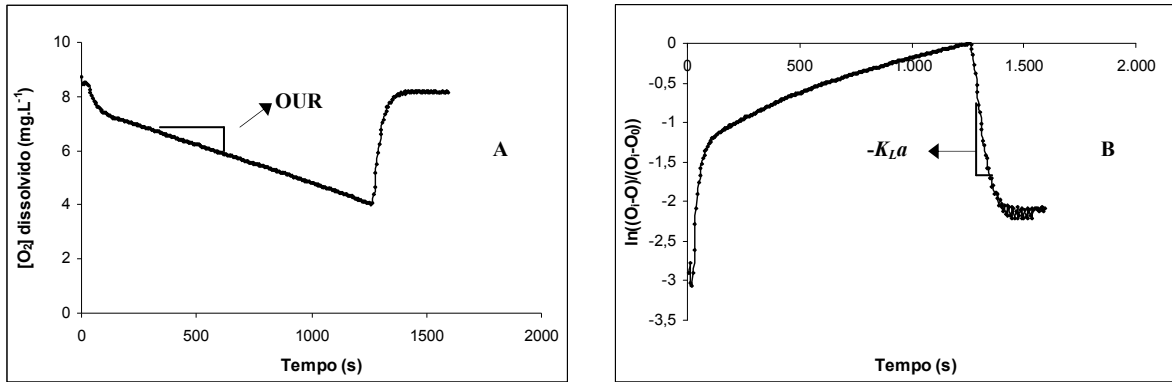


Figura 3.5 – Evolução da concentração de oxigénio dissolvido no meio com células após interrupção do arejamento, seguida da sua retoma (A) e representação logarítmica de  $\frac{O_i - O}{O_i - O_0}$  ao longo do tempo (B).

### 3.4 Métodos analíticos

#### 3.4.1 Concentração celular

##### 3.4.1.1 Peso seco

A quantificação da concentração celular foi efectuada através da leitura da absorvância das amostras (diluídas ou não) a um comprimento de onda de 600 nm ( $A_{600}$ ), utilizando como branco, água destilada.

Para converter os valores de  $A_{600}$  obtidos para uma concentração celular expressa em peso seco por litro ( $g.L^{-1}$ ), recorreu-se a uma recta de calibração obtida previamente. Para obter esta recta de calibração, leu-se a densidade óptica (DO) do meio de cultura com células (valor esse que deve ser próximo de 1) e filtrou-se, em triplicado, através de membranas (Orange Scientific, com uma porosidade de  $0.45 \mu m$ ) 10 mL dessa amostra, lavando o filtro com mais 10 mL de água destilada. Estas membranas foram colocadas, de véspera, numa estufa a  $105^\circ C$ , tendo sido pesadas, após terem arrefecido num exsiccador.

A partir da suspensão celular, foram preparadas várias diluições, tendo-se igualmente procedido à leitura da sua DO (entre 0.1 e 1) e à sua filtração. Procedeu-se de igual forma para o branco, que consistiu em água destilada. As membranas foram colocadas durante 24 h numa estufa a  $105^\circ C$ .

O peso seco foi obtido pela diferença entre o peso final e o inicial das membranas, tendo-se descontado o valor dos brancos. A recta de calibração foi assim obtida pela representação gráfica das DO em função dos pesos secos (anexo 1.1).

#### 3.4.1.2 Número de células

A quantificação da concentração celular foi efectuada por contagem directa ao microscópio óptico (Hertel & Reuss, Kassel), recorrendo a uma câmara de Neubauer (Blaubrand).

#### 3.4.1.3 Viabilidade celular

A estimativa da viabilidade celular foi efectuada por observação microscópica das células coradas com azul de metileno. Este apresenta uma coloração azul na sua forma oxidada, tornando-se incolor quando reduzido. Segundo Postgate (1967), quando o azul de metileno penetra em células viáveis, é reduzido por uma desidrogenase que está inactiva nas células mortas. Outra explicação do método, consiste na suposição de que o azul de metileno apenas penetra células cuja permeabilidade selectiva da membrana plasmática se encontra seriamente comprometida (Bonara e Mares, 1982).

O método consiste em adicionar, a um dado volume de amostra, um volume igual de solução de azul de metileno ( $0.25 \text{ g.L}^{-1}$ ) e aguardar 5 minutos. A suspensão corada é então colocada numa câmara de Neubauer e observada ao microscópio. A fracção de células viáveis é a razão entre o número de células não coradas e o número total de células.

#### **Preparação da solução de azul de metileno, $0.25 \text{ g.L}^{-1}$ (100 mL):**

Dissolver, em 100 mL de água destilada, 0.025 g de azul de metileno e 0.9 g de NaCl.

#### 3.4.2 Quantificação dos açúcares redutores

A quantificação dos açúcares redutores foi efectuada através do método do ácido 3,5-dinitrossalicílico, vulgarmente conhecido como método do DNS. Este método baseia-se no facto de, na presença de açúcares redutores, o ácido 3,5-dinitrossalicílico ser reduzido a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico, com formação de um complexo acastanhado que pode ser doseado colorimetricamente a 540 nm.

Para esta determinação, adicionou-se, num tubo de ensaio, 500  $\mu\text{L}$  de reagente de DNS a 500  $\mu\text{L}$  de amostra (diluída, se necessário), previamente filtrada através de membranas (Pall Corporation, com uma porosidade de 0.2  $\mu\text{m}$ ), agitou-se e colocou-se num banho a 100 °C durante 5 minutos. Após ter arrefecido, adicionaram-se 5 mL de água destilada, agitou-se e leu-se a DO a 540 nm. O branco foi realizado da mesma forma, apenas substituindo a amostra por água destilada.

#### **Preparação do reagente de DNS (1 litro):**

Dissolver, em 500 mL de água destilada a 80 °C, 10 g de ácido 3,5-dinitrossalicílico

Após arrefecer, adicionar 200 mL de NaOH, 2 N

Adicionar 300 g de tartarato duplo de sódio e potássio e perfazer o volume até 1 L.

Para converter os valores de DO obtidos para uma concentração de açúcares redutores expressa em gramas por litro ( $\text{g.L}^{-1}$ ), recorreu-se a uma recta de calibração obtida previamente. Para obter esta recta de calibração, prepararam-se seis soluções de glucose, com concentrações entre 0.05 e 1  $\text{g.L}^{-1}$  e procedeu-se ao método anteriormente referido. A recta de calibração é assim obtida pela representação gráfica das DO em função das concentrações já conhecidas de cada solução (anexo 1.2).

#### **3.4.3 Quantificação da $\gamma$ -decalactona**

Durante a biotransformação, foram retiradas do meio, em intervalos de 2 horas, amostras de 2 mL. Foram adicionadas às amostras, 2 microgotas de HCl concentrado para promover a lactonização total do ácido 4-hidroxicanoico, possibilitando a quantificação total de  $\gamma$ -decalactona nas amostras.

Foi igualmente adicionado às amostras  $\gamma$ -undecalactona numa concentração de 100  $\text{mg.L}^{-1}$ , como padrão interno na quantificação da  $\gamma$ -decalactona, que foi extraída do meio de biotransformação por éter dietílico (pureza 99,9%). Esta extracção líquido/líquido realizou-se adicionando 2 mL de éter dietílico à amostra contida num frasco de 4 mL, tendo sido invertido dez vezes seguidas, para promover uma eficiente mistura. Após 2 minutos de repouso, retirou-se 1  $\mu\text{L}$  da fase superior com a ajuda de uma seringa e injectou-se directamente no cromatógrafo.

O aparelho utilizado foi um cromatógrafo CP 9001, CHROMPACK com detector de ionização de chama, injector split/splitless e uma coluna capilar, modelo TRWAX

(comprimento 30 m, diâmetro 0.32 mm e espessura do filme 0.25  $\mu\text{m}$ ), cuja fase estacionária é composta por polietilenoglicol.

**Condições de operação:**

Temperatura do injector = 250 °C

Temperatura do detector = 300 °C

Temperatura do forno = programada para aumentar desde 60 °C até 145 °C, numa razão de 5 °C por minuto e depois até 180 °C, numa razão de 2 °C por minuto.

Pressão do gás de arraste (Hélio) = 50 kPa

Os dados foram analisados recorrendo ao programa de aquisição e integração, CP-Maitre, versão 2.5 da Chrompack e às rectas de calibração obtidas previamente para os compostos  $\gamma$ -decalactona e  $\gamma$ -undecalactona (anexo 1.3). Para obter estas rectas, prepararam-se cinco soluções destes compostos com concentrações entre 50 e 800  $\text{mg.L}^{-1}$  e, após serem injectados, determinaram-se as áreas correspondentes, recorrendo ao software já referido.

Determinou-se a média das várias razões concentração/área para os dois compostos, o que permitiu determinar o coeficiente de resposta ( $K$ ), que é obtido pela razão entre a média correspondente à  $\gamma$ -undecalactona e a da  $\gamma$ -decalactona.

A determinação deste coeficiente permite quantificar a  $\gamma$ -decalactona recorrendo à Equação 3.6.

$$[\gamma - deca] = [\gamma - undeca] \times \frac{1}{K} \times \frac{A_{\gamma - deca}}{A_{\gamma - undeca}} \quad (3.6)$$

Sendo:

$[\gamma - deca]$ , a concentração de  $\gamma$ -decalactona em  $\text{mg.L}^{-1}$

$[\gamma - undeca]$ , a concentração de  $\gamma$ -undecalactona em  $\text{mg.L}^{-1}$

$K$ , o coeficiente de resposta

$A_{\gamma - deca}$ , a área da  $\gamma$ -decalactona

$A_{\gamma - undeca}$ , a área da  $\gamma$ -undecalactona

### 3.4.4 Quantificação de outras lactonas

As lactonas dec-2-en-4-olido, dec-3-en-4-olido e 3-hidroxi- $\gamma$ -decalactona foram quantificadas por um sistema de GC-MS constituído por um cromatógrafo gasoso Varian 3400 GC e por um espectrómetro de massas *ion-trap* Varian Saturn II.

As amostras injectadas directamente no GC-MS foram as mesmas que já tinham sido injectadas no cromatógrafo gasoso.

A injeção foi de 1  $\mu$ L, foi efectuada em modo SPI (*Septum-equipped programmable injector*) na coluna CPWAX-52-CB (comprimento 50 m, diâmetro 0.25 mm e espessura do filme 0.2  $\mu$ m).

O detector foi usado em modo de impacto electrónico, energia de ionização de 70 eV e gama de aquisição de massas entre 29 m/z e 360 m/z, adquirindo a intervalos de 610 ms.

#### Condições de operação:

Temperatura do injectador = 20 °C a 250 °C

Temperatura do forno = programada para aumentar desde 60 °C até 250 °C, numa razão de 3 °C por minuto; manter-se a esta temperatura durante 20 minutos; e depois até 255 °C, numa razão de 1 °C por minuto.

Pressão do gás de arraste (Hélio) = 103 kPa

Os dados foram analisados recorrendo ao programa de aquisição e de integração, Saturn.

Os vários compostos foram quantificados de forma idêntica à descrita no sub-capítulo anterior.

Na Figura 3.6 apresenta-se um cromatograma típico e o espectro de massa correspondente aos vários compostos analisados.



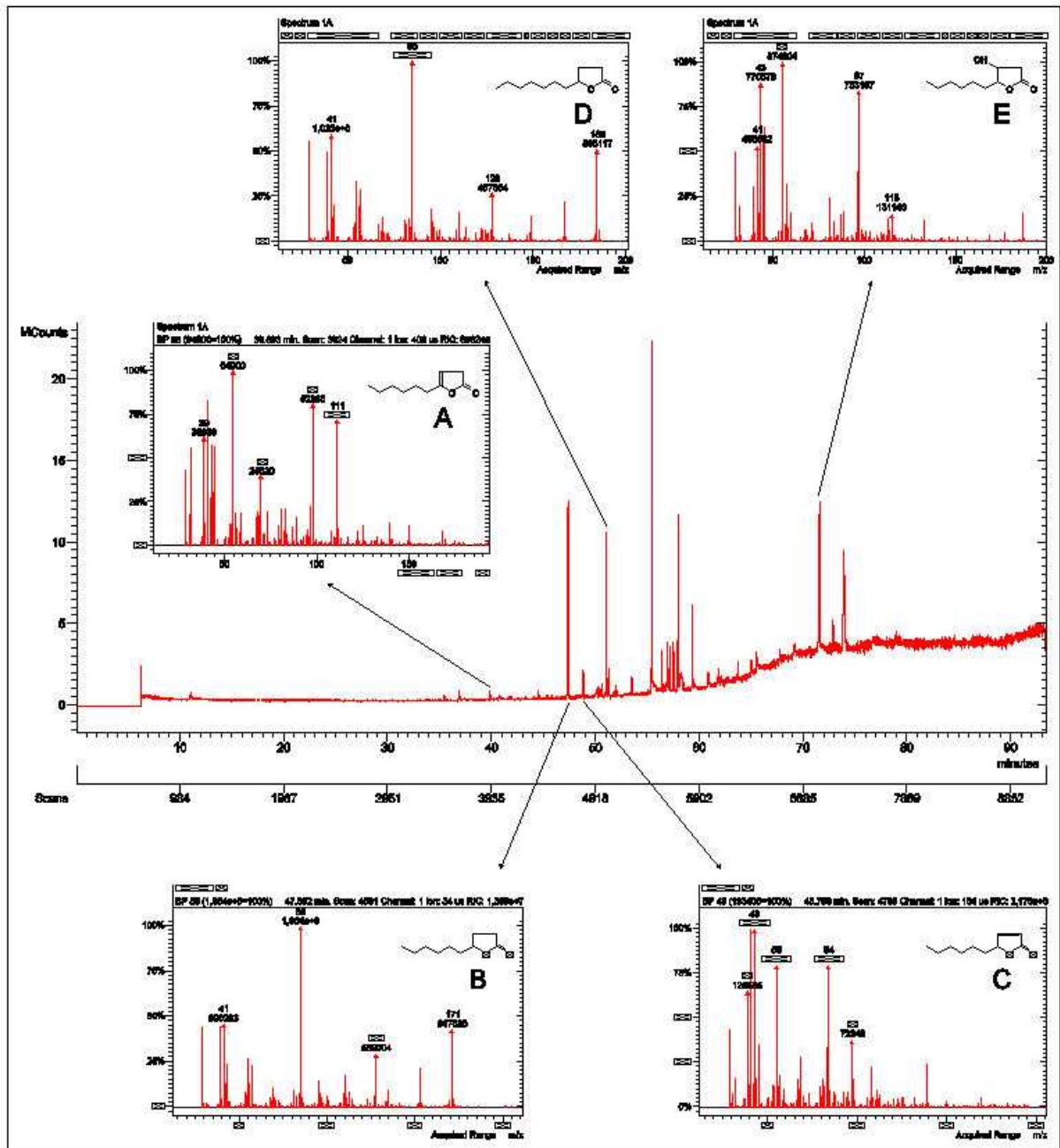


Figura 3.6 – Cromatograma típico de uma amostra após 10 horas de biotransformação e espectro de massa dos compostos dec-3-en-4-olido (A),  $\gamma$ -decalactona (B), dec-2-en-4-olido (C),  $\gamma$ -undecalactona (D) e 3-hidroxi- $\gamma$ -decalactona (E).

## 4 Resultados e Discussão

---

Ao longo deste capítulo serão apresentados os resultados obtidos relativamente ao efeito da composição do meio de biotransformação e das condições operatórias nos valores de  $K_La$ , à influência deste parâmetro com a produção de  $\gamma$ -decalactona por biotransformação do ricinoleato de metilo e à influência do oxigénio dissolvido e da pressão de ar nesta mesma produção. Apresentam-se ainda resultados relacionados com o crescimento de *Yarrowia lipolytica*. Por fim, apresentam-se os resultados referentes ao efeito do oxigénio nas vias metabólicas de degradação do ricinoleato de metilo.

4.1	Efeito do meio de biotransformação nos valores de $K_La$	5
4.2	Crescimento de <i>Yarrowia lipolytica</i>	5
4.3	Produção de $\gamma$ -decalactona	5
4.4	Efeito dos valores de $K_La$ na produção de $\gamma$ -decalactona	5
4.5	Efeito do oxigénio dissolvido na produção de $\gamma$ -decalactona	5
4.6	Efeito do oxigénio na via metabólica da produção de lactona	5

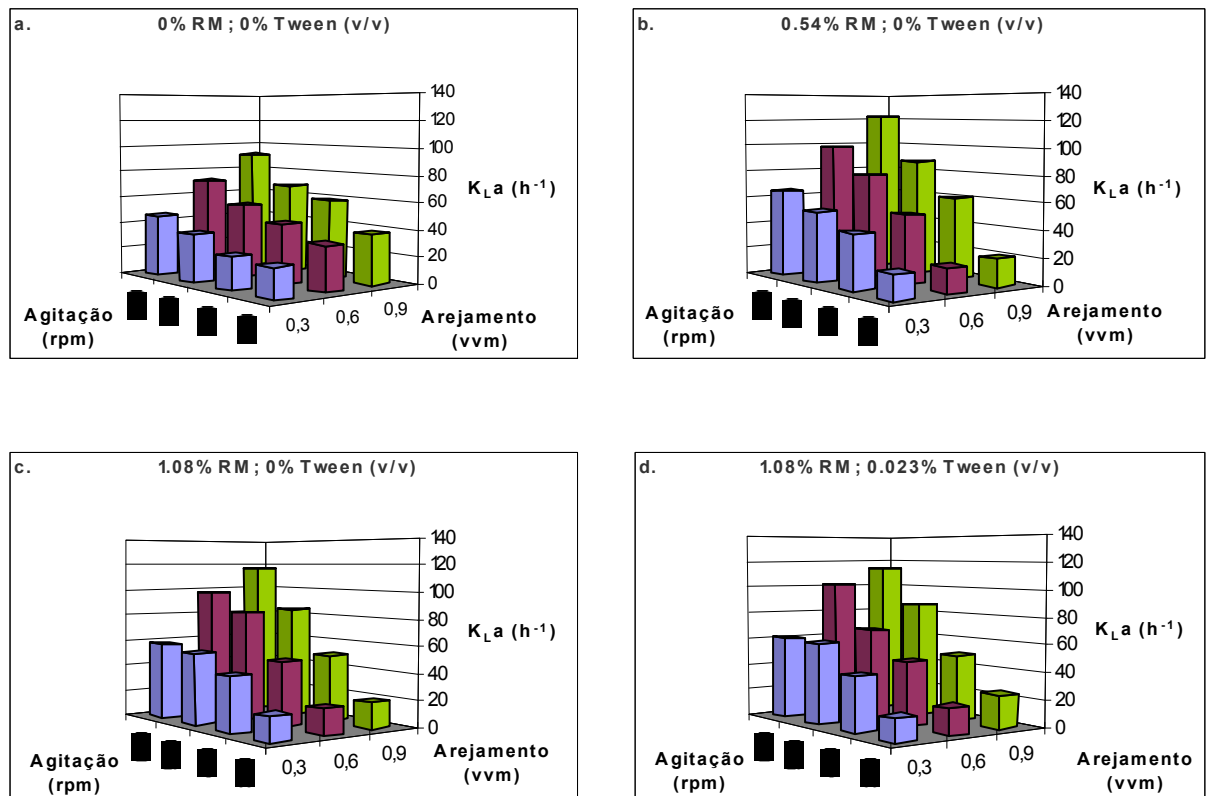
---

#### 4.1 Efeito do meio de biotransformação nos valores de $K_{La}$

Para estudar o efeito do meio de biotransformação (meio bifásico) nos valores de  $K_{La}$  fizeram-se vários ensaios, nos quais se variaram a velocidade de agitação e o caudal de arejamento no meio, assim como a composição deste, nomeadamente no que diz respeito à fracção orgânica (RM) e à fracção de surfactante (Tween 80).

As velocidades de agitação utilizadas foram de 300 rpm, 400 rpm, 500 rpm e 600 rpm; os caudais de arejamento foram de 0.3 vvm, 0.6 vvm e 0.9 vvm. Estas condições foram testadas em diferentes composições de meio de cultura, nas quais se utilizaram as fracções volúmicas de 0 %, 0.54 % e 1.08 % de RM e de 0 %, 0.023 %, 0.047 % e 0.093 % de Tween 80.

Os vários valores de  $K_{La}$  obtidos a diferentes condições de operação e de composição do meio são apresentados na Figura 4.1.



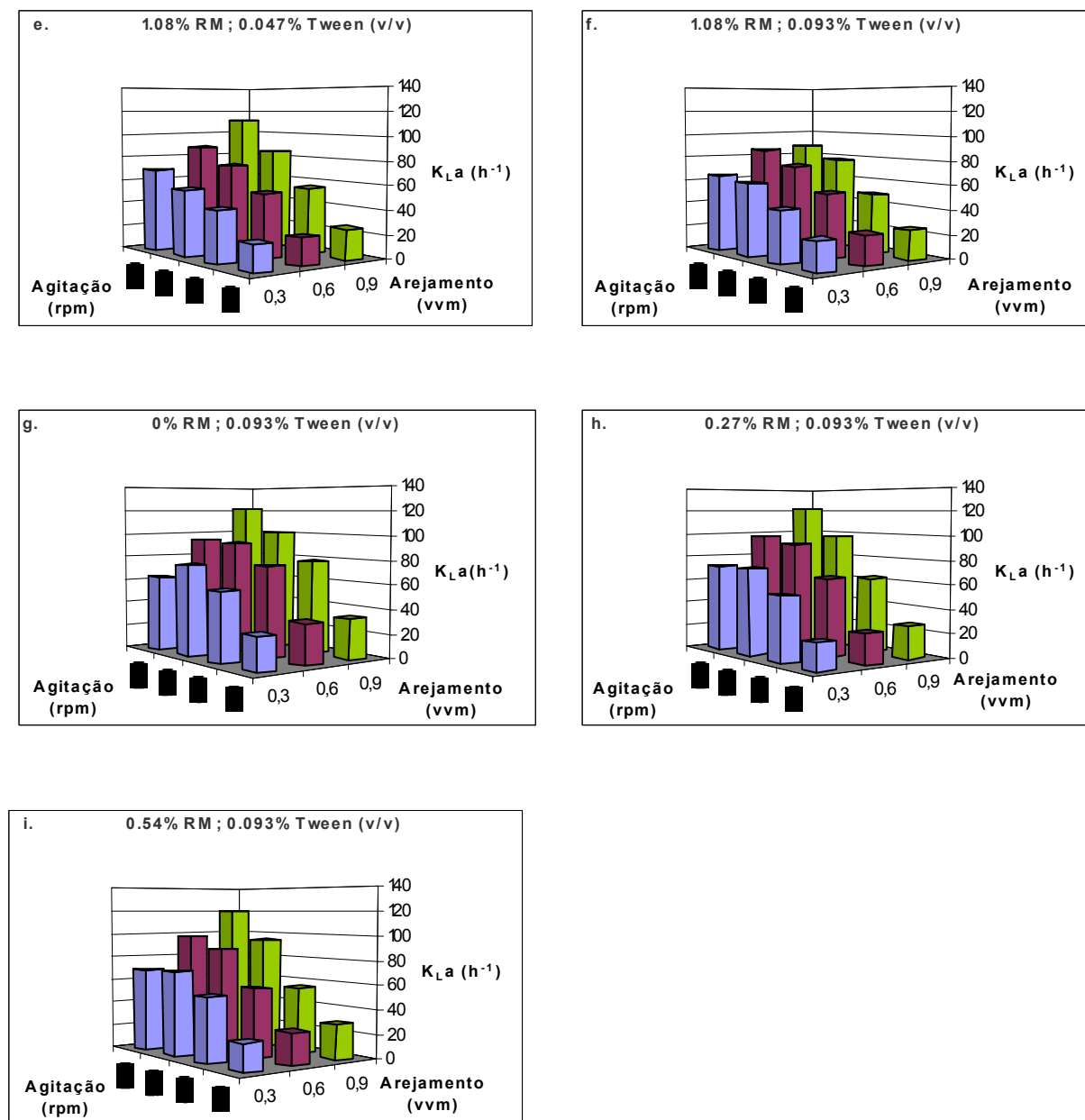


Figura 4.1 – Valores experimentais de  $K_{La}$  a várias condições de operação e com diferentes frações volúmicas de fase orgânica e de surfactante.

Os resultados da Figura 4.1 foram utilizados para desenvolver uma correlação empírica que permitisse prever os valores de  $K_{La}$  em função das condições de operação e da composição do meio em fase orgânica e em surfactante. No entanto, antes de chegar a esta correlação geral, testaram-se outras correlações mais particularizadas, que permitiram analisar melhor a influência de cada variável por si só nos valores finais de  $K_{La}$ .

Desta forma, a primeira correlação a ser testada foi a representada pela Equação 4.1, utilizando os dados da Figura 4.1 a.

$$K_L a = \delta \cdot \left( \frac{P_g}{V} \right)^\alpha \cdot (v_s)^\beta \quad (4.1)$$

Sendo:

$P_g$ , a potência necessária para o biorreator arejado (W)

$V$ , o volume de trabalho do biorreator ( $m^3$ )

$v_s$ , a velocidade do gás superficial ao longo do biorreator ( $ms^{-1}$ )

$\delta$ ,  $\alpha$  e  $\beta$ , constantes empíricas a determinar

Os cálculos das diferentes variáveis encontram-se exemplificados no anexo 2.

Neste estudo, todos os parâmetros foram estimados recorrendo à ferramenta Solver do software Microsoft Excel 2003, que permite a optimização de funções não lineares. Assim, procedeu-se à minimização do somatório dos quadrados das diferenças entre os valores de  $K_L a$  experimentais e previstos pela Equação 4.1. Os parâmetros óptimos  $\delta$ ,  $\alpha$  e  $\beta$ , para esta correlação, foram estimados como sendo 778, 0.4 e 0.7, respectivamente, obtendo-se a seguinte expressão (Equação 4.2):

$$K_L a = 778 \cdot \left( \frac{P_g}{V} \right)^{0.4} \cdot (v_s)^{0.7} \quad (4.2)$$

Moo-Young e Blanch (1981) sugeriram, para os parâmetros  $\alpha$  e  $\beta$ , valores de 0.7 e 0.3, respectivamente, para meios não coalescentes e de 0.4 e 0.5, respectivamente, para meios coalescentes, ambos agitados com agitadores tipo turbina, com 6 lâminas.

Linek (1987) sugeriu também valores de  $\alpha$  e  $\beta$  de 0.6 e 0.4, para meios coalescentes, usando o mesmo tipo de agitador.

Na correlação da Equação 4.2 verifica-se que a dependência do  $K_L a$  é superior relativamente ao arejamento do que à agitação, o que também foi verificado por Moo-Young e Blanch (1981) em meios coalescentes (embora no caso deles a diferença da dependência não seja tão evidente), o que indica que o meio sem fase orgânica, utilizado neste trabalho, tem características de meio coalescente.

A correlação obtida nestas condições apresenta um desvio de 1 % nos valores de  $K_L a$  teóricos, como se pode constatar pela análise da Figura 4.2, em que são representados os valores de  $K_L a$  teóricos em função dos experimentais.

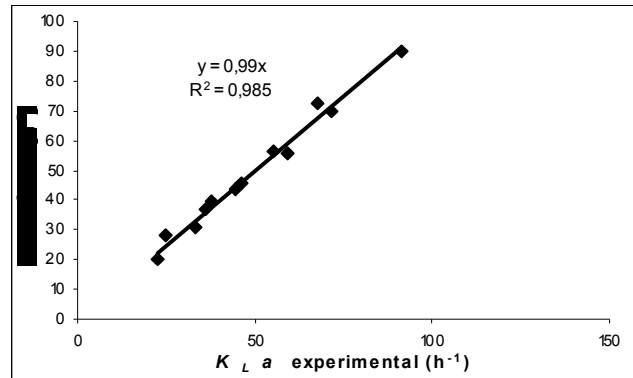


Figura 4.2- Valores experimentais de  $K_La$  versus valores teóricos, estimados a partir da Eq. 4.2.

Para sistemas com duas fases líquidas, em que a fase orgânica se dispersa na fase aquosa, o efeito da fase orgânica no  $K_La$  deve ser contabilizada.

Nielsen *et al.* (2003) propuseram uma correlação em que os valores de  $K_La$  dependiam das condições de operação e da fracção orgânica presente no meio (Equação 4.3).

$$K_La = \delta \cdot \left( \frac{P_g}{V} \right)^\alpha \cdot (v_s)^\beta \cdot (1 - X_{ORG})^\gamma \quad (4.3)$$

Sendo:

$X_{ORG}$ , a fracção volúmica orgânica presente no meio

$\gamma$ , constante empírica a determinar

Também esta correlação foi aplicada aos resultados da Figura 4.1, nomeadamente aos gráficos a, b e c, que correspondem a ensaios com diferentes concentrações de RM e sem surfactante Tween 80. Os valores dos parâmetros  $\delta$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  foram estimados em 228, 0.5, 0.6 e -18, respectivamente, obtendo-se a seguinte expressão (Equação 4.4):

$$K_La = 228 \cdot \left( \frac{P_g}{V} \right)^{0.5} \cdot (v_s)^{0.6} \cdot (1 - X_{ORG})^{-18} \quad (4.4)$$

Analisando esta correlação, e comparando-a com a representada pela Equação 4.2, verifica-se que a presença do componente orgânico aumenta a dependência do  $K_La$  em relação à agitação, embora se continue a verificar uma maior dependência relativamente ao arejamento. Este facto é previsível, uma vez que a velocidade de agitação é um factor muito

importante para aumentar a dispersão da fase orgânica na fase aquosa, o que promove a transferência gás-líquido. Relativamente à presença de fase orgânica, constata-se que à medida que a sua fracção aumenta no meio, os valores de  $K_{La}$  também aumentam. O facto de a presença de uma fase orgânica no meio, na ausência de surfactante, aumentar os valores de  $K_{La}$  vai favorecer a teoria de que há aumento de transferência de oxigénio em fermentações contendo uma fase líquida imiscível (Tabela 2.2).

Esta correlação obtida apresenta um desvio de 2 % nos valores de  $K_{La}$  teóricos relativamente aos experimentais, como se pode observar na Figura 4.3.

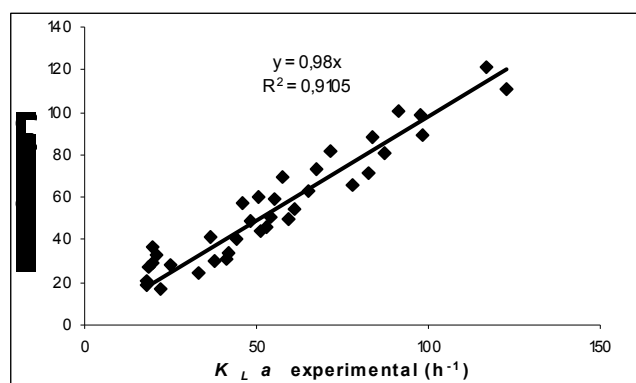


Figura 4.3- Valores experimentais de  $K_{La}$  versus valores teóricos, estimados a partir da Eq. 4.4.

Usando a correlação empírica indicada pela Equação (4.3), Nielsen *et al.* (2003), obtiveram os valores de 650, 0.3, 0.7 e 1.7, para os parâmetros  $\delta$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , respectivamente, o que significa que, para o sistema estudado por estes autores, os valores de  $K_{La}$  também dependem mais do arejamento do que da agitação, mas a presença da fase orgânica diminui os valores de  $K_{La}$ . Esta diferença nos resultados pode ser justificada pelo facto de a fase orgânica utilizada ser diferente em ambos os trabalhos: enquanto que neste consiste em ricinoleato de metilo, no de Nielsen *et al.* (2003) consiste em n-hexadecano. Outra diferença que deve ser tida em conta entre os trabalhos é a percentagem de fracções orgânicas testadas. Neste trabalho testaram-se percentagens muito baixas: 0 %, 0.27 %, 0.54 % e 1.08 %; enquanto que no trabalho de Nielsen *et al.* (2003), as percentagens testadas foram de 0 %, 10 %, 25 % e 33 %.

Querendo testar a influência do surfactante nos valores de  $K_{La}$ , na ausência do orgânico imiscível RM, ajustaram-se os dados dos gráficos a e g da Figura 4.1 à Equação 4.3,

tendo-se estimado os parâmetros  $\delta$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  como 288, 0.4, 0.6 e -381, respectivamente, obtendo-se a correlação expressa pela Equação 4.5.

$$K_L a = 288 \cdot \left( \frac{P_g}{V} \right)^{0.4} \cdot (v_s)^{0.6} \cdot (1 - X_{Tween})^{-381} \quad (4.5)$$

Sendo:

$X_{Tween}$ , a fração volúmica de Tween 80 presente no meio

A correlação assim obtida neste trabalho, para o efeito do surfactante Tween 80 (Equação 4.5) apresenta um desvio de 2 % nos valores de  $K_L a$ , como se pode constatar pela observação da Figura 4.4.

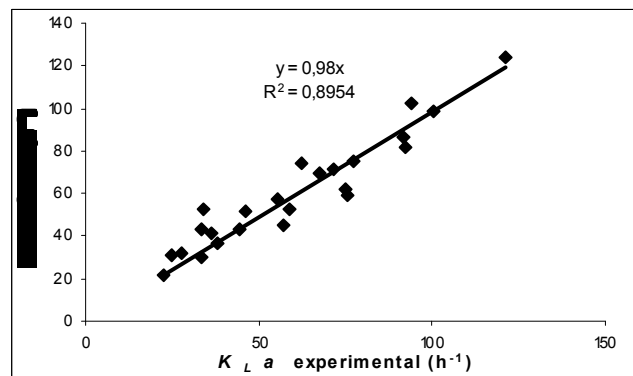


Figura 4.4- Valores experimentais de  $K_L a$  versus valores teóricos, estimados a partir da Eq. 4.5.

Analisando a correlação verifica-se que, tal como se verificou nas correlações anteriores (Equações 4.2 e 4.4), os valores de  $K_L a$  são mais dependentes do arejamento do que da agitação e que, na ausência de RM, a presença de pequenas quantidades de Tween 80 aumenta bastante os seus valores, dada a magnitude do expoente obtido para o factor de correcção relativo ao surfactante. Não se conhecem muitos estudos sobre o efeito de Tween 80 na transferência de massa gás-líquido em meios bifásicos. No entanto, os estudos sobre o efeito de surfactantes na transferência de oxigénio em sistemas aquosos de uma só fase líquida, de uma forma geral, referem-se a um efeito negativo. Tal foi referido por Koide *et al.* (1976), quando estudaram a transferência de massa de bolhas de gás em soluções aquosas contendo surfactantes. Em 1982, Kawase e Ulbrecht estudaram o efeito de surfactante na velocidade terminal de bolhas de gás e no coeficiente de transferência de massa, num fluido



não newtoniano e constataram que ambos diminuíram na presença de surfactante. Também Sheppard e Cooper (1990), quando averiguaram como as características na transferência de oxigênio no meio líquido eram afetadas pelos surfactantes sintéticos, brometo de dodeciltrimetilamônio e dodecilsulfato de sódio e pelo biosurfactante surfactina, produzido por *Bacillus subtilis*, verificaram que o coeficiente de transferência de massa diminuía bastante na presença de pequenas quantidades destes surfactantes. Em 1996, Wagner e Pöpel também investigaram a influência de diferentes tipos de surfactantes (aniônicos e não iônicos) e da sua concentração na transferência de oxigênio em vários tipos de água. Também eles obtiveram um decréscimo na transferência de oxigênio. Uma explicação para estes resultados pode estar relacionada com a tensão superficial dos meios. Behring *et al.* (2004) verificaram que usando baixas concentrações de surfactantes (CTAB, Tween 80 e SDS), a tensão superficial nos solventes testados (n-hexano, álcool etílico, acetato de etilo, tetracloreto de carbono e água destilada) praticamente não foi alterada. No entanto, à medida que a concentração do surfactante aumenta, a tensão superficial diminui acentuadamente. Isto provoca uma diminuição do valor de  $k_L a$ , o que se deve essencialmente ao aumento da coalescência das bolhas de gás nos meios de menor tensão superficial, o que reduz a área interfacial de transferência gás-líquido.

Neste trabalho, porém, apesar de serem utilizadas baixas concentrações de Tween 80, verificou-se um aumento dos valores de  $K_L a$  com o uso deste surfactante. De realçar que os efeitos do surfactante num sistema gás-líquido-líquido podem ser diferentes dos observados nos sistemas gás-líquido com uma só fase líquida. Uma vez que a presença de surfactante favorece a dispersão da fase orgânica na aquosa, o que melhora a transferência de massa entre as fases líquidas, pode ter ocorrido uma melhoria da transferência de oxigênio entre essas fases o que poderá ter aumentado os valores globais de  $K_L a$ .

Com base na correlação expressa pela Equação 4.3, propôs-se uma correlação mais generalizada (Equação 4.6), que tem em conta ambas as frações, de RM e de Tween 80 no meio.

$$K_L a = \delta \cdot \left( \frac{P_g}{V} \right)^\alpha \cdot (v_s)^\beta \cdot (1 - X_{RM})^\gamma \cdot (1 - X_{Tween})^\phi \quad (4.6)$$

Sendo  $\phi$ , uma constante empírica a determinar

O uso destas correlações assume que as duas fases se encontram bem dispersas, formando uma emulsão. Isto é possível uma vez que, para as várias velocidades de agitação, o número de Reynolds determinado sugere que o sistema se encontre num regime de fluxo turbulento (anexo 2).

Esta correlação foi aplicada a todos os resultados da Figura 4.1 Os parâmetros  $\delta$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\varphi$  foram estimados como sendo 148, 0.5, 0.5, 3 e -132, respectivamente, obtendo-se a correlação generalizada expressa pela Equação 4.7.

$$K_L a = 148 \cdot \left( \frac{P_g}{V} \right)^{0.5} \cdot (v_s)^{0.5} \cdot (1 - X_{RM})^3 \cdot (1 - X_{Tween})^{-132} \quad (4.7)$$

Pela análise da Equação 4.7, constata-se, tal como já se tinha verificado ao analisar a correlação representada pela Equação 4.5, que a presença de Tween 80 aumenta os valores de  $K_L a$ . Quando o Tween 80 e o RM estão juntos nas fracções máximas testadas, que correspondem à composição do meio de biotransformação, os valores de  $K_L a$  são mais baixos do que os observados para outras fracções mais baixas, como se pode comprovar analisando os gráficos a e f da Figura 4.1, o que justifica a necessidade de se optimizarem as condições de operação e de estudar o seu impacto no processo de biotransformação.

A correlação representada pela Equação 4.7 descreve com bastante aproximação os valores de  $K_L a$  teóricos (desvio de 2 %), como se pode verificar na Figura 4.5.

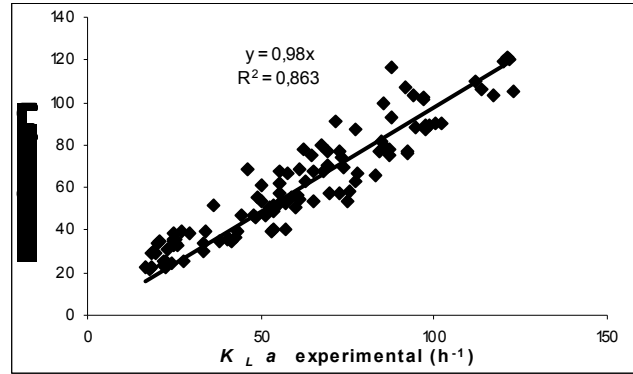


Figura 4.5 - Valores experimentais de  $K_L a$  versus valores teóricos estimados a partir da Eq. 4.7.

De modo a analisar o efeito conjunto do RM e do Tween 80 no meio, propôs-se uma última correlação (Equação 4.8), que foi igualmente aplicada a todos os resultados da Figura 4.1. Nesta correlação assumiu-se que toda a fracção de Tween 80 tem um comportamento hidrofóbico, o que na realidade só se passa com parte dessa fracção, pois o Tween 80 possui um grupo polar hidrofílico e um grupo apolar hidrofóbico. Num meio bifásico, este composto situa-se na interface lípidos-água, ligando-se a ambas as fases.

$$K_L a = \delta \cdot \left( \frac{P_g}{V} \right)^\alpha \cdot (v_s)^\beta \cdot (1 - X_{RM+Tween})^\gamma \quad (4.8)$$

Os parâmetros  $\delta$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  foram estimados como sendo 163, 0.5, 0.5 e 4.2, respectivamente, obtendo-se a correlação expressa pela Equação 4.9.

$$K_L a = 163 \cdot \left( \frac{P_g}{V} \right)^{0.5} \cdot (v_s)^{0.5} \cdot (1 - X_{RM+Tween})^{4.2} \quad (4.9)$$

Analisando esta correlação, constata-se que, tal como já tinha sido verificado, à medida que aumenta a fracção conjunta de RM e Tween 80, os valores de  $K_L a$  diminuem. Este facto é facilmente observável na Figura 4.1 f. A correlação expressa pela Equação 4.9 é concordante com a obtida por Nielsen *et al.* (2003), uma vez que os seus resultados demonstraram que o aumento de fase orgânica no meio diminuía os valores de  $K_L a$ .

No que diz respeito à dependência do  $K_L a$  em relação à agitação e ao arejamento, não houve alterações relativamente à correlação representada pela Equação 4.7.

Esta correlação apresenta um desvio de 3 % nos valores de  $K_La$ , tal como se pode constatar pela análise da Figura 4.6, verificando-se também um aumento da dispersão entre a diferença dos valores experimentais e teóricos. Assim, considera-se mais realista a correlação proposta na Equação 4.7, dado que permite discriminar os efeitos do RM e do Tween 80 no  $K_La$ .

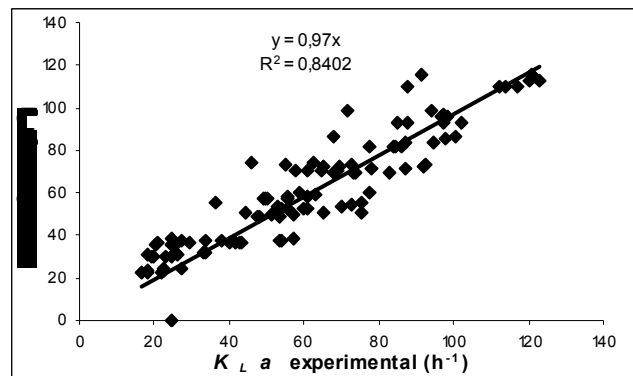


Figura 4.6 - Valores experimentais de  $K_La$  versus valores teóricos estimados a partir da Eq. 4.9.

A relação entre o  $K_La$  teórico e o experimental nas várias correlações propostas, apresenta uma grande dispersão, o que se reflecte no baixo valor de coeficiente de correlação,  $R^2$ . Tal pode ser justificado por erros experimentais e limitações do método de determinação de  $K_La$ , entre os quais se pode referir o tempo de resposta da sonda de oxigénio.

Na prática, o tempo de resposta da sonda é frequentemente negligenciado e o  $OUR$  assim como o  $K_La$  são obtidos directamente a partir do sinal da sonda. As sondas polarográficas utilizadas na medição do oxigénio dissolvido num meio têm um tempo de resposta característico ( $\tau$ ), devido essencialmente à difusão através da membrana da sonda e à resistência à difusão através do filme de líquido.

A determinação do  $K_La$  torna-se incorrecta quando o tempo de resposta da sonda de oxigénio dissolvido é grande. Assumindo uma dinâmica de 1ª ordem para o tempo de resposta da sonda (aplicável a sondas polarográficas esterilizáveis), o tempo de resposta de uma membrana destas sondas é definido como o tempo que decorre até a sonda atingir 63.2 % do valor final da resposta, após uma perturbação em degrau na concentração de oxigénio no líquido (Tribe *et al.*, 1995). A correcção ao valor de  $K_La$  é feita pela aplicação da Equação 4.10.

$$\frac{1}{(K_L a)'} = \frac{1}{K_L a} + \tau \quad (4.10)$$

Em que  $(K_L a)'$  é o valor do coeficiente de transferência de oxigénio determinado experimentalmente.

De acordo com van't Riet e Tramper (1991), valores de  $K_L a$  inferiores a  $0.1 \text{ s}^{-1}$  podem ser estimados sem necessidade de correcção, com as sondas comercialmente disponíveis. Por esta razão, não foi necessário proceder a correcções nos valores de  $K_L a$ , já que os valores determinados foram inferiores a  $0.1 \text{ s}^{-1}$ .

Os tempos de resposta característicos das membranas das sondas de oxigénio esterilizáveis situam-se entre os 10 e os 100 s (Badino *et al.*, 2000). O tempo de resposta da sonda 12/220 T, Mettler Toledo, utilizada neste trabalho, foi estimada como sendo 7.8 s a  $27 \text{ }^\circ\text{C}$ .

## 4.2 Crescimento de *Yarrowia lipolytica*

Previamente ao estudo do processo de biotransformação, promoveu-se o crescimento de células de levedura num meio com glucose, como foi referido no sub-capítulo 3.1.3.

Na Figura 4.7 apresenta-se, a título ilustrativo, a variação do crescimento de biomassa, do consumo de açúcares redutores (neste caso, glucose) e da concentração de oxigénio dissolvido no meio, no biorreactor Biolab.

As condições de operação usadas neste crescimento foram de 400 rpm e 0.9 vvm.

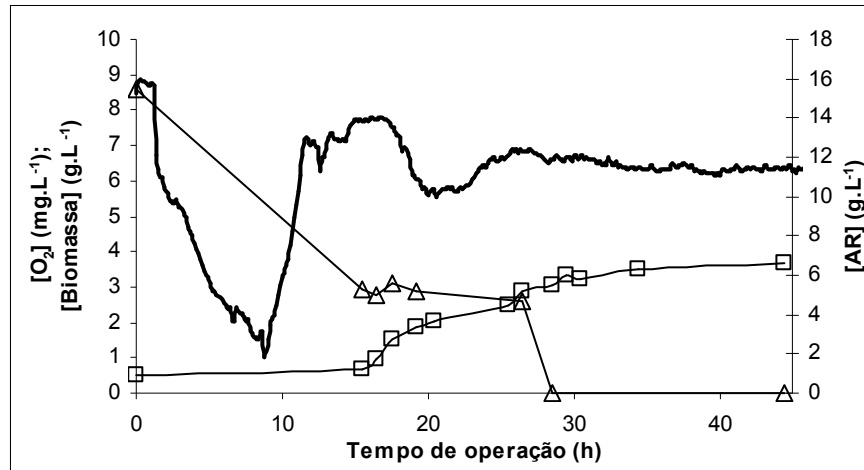


Figura 4.7 – Variação da concentração de biomassa (□), concentração de açúcares redutores, [AR], (△) e concentração de oxigênio dissolvido no meio, [O<sub>2</sub>], a 27 °C, 400 rpm e com um caudal de arejamento de 0.9 vvm.

Pode verificar-se que a fase estacionária começa após 28 horas de crescimento, o que é visível pelo crescimento celular, que é praticamente nulo a partir deste tempo de cultura, e pelo consumo total da glucose.

A taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) de *Yarrowia lipolytica* nestas condições foi de 0.35 h<sup>-1</sup>. Aguedo (2002) obteve  $\mu = 0.33$  h<sup>-1</sup> no seu trabalho, realizando o crescimento das leveduras em 200 mL de meio de cultura, em matrizes de 500 mL, mantidos a 27 °C, sob uma agitação de 140 rpm.

Conforme se pode observar na Figura 4.7, a concentração de oxigênio dissolvido no meio após uma hora de crescimento começou a decair, atingindo valores da ordem de 1 mg.L<sup>-1</sup>, aproximadamente às 9 horas de crescimento, o que ilustra as elevadas necessidades de oxigênio da estirpe de levedura utilizada. Após este tempo, o oxigênio dissolvido tornou a aumentar até 8 mg.L<sup>-1</sup>, mantendo-se a esta concentração durante cerca de 2 horas, para voltar a decair até valores na ordem dos 6 mg.L<sup>-1</sup>, por volta das 20 horas de crescimento. A partir das 25 horas de crescimento, a concentração de oxigênio dissolvido no meio manteve-se mais ou menos constante com valores entre 6.5 e 7 mg.L<sup>-1</sup>.

O  $K_{La}$  foi determinado através do método dinâmico às 21 h (fase exponencial) e às 32 h (fase estacionária) de crescimento, assim como a  $OUR$  e  $q_{O_2}$ . Os valores são apresentados na Tabela 4.1.

**Tabela 4.1 – Valores de  $K_{La}$ ,  $OUR$  e  $q_{O_2}$  determinados nas fases exponencial e estacionária, ao longo de um crescimento de *Yarrowia lipolytica*.**

Tempo (h)	$K_{La}$ ( $h^{-1}$ )	$OUR$ ( $g.L^{-1}.h^{-1}$ )	$q_{O_2}$ ( $g.g^{-1}.h^{-1}$ )
21	73	0.117	0.06
32	75	0.065	0.02

Analisando a Tabela 4.1, verifica-se que o  $K_{La}$  manteve-se praticamente constante nas fases exponencial e estacionária. Já a taxa de consumo de oxigénio pelas células diminuiu para quase metade do seu valor na fase exponencial e a taxa específica de consumo de oxigénio diminuiu um terço do seu valor. Os valores de  $q_{O_2}$  obtidos, quando comparados com os valores máximos de  $q_{O_2}$  da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a crescer em glucose, que são de  $0.16 g.g^{-1}.h^{-1}$  (Belo, 2003), são bastante baixos, o que significa que muito provavelmente ainda são inferiores ao valor máximo para esta levedura.

### 4.3 Produção de $\gamma$ -decalactona

Após a fase de crescimento, as células foram transferidas para o meio de biotransformação para se promover a produção de  $\gamma$ -decalactona por biotransformação do ricinoleato de metilo. Esta produção foi estudada em função das condições de operação, nomeadamente de agitação e arejamento e, conseqüentemente, dos valores de  $K_{La}$  do meio. A título ilustrativo, apresenta-se na Figura 4.8 a evolução, ao longo do tempo, da concentração de oxigénio dissolvido no meio e da produção de  $\gamma$ -decalactona em duas biotransformações com condições de operação bastante distintas: A. 300 rpm e 0.3 vvm; B. 600 rpm e 0.9 vvm.

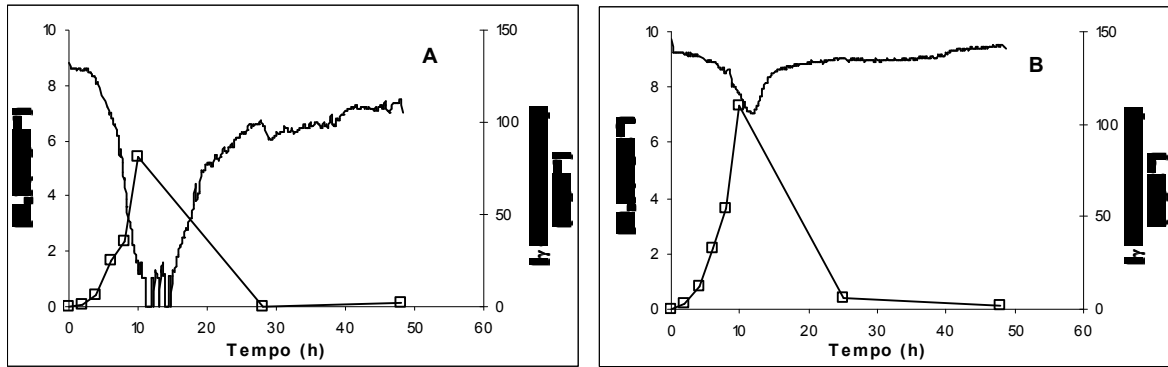


Figura 4.8 – Variação, ao longo do tempo, da concentração de oxigénio dissolvido e da produção de  $\gamma$ -decalactona a diferentes velocidades de agitação e caudais de arejamento: A, 300 rpm e 0.3 vvm; B, 600 rpm e 0.9 vvm.

Conforme se pode observar na Figura 4.8, no ensaio com as condições de operação de baixa agitação e arejamento, houve completa depleção do oxigénio dissolvido no meio. Pelo contrário, perante condições de operação com elevada agitação e arejamento, a concentração de oxigénio dissolvido manteve-se em valores superiores a 70 % da saturação durante toda a experiência.

De um modo geral, foi observado em todos os ensaios que a concentração de  $\gamma$ -decalactona aumenta até atingir o seu valor máximo, que geralmente é obtido às 10 horas de biotransformação. Após este tempo, a concentração de  $\gamma$ -decalactona começa a diminuir até desaparecer totalmente. Este decréscimo deve-se ao facto de este metabolito ser degradado pelas leveduras.

Se se comparar a produção máxima deste composto nos dois exemplos apresentados, verifica-se que em A, obteve-se um máximo de produção de  $78 \text{ mg.L}^{-1}$  e em B, de  $110 \text{ mg.L}^{-1}$ , o que sugere que condições de operação que garantam valores superiores de  $K_{La}$ , à partida, favorecem a produção de  $\gamma$ -decalactona.

#### 4.4 Efeito dos valores de $K_{La}$ na produção de $\gamma$ -decalactona

A influência dos valores de  $K_{La}$  na produção de  $\gamma$ -decalactona foi estudada em várias biotransformações com diferentes condições de operação. Na Tabela 4.2 apresentam-se os resultados obtidos nas diferentes biotransformações. As determinações de  $K_{La}$  e  $OUR$  foram efectuadas às 9 horas de biotransformação. A contagem celular foi realizada às 10 horas de biotransformação.



Tabela 4.2 - Valores de  $K_{La}$  e concentração celular a diferentes condições de operação.

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7
Agitação (rpm)	300	300	400	400	600	600	600
Arejamento (vvm)	0.3	0.6	0.3	0.6	0.6	0.9	1.8
$K_{La}$ experimental sem células ( $h^{-1}$ ) <sup>(*)</sup>	$24 \pm 1.8$	$25 \pm 2.5$	$43 \pm 0.7$	$54 \pm 1.2$	$85 \pm 0.9$	$88 \pm 3.3$	(ND)
Nº células. mL <sup>-1</sup>	$1.07 \times 10^7$	$5.15 \times 10^6$	$1.18 \times 10^7$	$1.44 \times 10^7$	$5.34 \times 10^7$	$4.19 \times 10^7$	$5.75 \times 10^6$
$K_{La}$ experimental com células ( $h^{-1}$ )	$26 \pm 2.6$	$32 \pm 3.2$	$49 \pm 4.9$	$70 \pm 7$	$102 \pm 10.2$	$125 \pm 12.5$	$151 \pm 15.1$
$K_{La}$ teórico ( $h^{-1}$ )	26	34	41	54	104	123	162

(\*) Este valor é apresentado com o desvio padrão de 3 réplicas.

(ND) Dado não disponível por limitações experimentais.

Comparando o  $K_{La}$  experimental sem células e o  $K_{La}$  experimental com células nos vários ensaios, verifica-se que para a gama de número de células, por mililitro, utilizada neste trabalho,  $5.15 \times 10^6$  e  $5.34 \times 10^7$ , a presença de células activas no meio pode aumentar até 40 % (ensaio 6) o valor de  $K_{La}$  do sistema. A variação deste aumento está relacionada com as condições de operação. Assim, verifica-se um maior aumento dos valores de  $K_{La}$  com células nos casos em que as condições de operação originam valores mais elevados de  $K_{La}$  (maiores velocidades de agitação e caudais de arejamento). Contudo, se a comparação for estabelecida entre o  $K_{La}$  previsto pela correlação expressa pela Equação 4.7 e o  $K_{La}$  determinado durante a biotransformação, verifica-se que os valores deste parâmetro são muito próximos, obtendo-se uma correlação linear entre os valores, com declive praticamente igual à unidade. Assim, não foi proposta nenhuma correcção aos valores de  $K_{La}$  previstos pela correlação expressa pela Equação 4.7 devido à presença de células.

Segundo Ju e Sundararajan (1995), as células podem afectar as taxas de transferência de oxigénio por três mecanismos: pela respiração das células acumuladas na interface gás-líquido, pela presença física das células como partículas sólidas, e pela modificação do meio pelas células. No seu estudo, estes autores verificaram que, de um modo geral, o efeito das

células foi aumentar as taxas de transferência de oxigénio. A presença física das células como partículas sólidas diminuiu a transferência de oxigénio, possivelmente devido à baixa permeabilidade do oxigénio na camada de células acumulada junto à superfície das bolhas. A respiração das células e a modificação do meio, por seu lado, aumentaram as taxas de transferência de oxigénio

Na origem do aumento do  $K_{La}$  na presença de células, neste trabalho, poderá estar:

- a presença física das células como partículas sólidas. Vários estudos mostraram que as células, como partículas sólidas, podem mudar a situação hidrodinâmica na vizinhança da interface gás-líquido. Andrews *et al.* (1980a; 1980b) propuseram uma teoria para descrever o efeito das células na transferência de oxigénio a partir de um aumento de bolhas. De acordo com esta teoria, o arraste hidrodinâmico nas células agarradas a uma bolha irá mover a interface que, de outro modo, ficaria imóvel devido aos materiais dos meios de fermentação adsorvidos à superfície. Foi demonstrado que a eficiência da colisão das células é maior caso a interface de bolhas se estiver a mover do que se estiver estacionária. O aumento da intersecção origina mais células agarradas à interface, maior arraste e maior movimento interfacial. Este fenómeno, conhecido como “efeito bola de neve” pode resultar em valores de transferência de massa maiores, aumentando assim a transferência de oxigénio.
- a respiração das células acumuladas na interface gás-líquido. Bartholomew *et al.* (1950) propuseram que o oxigénio pode ser directamente transferido das bolhas de gás para os microrganismos a respirar, acumulados na interface gás-líquido. Assim, as resistências às transferências de massas dos filmes líquidos à volta das bolhas de gás e das células são eliminados.

Na Tabela 4.3 apresenta-se a produção máxima de  $\gamma$ -decalactona nas várias biotransformações realizadas sob diferentes condições de operação.

Tabela 4.3 – Produção de  $\gamma$ -decalactona a diferentes valores de  $K_{La}$ .

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7
$K_{La}$ experimental (h <sup>-1</sup> )	26	32	49	70	102	125	151
$\gamma$ -decalactona (mg.L <sup>-1</sup> )	78 ± 12	60 ± 9	73 ± 11	141 ± 21	86 ± 13	110 ± 17	90 ± 14

Analisando os resultados apresentados na Tabela 4.3, verifica-se que a produção de  $\gamma$ -decalactona foi, de uma forma geral, baixa, quando comparada com a produção obtida por Aguedo (2002) em matraz, contendo 200 mL de meio, sob agitação de 140 rpm. Nestas condições, este autor obteve produções na ordem dos 250-300 mg.L<sup>-1</sup>. Esta diferença significativa pode ser justificada pelo uso de inóculos com concentrações diferentes. Nomeadamente, este autor utilizou inóculos com concentrações na ordem de 10<sup>8</sup> células por mL, enquanto neste trabalho foram utilizados inóculos na ordem de 10<sup>7</sup> células por mL.

Embora haja uma ligeira tendência para a produção de  $\gamma$ -decalactona aumentar com o aumento do  $K_{La}$ , os resultados não foram suficientes para estabelecer uma correlação entre estas variáveis. Aplicando uma análise de variância aos dados da tabela (ANOVA, anexo 3) verifica-se que estatisticamente (P=0.05) existem diferenças significativas na produção de  $\gamma$ -decalactona. Assim, os resultados indicam existir um máximo de produção do aroma para valores de  $k_{La}$  da ordem de 70 h<sup>-1</sup>, que foi obtido para condições de agitação e arejamento de 400 rpm e 0.6 vvm, respectivamente. Estas condições são intermédias relativamente aos restantes ensaios e parecem ser suficientes para uma produção de  $\gamma$ -decalactona máxima para as restantes condições operatórias utilizadas, com base na quantidade de biomassa existente e na quantidade de substrato a degradar. Utilizando condições de agitação mais baixas, o processo de produção não é tão eficiente, provavelmente devido à possibilidade de não se formar uma emulsão homogénea. Por outro lado, utilizando condições de agitação superiores, podem ser desencadeadas alterações metabólicas e ocorrer atrito hidrodinâmico sob as células devido às tensões de corte causadas pela agitação. Este atrito pode provocar stresse nas células, alterar a sua morfologia e diminuir a sua viabilidade. Contudo, e no que a esta diz respeito, este factor foi monitorizado e não se verificou decréscimo na viabilidade celular com o aumento da agitação. Relativamente às alterações na morfologia, como já foi referido, a levedura *Yarrowia lipolytica* pode apresentar dois aspectos morfológicos distintos: sob as

formas oval e de filamento. Embora Aguedo (2002) tenha verificado que a morfologia celular não influencia a produção de  $\gamma$ -decalactona, nos ensaios em biorreactor, podem ocorrer danos nos filamentos de levedura, que poderão afectar a produção de  $\gamma$ -decalactona. É relevante mencionar que a população de filamentos, observada ao microscópio, não é negligenciável.

Convém ainda salientar que o uso de condições de agitação intermédias em contraste com o uso de condições mais elevadas tem a vantagem de limitar os custos energéticos com a potência consumida pelo agitador.

## 4.5 Efeito do oxigénio dissolvido na produção de $\gamma$ -decalactona

Com o intuito de estudar o efeito do oxigénio dissolvido na biotransformação, efectuaram-se ensaios com oxigénio puro no biorreactor Biolab, ensaios com ar no biorreactor Parr e por fim, ensaios a oxigénio controlado no biorreactor Biostat.

### 4.5.1 Oxigénio puro (biorreactor Biolab)

Foram realizados ensaios com velocidade de agitação de 400 rpm e caudal de arejamento de 0.6 vvm, utilizando oxigénio puro. Na Tabela 4.4 apresentam-se os resultados, de um dos ensaios efectuados, relativos à determinação de  $K_{La}$  às 9 horas de biotransformação, assim como o número de células às 10 horas.

Tabela 4.4 -Valores de  $K_{La}$  e concentração celular, utilizando oxigénio puro.

$K_{La}$ experimental sem células ( $\text{h}^{-1}$ )	Nº células. $\text{mL}^{-1}$	$K_{La}$ experimental com células ( $\text{h}^{-1}$ )
$46 \pm 3.4$	$7.92 \times 10^6$	$78 \pm 7.8$

Comparando estes resultados com os obtidos quando utilizando ar (ensaio 4, Tabela 4.2), verifica-se que o  $K_{La}$  experimental sem células não sofreu grande alteração, sendo ligeiramente menor quando se utilizou oxigénio puro. Relativamente aos valores de  $K_{La}$  experimental com células, também não houve grandes variações em relação aos valores obtidos quando se utilizou ar, confirmando-se o efeito positivo das células activas no valor de  $K_{La}$ .

A produção máxima de  $\gamma$ -decalactona obtida neste ensaio foi de  $(75 \pm 11)$  mg.L<sup>-1</sup>.

Comparando a produção de  $\gamma$ -decalactona em condições de agitação e arejamento semelhantes (400 rpm e 0.6 vvm, respectivamente), variando apenas o gás de arejamento (ensaio 4, Tabela 4.3), verifica-se que se obteve uma maior produção ( $(141 \pm 21)$  mg.L<sup>-1</sup>) quando se utilizou ar em vez de oxigénio puro, o que pode significar que o fluxo de oxigénio utilizado e o valor de concentração de oxigénio dissolvido atingidos, provavelmente foram excessivos, podendo, por um lado, ter sujeitado as células a uma situação de stresse oxidativo, tendo inibido a produção de  $\gamma$ -decalactona, ou ter causado desvios na via da  $\beta$ -oxidação peroxisomal.

#### 4.5.2 Pressão de ar (biorreactor Parr)

Com o objectivo de identificar possíveis efeitos de stresse oxidativo ou stresse hiperbárico na produção de  $\gamma$ -decalactona, foram realizados ensaios no biorreactor Parr, que permite operar a valores de pressão de ar superiores à atmosférica. Para tal, além de se realizar a biotransformação do ricinoleato de metilo em  $\gamma$ -decalactona a variadas pressões, realizaram-se previamente crescimentos celulares em meio com glucose a diferentes pressões, para investigar também o efeito do oxigénio no crescimento das células. Desta forma, apresentam-se na Figura 4.9 três crescimentos celulares a diferentes pressões.

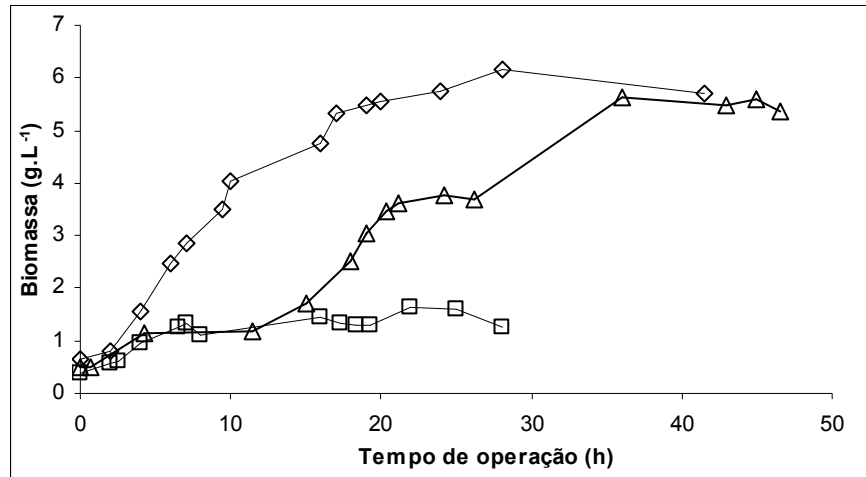


Figura 4.9 – Crescimento de *Yarrowia lipolytica* a 400 rpm e 0.9 vvm a condições normais de pressão e temperatura (PTN), sob diferentes pressões: (◇) 0.5 MPa, (△) 0.1 MPa e (□) 1 MPa.

Analisando a Figura 4.9, constata-se que o crescimento celular é superior quando se aplicam pressões de 0.5 MPa e de 0.1 MPa e que, pelo contrário, é bastante reduzido quando sujeito a pressões de 1 MPa. Relativamente aos dois primeiros casos, o valor máximo de concentração celular obtido em ambos, não diferiu muito, tendo sido de 6.1 g.L<sup>-1</sup> e de 5.6 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. No entanto, o crescimento foi muito mais lento no segundo caso, razão pela qual o crescimento máximo também foi atingido posteriormente: quando se aplicaram pressões de 0.5 MPa o crescimento máximo foi obtido às 28 horas, enquanto que, quando se aplicaram pressões de 0.1 MPa foi às 36 horas. No ensaio em que se aplicaram pressões de 1 MPa, obteve-se um crescimento máximo de 1.6 g.L<sup>-1</sup> às 22 horas de crescimento.

Analisando a Tabela 4.5 onde se apresentam as taxas específicas de crescimento de cada ensaio, verifica-se que à pressão de 0.5 MPa obtém-se o maior valor. Para as pressões de 0.1 MPa e 1 MPa, as taxas específicas de crescimento são bastante semelhantes, o que se deve ao lento crescimento no primeiro caso e ao reduzido no segundo.

Importa salientar que, no que concerne ao crescimento celular a uma pressão de 0.5 MPa de ar, a que corresponde uma pressão parcial de oxigénio de cerca de 0.1 MPa, equivalente a oxigénio puro à pressão normal, não foi observada inibição de crescimento; pelo contrário, observou-se uma estimulação da velocidade de crescimento das células pela maior disponibilidade de oxigénio.

Tabela 4.5 – Taxas específicas de crescimento de *Yarrowia lipolytica* a diferentes pressões.

Pressão (MPa)	$\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )
0.1	0.12
0.5	0.21
1	0.15

Comparando as taxas específicas de crescimento obtidas neste biorreactor com a obtida no biorreactor Biolab ( $\mu = 0.35 \text{ h}^{-1}$ ), verifica-se que são bastante inferiores. No entanto, os resultados obtidos neste biorreactor não podem ser comparados directamente com os do biorreactor Biolab, porque têm geometrias completamente diferentes. Os seus desenhos, assim como o tipo de agitadores também são bastante distintos, o que provoca um stress hidrodinâmico diferente, que influencia o comportamento celular.

No que diz respeito à produção do composto aromático, os resultados obtidos correspondentes a diversos ensaios em que se aplicaram diferentes pressões, tanto na fase de crescimento como na de biotransformação, são apresentados na Figura 4.10.

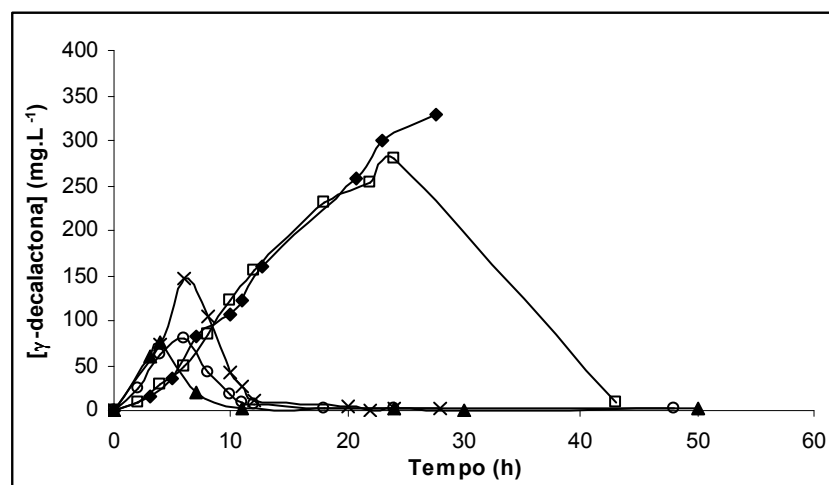


Figura 4.10 – Produção de  $\gamma$ -decalactona a 400 rpm e 0.9 vvm (PTN), sob diferentes condições de pressão durante o crescimento e biotransformação, respectivamente: (◆) 0.1 MPa, 0.1 MPa, (□) 0.5 MPa, 0.5 MPa, (×) 0.1 MPa, 1 MPa, (▲) 0.1 MPa, 0.5 MPa e (○) 0.5 MPa, 0.5 MPa.

Analisando a Figura 4.10, verifica-se que se obtiveram maiores quantidades de  $\gamma$ -decalactona (bastante superiores às obtidas no biorreactor Biolab) quando se utilizou, durante a biotransformação, uma pressão de 0.1 MPa (pressão ambiente) e durante o crescimento pressões de 0.1 MPa e 0.5 MPa. As concentrações obtidas nos dois casos foram bastante

semelhantes ( $328 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $280 \text{ mg.L}^{-1}$ , respectivamente), o que confirma a inexistência de inibição da actividade microbiana desta estirpe quando pré-exposta a uma pressão de 0.5 MPa.

As menores produções de  $\gamma$ -decalactona foram obtidas quando se utilizaram pressões de 0.5 MPa na biotransformação e de 0.1 MPa e 0.5 MPa no crescimento. Embora a produção nestes dois casos seja bastante semelhante, foi ligeiramente mais lenta no segundo caso. Mais uma vez se verifica que a exposição das células, durante a fase de crescimento, a uma pressão mais elevada de oxigénio, não induziu adaptação às condições hiperbáricas no que diz respeito ao funcionamento da  $\beta$ -oxidação peroxisomal.

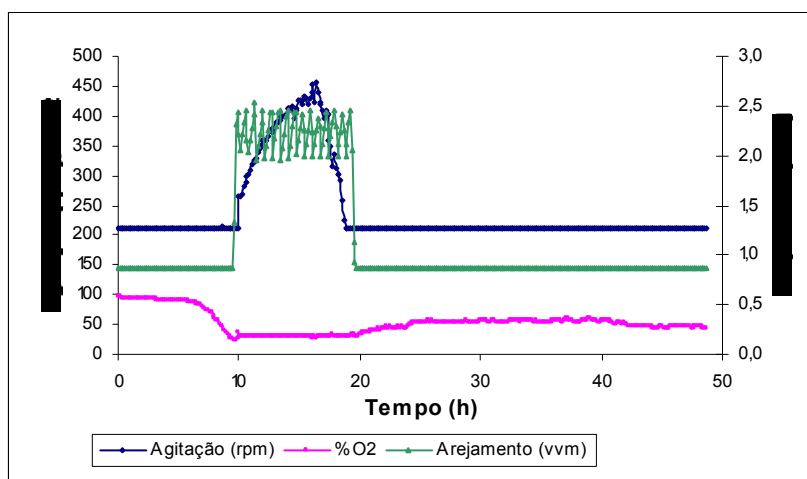
A produção com valores intermédios foi obtida quando se aplicaram pressões de 0.1 MPa e 1 MPa nas fases de crescimento e de biotransformação, respectivamente.

Comparando os diferentes resultados, constata-se que a aplicação de pressão na fase de biotransformação também não é vantajosa para a produção de  $\gamma$ -decalactona, já que os valores superiores de concentração de  $\gamma$ -decalactona foram obtidos quando se aplicou a pressão atmosférica. No entanto, comparando os resultados em que se utilizaram pressões de 0.1 MPa na fase de crescimento e 0.5 e 1 MPa, respectivamente, na fase de biotransformação, verifica-se que este aumento de pressão no último caso praticamente duplicou a produção de  $\gamma$ -decalactona.

#### 4.5.3 Oxigénio controlado (biorreactor Biostat)

Com base nos resultados obtidos na Figura 4.8, pretendeu-se verificar qual a influência na produção de  $\gamma$ -decalactona se se utilizassem concentrações controladas de oxigénio dissolvido no meio durante todo o bioprocessamento, permitindo a variação do  $K_{La}$  ao longo do tempo pela variação automática da velocidade de agitação e do arejamento. Desta forma, realizaram-se ensaios de modo a não permitir que a concentração de oxigénio descesse a níveis inferiores a 30 % de saturação de oxigénio (Figura 4.11).





**Figura 4.11 – Variação das condições de operação (agitação e arejamento) ao longo de uma biotransformação realizada a concentração de oxigênio controlada.**

Analisando a Figura 4.11, verifica-se que até às 10 horas de biotransformação, a concentração de oxigênio dissolvido no meio manteve-se elevada, tal como se verificou no gráfico A da Figura 4.8. Após este tempo, o sistema atingiu a concentração de 30 % de saturação de oxigênio, altura em que o caudal de arejamento e a velocidade de agitação aumentaram bruscamente, de modo a que o sistema se conseguisse manter com esses valores de percentagem de saturação de oxigênio. Este tempo coincide com o tempo de biotransformação em que normalmente se atingem os valores mais elevados na produção de  $\gamma$ -decalactona (Figura 4.8). No entanto, neste caso, o máximo de produção foi obtido mais tarde, às 24 horas de biotransformação (Tabela 4.6).

Por volta das 20 horas, verifica-se que o caudal de arejamento e a velocidade de agitação voltaram aos valores iniciais e que a percentagem de saturação de oxigênio no meio manteve-se mais ou menos constante, a valores de 50 %, aproximadamente.

**Tabela 4.6 – Concentrações celular e de  $\gamma$ -decalactona obtidas a diferentes tempos de biotransformação.**

Tempo (h)	Nº células.mL <sup>-1</sup>	$\gamma$ -decalactona (mg.L <sup>-1</sup> )
0	$2.90 \times 10^6$	0
10	$1.22 \times 10^7$	27
24	$1.95 \times 10^7$	37

É importante referir que não foram recolhidas amostras entre as 10 e as 24 horas, pelo que não se pode afirmar existir, num tempo intermédio, algum valor superior aos apresentados. Porém, com base nos resultados obtidos, verifica-se que o valor às 10 h, bem como o valor máximo de produção de  $\gamma$ -decalactona nestas condições são bastante baixos quando comparados com os obtidos em biotransformações em que não se controlou a concentração de oxigénio (Tabela 4.3), nomeadamente, no ensaio representado na Figura 4.8 pelo gráfico A, em que se obteve uma produção máxima de  $78 \text{ mg.L}^{-1}$ . Este facto confirma que a limitação de oxigénio na fase de maior produção influencia a produção de  $\gamma$ -decalactona e que é bastante importante operar em condições de operação que assegurem uma elevada taxa de transferência de oxigénio.

Não se controlaram concentrações mais altas de saturação de oxigénio porque, observando o gráfico B da Figura 4.8, constata-se que a concentração de oxigénio dissolvido no meio se manteve sempre elevada.

Ressalve-se ainda que teria sido preferível ter realizado este ensaio, a oxigénio controlado, no biorreactor Biolab, onde foram realizados os restantes ensaios à pressão atmosférica, o que não foi possível por limitações experimentais.

#### 4.6 Efeito do oxigénio na via metabólica da produção de lactona

A via metabólica da levedura implicada na biotransformação do ricinoleato de metilo em  $\gamma$ -decalactona é a  $\beta$ -oxidação peroxisomal (sub-capítulo 2.3).

O ácido-4-hidroxidecanoico (precursor directo da  $\gamma$ -decalactona) pode ser degradado, pelas enzimas da  $\beta$ -oxidação peroxisomal, em vários compostos que aparecem no meio de biotransformação. É o caso do dec-3-en-4-olido, dec-2-en-4-olido e 3-hidroxi- $\gamma$ -decalactona, que foram também quantificados para além da  $\gamma$ -decalactona (sub-capítulo 3.4.4).

Foi demonstrado por Blin-Perrin *et al.* (2000) que os vários intermediários da degradação podem sair livremente dos peroxisomas para o meio, podendo desta forma ser quantificados.

As concentrações destes compostos no meio variam principalmente com a actividade das enzimas acetil-CoA oxidase e 3-hidroxiacetil-CoA desidrogenase, que é influenciada pelo oxigénio. Desta forma, fornecem, de forma indirecta, informações sobre a influência do oxigénio no controlo da via metabólica.

### 4.6.1 Efeito do oxigénio à pressão atmosférica

Os resultados obtidos nos ensaios de biotransformação apresentam-se na Figura 4.12.

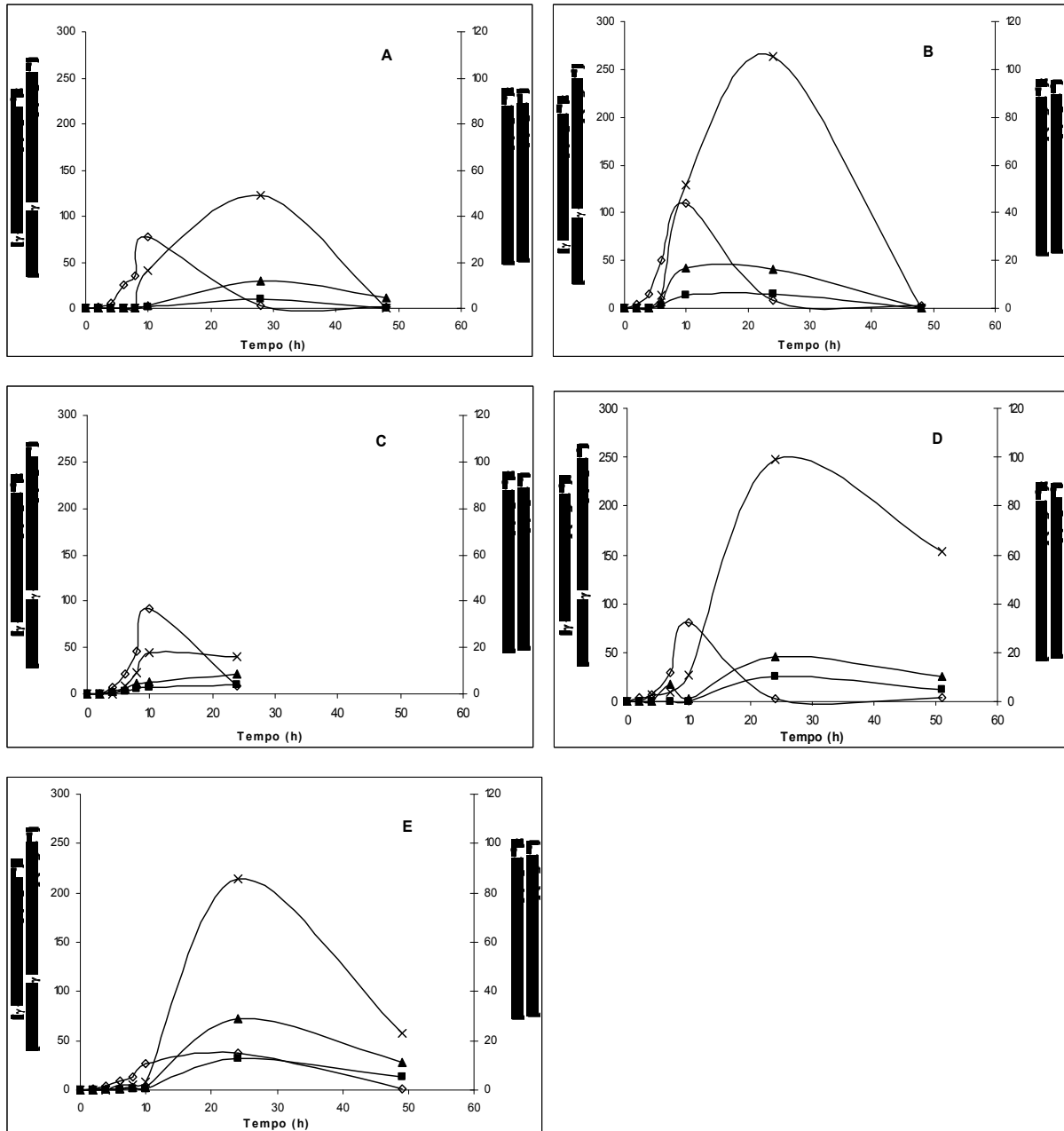


Figura 4.12 – Concentração dos compostos 3-dec-en-4-olido (■),  $\gamma$ -decalactona (◇), 2-dec-en-4-olido (▲) e 3-hidroxi- $\gamma$ -decalactona (×) em diferentes condições de operação: A, 300 rpm e 0.3 vvm; B, 600 rpm, 0.9 vvm; C, 600 rpm e 1.8 vvm; D, 400 rpm e 0.6 vvm, com oxigénio puro; E, concentração de oxigénio controlada a 30 % de saturação.

Analisando os resultados da Figura 4.12, verifica-se que aumentando o arejamento de um caudal de 0.3 vvm para 0.9 vvm (gráficos A e B) e, conseqüentemente, a concentração de

oxigénio dissolvido no meio, ocorre um grande aumento da produção de 3-hidroxi- $\gamma$ -decalactona (de 122 mg.L<sup>-1</sup> para 263 mg.L<sup>-1</sup>), enquanto que a produção de  $\gamma$ -decalactona (de 78 mg.L<sup>-1</sup> para 110 mg.L<sup>-1</sup>) aumenta ligeiramente. A acumulação destes dois compostos ocorre quando a 3-hidroxi-acetil-CoA desidrogenase e a acetil-CoA oxidase, respectivamente, controlam o fluxo da via da  $\beta$ -oxidação. A acetil-CoA oxidase utiliza oxigénio de maneira indirecta na regeneração do cofactor, pelo que um aumento da concentração deste aumentará a sua actividade. Neste caso, esta enzima não será limitante no fluxo, não havendo grande acumulação de  $\gamma$ -decalactona, porque o seu precursor directo é degradado posteriormente. Por sua vez, a actividade da 3-hidroxi-acetil-CoA desidrogenase depende da regeneração do NAD<sup>+</sup>. A re-oxidação do NADH<sub>2</sub> usado nesta via ainda não está bem esclarecida, mas pensa-se estar relacionada com a respiração mitocondrial, pelo que o arejamento também poderá influenciar, de maneira indirecta, a regeneração de NAD<sup>+</sup> e, conseqüentemente, a actividade da enzima. No entanto, aparentemente, neste caso, a 3-hidroxi-acetil-CoA desidrogenase tem uma baixa actividade, pelo que limita o fluxo, promovendo a acumulação de 3-hidroxi- $\gamma$ -decalactona.

Quando se aumenta ainda mais o arejamento, para um caudal de 1.8 vvm (gráfico C), verifica-se que a produção de 3-hidroxi- $\gamma$ -decalactona é bastante reduzida (45 mg.L<sup>-1</sup>), enquanto que a de  $\gamma$ -decalactona não variou muito em relação às restantes condições (90 mg.L<sup>-1</sup>) (gráficos A e B).

Quando se utilizou oxigénio puro (gráfico D) e concentração de oxigénio controlada a 30 % de saturação (gráfico E), verificou-se uma elevada produção de 3-hidroxi- $\gamma$ -decalactona (247 mg.L<sup>-1</sup>), comparável à obtida quando se utilizaram 600 rpm e 0.9 vvm (gráfico B), embora neste último caso tenha sido ligeiramente superior (263 mg.L<sup>-1</sup>). Isto demonstra o controlo da via pela enzima 3-hidroxi-acetil-CoA desidrogenase. No entanto, embora em D, a produção de  $\gamma$ -decalactona tenha sido comparável à dos restantes casos (75 mg.L<sup>-1</sup>), em E, foi bastante inferior (37 mg.L<sup>-1</sup>), o que significa que a actividade da acetil-CoA oxidase é bastante elevada nestas condições.

Relativamente ao composto dec-3-en-4-olido, a sua produção foi sempre reduzida em todos os casos, havendo poucas variações nas diferentes condições. No entanto, a sua produção foi sempre inferior à do dec-2-en-4-olido, provavelmente devido ao facto de este último poder ser originado de duas formas, pela desidratação da 3-hidroxi- $\gamma$ -decalactona e pela lactonização de ácido 4-hidroxi-2-desidrodecanoico, enquanto que o dec-3-en-4-olido é originado apenas pela desidratação da 3-hidroxi- $\gamma$ -decalactona.

É importante salientar o desaparecimento de todos os compostos analisados, o que significa que, à semelhança do que acontece com a  $\gamma$ -decalactona, também estes compostos são posteriormente degradados pelas leveduras.

#### 4.6.2 Efeito do oxigénio a pressão aumentada

Os resultados das análises efectuadas aos ensaios realizados no biorreactor Parr, a diferentes condições de pressão são apresentados de seguida. Estes resultados não podem ser comparados directamente com os anteriormente apresentados devido às diferenças nas condições de operação, como já foi referido.

Na Figura 4.13, apresentam-se os resultados obtidos no biorreactor Parr, sem exposição a pressões acrescidas.

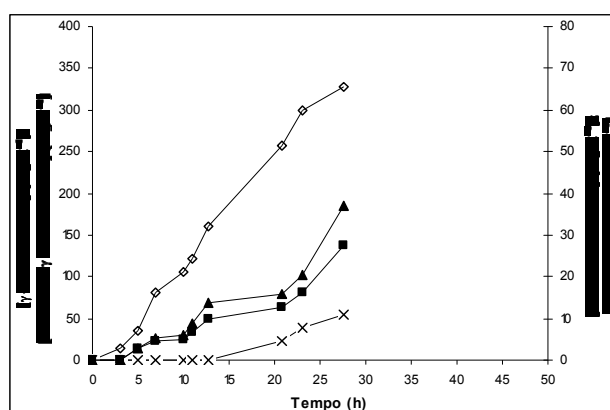


Figura 4.13 - Concentração dos compostos 3-dec-en-4-olido (■),  $\gamma$ -decalactona (◇), 2-dec-en-4-olido (▲) e 3-hidroxi- $\gamma$ -decalactona (x) a 400 rpm e 0.9 vvm (PTN), a 0.1 MPa durante o crescimento e durante a biotransformação.

Verifica-se que, nestas condições, há uma elevada produção de  $\gamma$ -decalactona (328 mg.L<sup>-1</sup>), contrastando com a baixa produção de 3-hidroxi- $\gamma$ -decalactona (28 mg.L<sup>-1</sup>), o que significa que, neste caso, a enzima limitante da via de  $\beta$ -oxidação é a acetil-CoA oxidase, possuindo baixa actividade, o que permite a lactonização do ácido 4-hidroxicanoico (Figura 4.17). Relativamente às concentrações dos compostos dec-3-en-4-olido e dec-2-en-4-olido, constata-se que não são muito elevadas. O efeito da pressão na fase de crescimento das células e, conseqüentemente, na produção dos compostos, é apresentado na Figura 4.14.

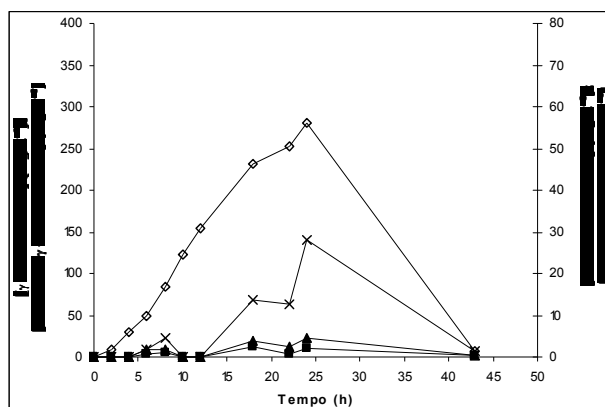
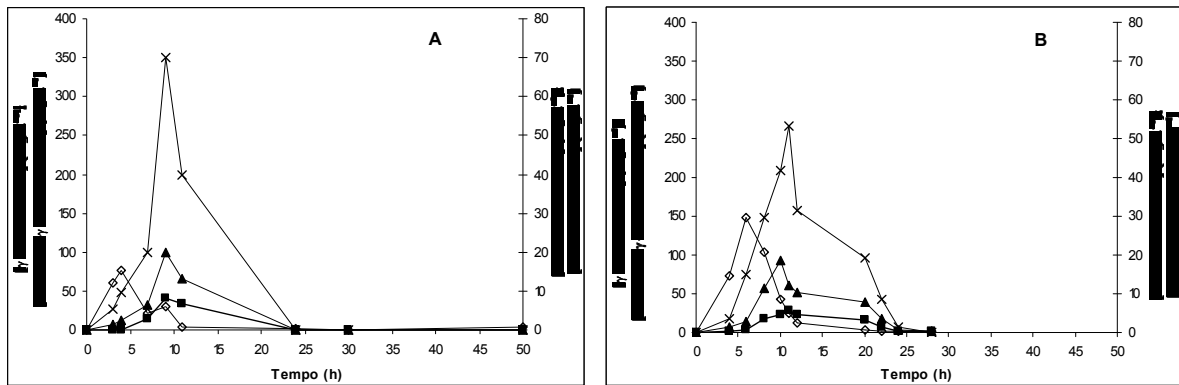


Figura 4.14 - Concentração dos compostos 3-dec-en-4-olido (■),  $\gamma$ -decalactona (◇), 2-dec-en-4-olido (▲) e 3-hidroxi- $\gamma$ -decalactona (×) a 400 rpm e 0.9 vvm (PTN), a 0.5 MPa durante o crescimento e 0.1 MPa durante a biotransformação.

A produção de  $\gamma$ -decalactona também foi bastante elevada nestas condições (280  $\text{mg.L}^{-1}$ ), embora ligeiramente inferior à obtida no caso anterior, quando não se aplicou pressão acrescida na fase de crescimento. No entanto, neste caso, a produção de 3-hidroxi- $\gamma$ -decalactona (141  $\text{mg.L}^{-1}$ ) foi superior à do caso anterior (28  $\text{mg.L}^{-1}$ ), o que significa que a aplicação de pressões de 0.5 MPa na fase de crescimento diminui a actividade da enzima 3-hidroxiacetil-CoA desidrogenase, que vai limitar o fluxo da via da  $\beta$ -oxidação, exercendo algum controlo na via, permitindo a acumulação de 3-hidroxi- $\gamma$ -decalactona. Porém, a enzima limitante nestas condições parece ser a acetil-CoA oxidase que, pela sua baixa actividade, permite grande acumulação de  $\gamma$ -decalactona e menor de 3-hidroxi- $\gamma$ -decalactona (Figura 4.17).

A produção de dec-3-en-4-olido e de dec-2-en-4-olido foi bastante reduzida.

Os resultados relativos à aplicação de pressões acrescidas somente na fase de biotransformação, são apresentados na Figura 4.15.

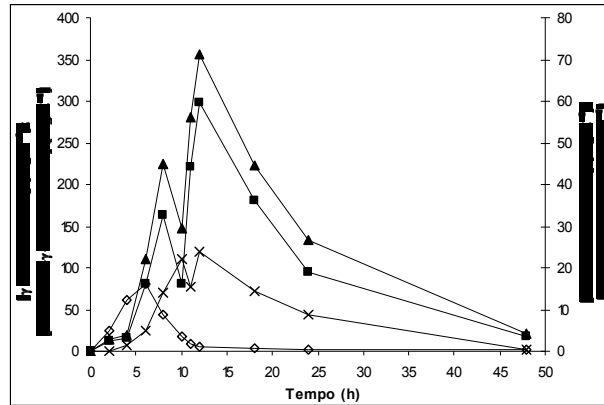


**Figura 4.15 - Concentração dos compostos 3-dec-en-4-olido (■),  $\gamma$ -decalactona (◇), 2-dec-en-4-olido (▲) e 3-hidroxi- $\gamma$ -decalactona (×) a 400 rpm e 0.9 vvm (PTN), em diferentes condições de pressão durante o crescimento e durante a biotransformação: A, 0.1 MPa e 0.5 MPa; B, 0.1 MPa e 1 MPa, respectivamente.**

Analisando os dois gráficos da Figura 4.15, verifica-se que a aplicação de pressões acrescidas na fase de biotransformação favorece a acumulação da 3-hidroxi- $\gamma$ -decalactona, sendo esta acumulação superior quando se utilizam pressões de 0.5 MPa (351 mg.L<sup>-1</sup>). No que diz respeito à  $\gamma$ -decalactona, a sua produção foi superior quando se utilizaram pressões de 1 MPa (148 mg.L<sup>-1</sup>), o que significa que, nestas condições de pressão, a acetil-CoA oxidase controla melhor a via de  $\beta$ -oxidação do que quando sujeita a pressões de 0.5 MPa (Figura 4.17).

As concentrações dos compostos dec-3-en-4-olido e dec-2-en-4-olido foram reduzidas em ambos os casos.

Quando se aplicaram pressões de 0.5 MPa nas fases de crescimento e de biotransformação, obtiveram-se os resultados apresentados na figura seguinte.



**Figura 4.16 - Concentração dos compostos 3-dec-en-4-olido (■),  $\gamma$ -decalactona (◇), 2-dec-en-4-olido (▲) e 3-hidroxi- $\gamma$ -decalactona (×) a 400 rpm e 0.9 vvm (PTN), a 0.5 MPa durante o crescimento e durante a biotransformação.**

Pela observação da Figura 4.16, constata-se que não houve elevada produção dos compostos  $\gamma$ -decalactona ( $81 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e 3-hidroxi- $\gamma$ -decalactona ( $120 \text{ mg.L}^{-1}$ ). As concentrações obtidas de  $\gamma$ -decalactona nestas condições foram semelhantes àquelas em que se utilizou pressão de 0.5 MPa apenas na fase de biotransformação, enquanto que as concentrações obtidas de 3-hidroxi- $\gamma$ -decalactona foram semelhantes às obtidas quando se utilizou uma pressão de 0.5 MPa na fase de crescimento.

Curiosamente, nestas condições obtiveram-se elevadas produções de dec-2-en-4-olido ( $71 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e de dec-3-en-4-olido ( $60 \text{ mg.L}^{-1}$ ), quando comparadas com os restantes ensaios realizados, o que leva a crer que a enzima limitante da via da  $\beta$ -oxidação, nestas condições, é a 3-hidroxiacetil-CoA desidrogenase.

Verifica-se que quando se utilizam pressões acrescidas na fase de biotransformação, a cinética de produção de  $\gamma$ -decalactona é mais rápida, o que significa que nestas condições, a degradação do ricinoleato de metilo até ao ácido 4-hidroxi-decanoico é melhorada com o aumento da pressão parcial de oxigénio, o que não acontece nas outras condições testadas.

Na Figura 4.17 apresenta-se um resumo do efeito do oxigénio sobre as enzimas da via da  $\beta$ -oxidação, nas várias condições de operação testadas.



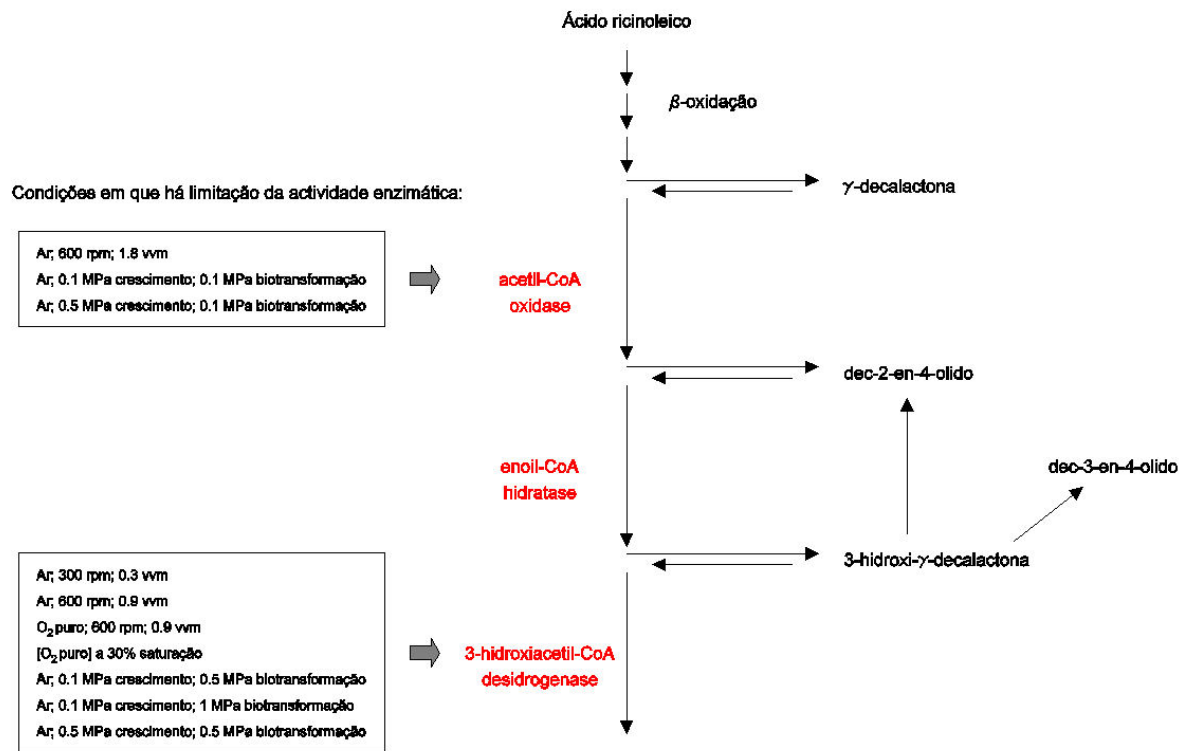


Figura 4.17 – Resumo do efeito do oxigénio na actividade das enzimas da  $\beta$ -oxidação nas várias condições operatórias testadas.

Conclui-se que a maior produtividade de  $\gamma$ -decalactona é obtida no biorreactor Parr ( $328 \text{ mg.L}^{-1}$ ) quando se aplicam pressões de 0.1 MPa durante as fases de crescimento e biotransformação, com uma agitação de 400 rpm e um caudal de arejamento de 0.9 vvm.

## **5 Conclusões e Perspectivas de Trabalho**

### **Futuro**

---

Neste capítulo são apresentadas as conclusões do trabalho e as sugestões para desenvolvimentos futuros.

---

No que diz respeito ao estudo do efeito do meio de biotransformação nos valores de  $K_{La}$ , foi possível desenvolver uma correlação empírica que permite prever os seus valores em função das condições de operação e da composição do meio de biotransformação em fase orgânica e em surfactante. Constatou-se que a presença isoladamente da fracção orgânica ou de surfactante aumenta o  $K_{La}$  do sistema. No entanto, tal não acontece quando as duas fracções coexistem no meio.

Para complementar este estudo, seria interessante prosseguir o trabalho da seguinte forma:

- Realizar mais experiências abrangendo gamas de  $K_{La}$  superiores, para alargar a amplitude da correlação obtida.
- Realizar mais experiências abrangendo gamas de fracção de compostos orgânicos superiores, para alargar a amplitude da correlação obtida.
- Efectuar mais experiências de modo a estimar a transferência de oxigénio da fase gasosa para cada uma das fases líquidas, individualmente.
- Determinar a solubilidade do oxigénio na fase orgânica.

Nas determinações de  $K_{La}$  realizadas no meio de biotransformação com células, constatou-se que a presença de células no meio aumenta os seus valores.

Relativamente aos efeitos dos valores de  $K_{La}$  na produção de  $\gamma$ -decalactona, não foi possível estabelecer uma relação directa entre as duas variáveis. No entanto, obteve-se um máximo de produção (entre os valores de  $K_{La}$  testados) do composto aromático ( $141 \pm 21$  mg.L<sup>-1</sup>) para um  $K_{La}$  de 70 h<sup>-1</sup>, obtido para condições de agitação e arejamento de 400 rpm e 0.6 vvm, respectivamente.

Nestes ensaios seria pertinente realizar mais experiências, e com gamas de  $K_{La}$  superiores. Também seria muito útil aplicar planeamento estatístico de experiências, de modo a poder concluir com maior confiança, sobre as condições de operação na produção do aroma.

Em relação ao efeito do oxigénio dissolvido na produção de  $\gamma$ -decalactona, verificou-se que o uso de oxigénio puro como alternativa ao ar, no biorreactor Biolab, praticamente não alterou os valores de  $K_{La}$  e que a maior produção de  $\gamma$ -decalactona foi obtida quando se utilizou ar ( $141 \pm 21$  mg.L<sup>-1</sup>) em vez de oxigénio puro ( $75 \pm 11$  mg.L<sup>-1</sup>).

Neste caso, seria relevante confirmar que esta manutenção dos valores de  $K_{La}$  e diminuição da produção de  $\gamma$ -decalactona é igualmente válida para outras condições de operação, visto que este resultado só foi testado para uma condição de agitação e arejamento.

No que diz respeito ao emprego de pressões totais de ar, verificou-se que a aplicação destas até valores de 0.5 MPa na fase de crescimento, permite um elevado crescimento celular (quando comparado com o obtido nas restantes condições testadas) e que o emprego de pressões de 0.5 MPa favorece a cinética de crescimento. Já a aplicação de pressões de 1 MPa revela a existência de inibição do crescimento pela pressão.

Concluiu-se que a aplicação de pressão acrescida na fase de biotransformação não é vantajosa, tendo-se obtido as maiores produções de  $\gamma$ -decalactona (da ordem dos 300-350 mg.L<sup>-1</sup>) quando se empregaram pressões de 0.1 MPa na fase de biotransformação (pressão atmosférica), utilizando células provenientes do crescimento sujeito a condições de pressão de 0.1 MPa ou de 0.5 MPa.

Para que este estudo ficasse mais completo, seria importante:

- Realizar mais ensaios variando as condições de agitação e arejamento, uma vez que todos os ensaios efectuados no biorreactor Parr foram realizados sob condições de agitação e arejamento de 400 rpm e 0.9 vvm, respectivamente.
- Determinar o  $K_{La}$  neste biorreactor.
- Analisar enzimas antioxidantes e outros parametros fisiológicos de resposta ao stresse oxidativo, de modo a tentar relacionar o stresse oxidativo eventualmente causado pelo aumento da pressão de ar e de oxigénio nas altrações metabólicas observadas.

Relativamente ao ensaio realizado com concentração de oxigénio controlada, concluiu-se que a limitação de oxigénio na fase de maior produção, influencia a produção de  $\gamma$ -decalactona, que foi bastante reduzida, sendo importante utilizar condições de operação que assegurem uma elevada transferência de oxigénio. Assim, seria interessante realizar mais ensaios, controlando concentrações de oxigénio mais elevadas, tal como proceder a estes ensaios no biorreactor Biolab, de modo a que se possam comparar os resultados.

No que diz respeito ao efeito do oxigénio na via metabólica de produção de  $\gamma$ -decalactona, a  $\beta$ -oxidação peroxisomal, verifica-se que a acumulação do aroma pode variar

muito com as actividades das enzimas da  $\beta$ -oxidação. Essas actividades são influenciadas pelas condições de pressão e oxigénio aplicadas na biotransformação.

Quando a acetil-CoA oxidase tem menor actividade e, conseqüentemente, se torna a enzima limitante da via que degrada o ácido 4-hidroxicanoico, permite a acumulação de  $\gamma$ -decalactona. Isto ocorre quando se utiliza ar no biorreactor Biolab, com uma agitação e arejamento de 600 rpm e 0.9 vvm, respectivamente, e no biorreactor Parr, quando se aplicam pressões de 0.1 MPa e 0.5 MPa na fase de crescimento e de 0.1 MPa na biotransformação. Quando a enzima limitante da via é a 3-hidroxi-acetil-CoA desidrogenase, ocorre acumulação de 3-hidroxi- $\gamma$ -decalactona. Isto ocorre quando se aplicam as restantes condições de operação testadas.

De entre as várias condições estudadas, concluiu-se que a maior produção de  $\gamma$ -decalactona ( $328 \text{ mg.L}^{-1}$ ) foi obtida no biorreactor Parr, aplicando pressões de 0.1 MPa durante as fases de crescimento e biotransformação, com uma agitação e arejamento de 400 rpm e 0.9 vvm, respectivamente.

Para completar melhor este trabalho, seria benéfico tentar encontrar condições que diminuíssem a degradação da  $\gamma$ -decalactona ou que inibissem a actividade da acetil-CoA oxidase nos ácidos de cadeia curta ( $C_{10}$ ). Para tal, é necessário compreender melhor as actividades das enzimas intervenientes na  $\beta$ -oxidação. Com essa finalidade seria útil tentar trabalhar com mutantes desta estirpe (Waché, 2001), que possuem a actividade da acetil-CoA oxidase alterada. Embora estes mutantes já tenham sido utilizados no estudo da produção de  $\gamma$ -decalactona, não se verificaram melhorias na produção deste composto, possivelmente por falta de optimização das condições de operação.

Para finalizar, seria bastante interessante estudar o processo de *scale-up* do sistema, pois verificaram-se grandes diferenças na produção de  $\gamma$ -decalactona cada vez que se alterava de biorreactor e, conseqüentemente, de volume de operação. Seria útil medir eventuais perdas do aroma por evaporação, analisando o gás de saída por espectrometria de massa. Esta técnica permitiria também uma determinação alternativa do  $K_{La}$ .

## 6 Bibliografia

---

Neste capítulo enumeram-se as referências bibliográficas que contribuíram para a realização deste trabalho.

---

- Aguedo, M.** (2002) Biotransformation de lipides en arômes par *Yarrowia lipolytica*: interactions avec le substrat, excrétion et toxicité des métabolites produits. Tese de doutoramento, Université de Bourgogne, Dijon, France.
- Aguedo, M.; Waché, Y.; Coste, F.; Husson, F.; Belin, J.-M.** (2004) Impact of surfactants on the biotransformation of methyl ricinoleato into  $\gamma$ -decalactone by *Yarrowia lipolytica*. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 29:31-36.
- Aguedo, M.; Waché, Y.; Mazoyer, V.; Sequeira-Le Grand, A.; Belin, J.-M.** (2003) Increased electron donor and electron acceptor characters enhance the adhesion between oil droplets and cells of *Yarrowia lipolytica* as evaluated by a new cytometric assay. *J. Agric. Food Chem.* 51:3007-3011.
- Amaral, P. F. F.** (2003) Emprego de carreador de oxigénio na produção de lipase por *Yarrowia lipolytica*. Tese de mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.
- Ambid, C.; Carle, S.; De Billerbeck, G.** (1999) Method for producing and extracting aromatic compounds. Patent WO 9954432 (referido em Aguedo, 2002).
- Andrews, G. F.; Fonta, J. P.; Marrotta, E.; Stroeve, P.** (1980a) The effect of cells on oxygen transfer coefficients I: Cell accumulation around bubbles. *Chem. Eng. J.* 29:B39-B46 (referido em Ju e Sundararajan, 1995).
- Andrews, G. F.; Fonta, J. P.; Marrotta, E.; Stroeve, P.** (1980b) The effect of cells on oxygen transfer coefficients II: Analysis of enhancement mechanisms. *Chem. Eng. J.* 29:B47-B55 (referido em Ju e Sundararajan, 1995).
- Arctander, S.** (1969) Perfume and flavour chemicals. (Aroma Chemicals) II. Published by the Author, Montclair, N. J.
- Badino, A. C.; Facciotti, M. C. R.; Schmidell, W.** (2000) Improving  $K_{La}$  determination in fungal fermentation, taking into account electrode response time. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 75:469-474.
- Bailey, J. E.; Ollis, D. F.** (1986) Biochemical engineering fundamentals. McGrawHill, New York.
- Bakhuis, E.; Bos, P.** (1969) Correlation between growth of *Candida lipolytica* and size of droplets in the hydrocarbon containing medium. *Antonie van Leeuwenhoek* 35:F47-F48.
- Baldwin, S.A.; Cheng, T.C.; Demopoulos, G.P.** (2000) A contribution to the measurement of oxygen mass transfer in a laboratory pressure reactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 75:665-672.
- Barth, G.; Gaillardin, C.** (1997) Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol. Rev.* 19:219-237.
- Bartholomew, W. H.; Karow, E. O.; Sfat, M. R.; Wilhelm, R. H.** (1950) Oxygen transfer and agitation in submerged fermentations: Mass transfer of oxygen in submerged fermentation of *Streptomyces griseus*. *Ind. Eng. Chem.* 42:1801-1809 (referido em Ju e Sundararajan, 1995).
- Bartlett, D. H.** (1992) Microbial life at high pressures. *Sci. Prog.* 76:479-496.

- Beckerich, J. M.; Boisramé-Baudevin, A.; Gaillardin, C.** (1998) *Yarrowia lipolytica*: a model organism for protein secretion studies. *Internatl. Microbiol.* 1: 123-130.
- Behring, J. L.; Lucas, M.; Machado, C.; Barcellos, I. O.** (2004) Adaptação no método do peso da gota para determinação da tensão superficial: um método simplificado para a quantificação da CMC de surfactantes no ensino da química. *Quim. Nova* 27(3):492-495.
- Bellon-Fontaine, M. N.; Rault, J.; Van Oss, C. J.** (1996) Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electro-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cell. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 7:47-53.
- Belo, I.** (1999) Estudo do efeito da pressão no comportamento fisiológico de microrganismos. Tese de doutoramento, Universidade do Minho, Braga.
- Belo, I.; Pinheiro, R.; Mota, M.** (1996) Pressurized biorreactors: Fundamentals and application. *In: Comunicaciones del III Congreso Ibérico de Biotecnología – BIOTEC'96* (F., Fernández-Polanco; G. G., Benito; P. A. G., Encina; M. M. P., Miranda; Eds), Universidad de Valladolid, Valladolid, 35-37.
- Belo, I.; Pinheiro, R.; Mota, M.** (2003) Fed-batch cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* in a hyperbaric bioreactor. *Biotechnol. Prog.* 19(2):665-671.
- Belo, I.; Pinheiro, R.; Mota, M.** (2005) Morphological and physiological changes in *Saccharomyces cerevisiae* by oxidative stress from hyperbaric air. *J. Biotechnol.* 115:397-404.
- Berger, R.G.** (1995). *Aroma Biotechnology*. Springer-Verlag, 52-91, Berlin.
- Berger, R. G.; Neuhaüser, K.; Drawert, F.** (1986) Biosynthesis of flavor compounds by microorganisms. 6. Odorous constituents of *Polyporus durus* (Basidiomycetes) *Z. Naturforsch.* 41:963-970.
- Blin-Perrin, C.; Molle, D.; Dufosse, L.; Le-Quere, J.-L. ; Viel, C. ; Mauvais, G. ; Feron, G.** (2000) Metabolism of ricinoleic acid into  $\gamma$ -decalactone:  $\beta$ -oxidation and long chain acyl intermediates of ricinoleic acid in the genus *Sporidiobolus* sp. *FEMS Microbiol. Lett.* 188:69-74.
- Bonara, A.; Mares, D.** (1982) A simple colorimetric method for detecting cell viability in cultures of eukaryotic microorganisms. *Curr. Microbiol.* 7:217-222.
- Boog, A. L. G. M.; Van Grinsven, A. M.; Peters, A. L. J.; Roos, R.; Wieg, A. J.** (1990) Manufacture of gamma-lactones with food-compatible yeasts. European Patent 371568 (referido em Aguedo, 2002).
- Caldwell, J.** (1965) Effects of high pressures of oxygen on fungi and bacteria. *Nature* 17:321-323.
- Cardillo, R.; Fuganti, C.; Barbeni, M.; Capella, P.; Guarda, P. A.; Giana, A.** (1991) Process for the microbiological production of gamma- and delta-lactones. European Patent 0412880 (referido em Aguedo, 2002).



- Cardillo, R.; Fuganti, C.; Sacerdote, G.; Barbeni, M.; Capella, P.; Squarcia, F.** (1990) Process for the microbiological production of gamma-(R)-decanolide and gamma-(R)-octanolide lactones. European Patent 0356291 (referido em Aguedo, 2002).
- Cents, A. H. G.; Brilman, D. W. F.; Versteeg, G. F.** (2001) Gas absorption in an agitated gas-liquid-liquid system. *Chem. Eng. Sci.* 56:1075-1083.
- Cheetham, P. S. J.; Maume, K. A.; De Rooij, J. F. M.** (1993) Method of producing gamma-hydroxydecanoic acid or its lactone by feeding a ricinoleic acid source to *Sp. odorus* or *Rh. glutinis*. US Patent 5219742 (referido em Aguedo, 2002).
- Cheetham, P. S. J.; Maume, K. A.; De Rooij, J. F. M.** (1988) Production of lactones. European Patent 0258993 (referido em Aguedo, 2002).
- Chern, J.-M.; Chou, S.-R.; Shang, C.-S.** (2001) Effects of impurities on oxygen transfer rates in diffused aeration systems. *Wat. Res.* 35(13):3041-3048.
- Clark, D. S.; Lentz, C. P.** (1961) Submerged citric acid fermentation of sugar beet molasses: effect of pressure and recirculation of oxygen. *Can. J. Microbiol.* 7:447-453.
- Cooper, C. M.; Fernstrom, G. A.; Miller, S. A.** (1944) Performance of agitated gas-liquid contacters. *Ind. Eng. Chem.* 36:504-509.
- Costa, V.; Moradas-Ferreira, P.** (2001) Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae* insights into ageing, apoptosis and diseases. *Mol. Aspects Med.* 22:217-246.
- Costa, V.; Moradas-Ferreira, P.** (2003) Mecanismos de adaptação de *Saccharomyces cerevisiae* a condições de stress. *In: Biotecnologia*. Lima, N.; Mota, M. (eds.), Lidel, Portugal, 67-80.
- Croughan, M. S.; Hamel, J.-F.; Wang, D. I. C.** (1987) Hydrodynamic effects on animal cells grown in microcarrier cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 29:130-141.
- Croughan, M. S.; Sayre, E.S.; Wang, D. I. C.** (1989) Viscous reduction of turbulent damage in animal cell culture. *Biotechnol. Bioeng.* 33:862-872.
- Cruz, J. M.; Dominguez, J. M.; Dominguez, H.** (2000). Dimorphic behavior of *Debaryomyces hansenii* grown on barley bran acid hydrolyzates. *Biotechnol. Lett.* 22(7): 605-610.
- Das, T. R.; Bandopadhyay, A.; Parthasarathy, R.; Kumar, R.** (1985) Gas-liquid interfacial area in stirred vessels: the effect of an immiscible liquid phase. *Chem. Eng. Sci.* 40(2):209-214.
- Deziel, E.; Comeau, Y.; Villemur, R.** (1999) Two-liquid-phase bioreactors for enhanced degradation of hydrophobic/toxic compounds. *Biodegradation* 10(3): 219-33.
- Dufossé, L.; Feron, G.; Mauvais, G.; Bonnarme, P.; Durand, A.; Spinnler, H.-E.** (1998) Production of  $\gamma$ -decalactone and 4-hidroxy-decanoic acid in the genus *Sporodiobolus*. *J. Ferment. Bioeng.* 86(2): 169-173.
- Dufossé, L.; Latrassé, A.; Spinnler, H. E.** (1994) Importance des lactones dans les arômes alimentaires: structure, distribution, propriétés sensorielles. *Sci. Aliments* 9:427-454.

- Dumont, E.; Delmas, H.** (2003) Mass transfer enhancement of gas absorption in oil-in-water systems: a review. *Chem. Eng. Process.* 42:419-438.
- Endrizzi-Joran, A.** (1994). Tese de doutoramento, Université de Bourgogne, Dijon, France (referido em Waché *et al.*, 2001).
- Ercoli, B.; Fuganti, C.; Grasselli, P.; Servi, S.; Allegrone, G.; Barbeni, M.; Pisciotta, A.** (1992) Stereochemistry of the biogenesis of C-10 and C-12 gamma lactones in *Yarrowia lipolytica* and *Pichia ohmeri*. *Biotechnol. Lett.* 14(8):665-668.
- Farbood, M. I.; Morris, J. A.; Sprecker, M. A.; Bienkowski, L. J.; Miller, K. P.; Vock, M. H.; Hagedorn, M. L.** (1990) Process for preparing compositions containing unsaturated lactones and organoleptic uses of the lactones. European Patent 354000 (referido em Aguedo, 2002).
- Farbood, M. I.; Willis, B. J.** (1983) Production of gamma-decalactone. Patent WO 8301072 (referido em Aguedo, 2002).
- Farr, S.; Kogoma, T.** (1991) Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol. Rev.* 55(4):561-585.
- Feron, G.; Dufossé, L.; Mauvais, G.; Bonnarme, P.; Spinnler, H.-E.** (1997) Fatty acid accumulation in the yeast *Sporidiobolus salmonicolor* during batch production of  $\gamma$ -decalactone. *FEMS Microbiol. Lett.* 149:17-24.
- Gancedo, J. M.** (2001) Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 25(1):107-123.
- Gatfield, I. L.** (1995) Gamma-decalactone preparation with high stereospecificity. Patent DE 4401388 (referido em Aguedo, 2002).
- Gatfield, I. L.; Güntert, M.; Sommer, H.; Werkhoff, P.** (1993) Some aspects of the microbiological production of flavour-active lactones with particular reference to  $\gamma$ -decalactone. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 15:165-170.
- Gille, G.; Sigler, K.** (1995) Oxidative stress and living cells. *Folia Microbiol.* 40(2):131-152.
- Ghosh, T. K.; Bhattacharyya, B. C.** (1993) Effect of inlet oxygen concentration on continuous cultivation of baker's yeast in a converging-diverging tube airlift fermentor. *J. Ferment. Bioeng.* 76:153-156.
- Groguenin, A.; Waché, Y.; Garcia, E. E.; Aguedo, M.; Husson, F.; LeDall, M. T.; Nicaud, J.-M., Belin, J.-M.** (2004) Genetic Engineering of the  $\beta$ -oxidation pathway in the yeast *Yarrowia lipolytica* to increase the production of aroma compounds. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 28:75-79.
- Hädrich-Meyer, S.; Berger, R. G.** (1994) Localization of lipolytic and esterolytic activities of *Tyromyces sambuceus*, a 4-decanolide-producing basidiomycete. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41:210-214.
- Haffner, T.; Tressl, R.** (1996) Biosynthesis of (R)-gamma-decanolactone in the yeast *Sporobolomyces odorus*. *J. Agric. Food Chem.* 44:1218-1223.

- Hartmeier, W.; Bronn, W. K.; Dellweg, H.** (1971) Chem. Ing. Tech. 43, 76 (referido em Onken e Liefke, 1989).
- Hassan, I. T. M.; Robinson, C. W.** (1977) Oxygen transfer in mechanically agitated systems containing dispersed hydrocarbon. Biotechnol. Bioeng. 19:661-682.
- Henzler, H.-J.; Kauling, D. J.** (1993) Oxygenation of cell cultures. Bioproc. Eng. 9:61-75.
- Hurtado, C.A.R.; Beckerich, J.M.; Gaillardin, C.; Rachubinski, R. A.** (2000). A Rac homolog is required for induction of hyphal growth in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. J. Bacteriol. 182(9): 2376-2386.
- Iacazio, G.; Martini, D.; Faure, B.; N'Guyen, M. H.** (2002). Isolation and characterization of 8-hydroxy-3Z,5Z-tetradecadienoic acid, a putative intermediate in *Pichia guilliermondii*  $\gamma$ -decalactone biosynthesis from ricinoleic acid. Microbiol. Lett. 209:57-62.
- Jamieson, D. J.** (1998) Oxidative stress of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 14:1511-1527.
- Johnson, F. H.; Eyring, J.; Polissar, M. J.** (1954) The kinetic bases of molecular biology. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Ju, L.-K.; Lee, J. F.; Armiger, W. B.** (1991) Enhancing oxygen transfer in bioreactors by perfluorocarbon emulsions. Biotechnol. Prog. 7:323-329.
- Ju, L.-K.; Sundararajan, A.** (1995) The effect of cells on oxygen transfer in bioreactors. Bioproc. Eng. 13:271-278.
- Junker, B. H.; Hatton, T. A.; Wang, D. I. C.** (1990a) Oxygen transfer enhancement in aqueous/perfluorocarbon fermentation systems: I. Experimental observations. Biotechnol. Bioeng. 35:578-585.
- Junker, B. H.; Wang, D. I. C.; Hatton, T. A.** (1990b) Oxygen transfer enhancement in aqueous/perfluorocarbon fermentation systems: II. Theoretical analysis. Biotechnol. Bioeng. 35:586-597.
- Kamzolova, S. V.; Shishkanova, N. V.; Morgunov, I. G.; Finogenova, T. V.** (2003). Oxygen requirements for growth and citric acid production of *Yarrowia lipolytica*. FEMS Yeast Res. 3:217-222.
- Kawase, Y.; Ulbrecht, J. J.** (1982) The effect of surfactant on terminal velocity of and mass transfer from a fluid sphere in a non-newtonian fluid. Can. J. Chem. Eng. 60: 87-93 (referido em Chern *et al.*, 2001).
- Kawase, F. M.** (2001) Interação lipase-glicogênio e dimorfismo celular sob condições de estresse térmico e oxidativo em *Yarrowia lipolytica*. Tese de mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.
- Kawase, F. M.; Amaral P. F.; Rocha-Leão, M. H. M.; Amaral, A. L.; Ferreira, E. C.; Coelho, M. A. Z.** (2003). Morphological analysis of *Yarrowia lipolytica* under stress conditions through image processing. Bioproc. Biosyst. Eng. 25:371-375.

- Kim, T.-H.; Oh, Y.-S.; Kim, S.-J.** (2000) The possible involvement of the cell surface in aliphatic hydrocarbon utilization by an oil-degrading yeast, *Yarrowia lipolytica* 180. *J. Microbiol. Biotechnol.* 10(3):333-337.
- Knoll, A.; Maier, B.; Tscherrig, H.; Büchs, J.** (2005) The oxygen mass transfer, carbon dioxide inhibition, heat removal, and the energy and cost efficiencies of high pressure fermentation. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 92:77-99.
- Koide, K.; Hayashi, T.; Sumino, K.; Iwamoto, S.** (1976) Mass transfer from single bubbles in aqueous solutions of surfactants. *Chem. Eng. Sci.* 31:963-967.
- Kümin B.; Münch, T.** (1997) Process for the preparation of a lactone. Patent EP 0795607 (referido em Aguedo, 2002).
- Kümin B.; Münch, T.** (1998) Microbiological process for producing  $\gamma$ -decalactone. US Patent 5849551 (referido em Aguedo, 2002).
- Kuttuva, S. G.; Restrepo, A. S.; Ju, L.-K.** (2004). Evaluation of different organic phases for water-in-oil xanthan fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64:340-345.
- Labows, J.N.; Preti, G.; Hoelzie, E.; Leyben, J.; Kligman A.** (1979) Steroid analysis of human apocrine secretion. *Steroids* 34:249-58.
- Lange, H.; Bavouzet, J. M.; Taillandier, P.; Delorme, C.** (1993) Systematic error and comparison of four methods assessing the viability of *Saccharomyces cerevisiae* suspensions. *Biotechnol. Tech.* 7:223-228.
- Lanza, E.; Ko, K. H.; Palmer, J. K.** (1976) Aroma production by cultures of *Ceratocystis moniliformis*. *J. Agric. Food Chem.* 24:1247.
- Latrasse, A.; Guichard, E.; Piffaut, C.; Fournier, N.; Dufossé, L.** (1993) Chirality of the  $\gamma$ -lactones formed by *Fusarium poae* INRA 45. *Chirality* 5:379:384.
- Leckal, A.** (1998) Étude du transfert de matière gaz-liquide dans les systèmes gaz-liquide-liquide: application à l'hydroformylation de l'octène-1 par catalyse biphasique. Thesis, INP, Toulouse, France (referido em Dumont e Delmas, 2003).
- Leckal, A.; Chaudhari, R. V.; Wilhelm, A. M.; Delmas, H.** (1997) Gas-liquid mass transfer in gas-liquid-liquid dispersions. *Chem. Eng. Sci.* 52(21-22):4069-4077.
- Lee, F.; Hassan, H.** (1987) Biosynthesis of superoxide dismutase and catalase in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26:531-540.
- Lee, J.-S.; Hah, Y.-C.; Roe, J.-H.** (1993) The introduction of oxidative enzymes in *Streptomyces coelicolor* upon hydrogen peroxides treatment. *J. Gen. Microbiol.* 139:1015-1018.
- Lee, S. L.; Cheng, H. Y.; Chen, W. C.; Chou, C. C.** (1998) Production of  $\gamma$ -decalactone from ricinoleic acid by immobilized cells of *Sporidiobolus salmonicolor*. *Proc. Biochem.* 33(4):453-459.

- Lee, S. L.; Cheng, H. Y.; Chen, W. C.; Chou, C. C. (1999) Effect of physical factors on the production of  $\gamma$ -decalactone by immobilized cells of *Sporidiobolus salmonicolor*. Proc. Biochem. 33:845-850.
- Lee, S.-L.; Chou, C.-C. (1994) Growth and production of gamma-decalactone and *cis*-6-dodecen-4-olide by *Sporobolomyces odorus* in the presence of fatty acids and oils. J. Ferment. Bioeng. 78:114-116.
- Lee, S.-L.; Lin, S.-J.; Chou, C.-C. (1995) Growth and production of  $\gamma$ -decalactone by *Sporobolomyces odorus* in jar fermentors as affected by pH, aeration and fed-batch technique. J. Ferment. Bioeng. 80(2):195-199.
- Lin, S.-J.; Lee, S.-L.; Chou, C.-C. (1996) Effects of various fatty acid components of castor oil on the growth and production of  $\gamma$ -decalactone by *Sporobolomyces odorus*. J. Ferment. Bioeng. 82(1):42-45.
- Linek, V. (1987) A critical review and experimental verification of the correct use of the dynamic method for the determination of oxygen transfer in aerated agitated vessels to water, electrolyte solutions and viscous liquids. Chem. Eng. J. 34:11-34.
- Linek, V.; Benes, P. (1976) A study of the mechanism of gas absorption into oil-water emulsions. Chem. Eng. Sci. 31(11):1037-1046.
- Luo, Y.-S.; Nicaud, J.-M.; Van Veldhoven, P. P.; Chardot, T. (2002) The acyl-CoA oxidases from the yeast *Yarrowia lipolytica*: characterization of Aox2p. Arch. Biochem. Biophys. 407:32-38.
- Luo, Y.-S.; Wang, H. J.; Gopalan, K. V.; Srivastava, D. K. Nicaud, J.-M.; Chardot, T. (2000) Purification and characterization of the recombinant form of acyl CoA oxidase 3 from the yeast *Yarrowia lipolytica*. Arch. Biochem. Biophys. 384(1):1-8.
- MacMillan, J. D.; Wang, D. I. C. (1990) Mechanisms of oxygen transfer enhancement during submerged cultivation in perfluorochemical-in-water dispersions. Ann. NY Acad. Sci. 589:283-300.
- Maga, J. A. (1996) Lactones in foods. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 8:1-56.
- Märkl, H.; Bronnenmeier, R.; Wittek, B. (1991) The resistance of microorganisms to hydrodynamic stress. Int. Chem. Eng. 31:185-197.
- Matsumura, M.; Sakuma, H.; Yamagata, T.; Kobayashi, J. (1980) Effect of high oxygen concentration on the growth on ethanol of assimilating yeast *Candida* spp. J. Ferment. Technol. 58:552-559.
- Matsumura, M.; Unemoto, K.; Shinabe, K.; Kobayashi, J. (1982) Application of pure oxygen in a new gas entraining fermentor. J. Ferment. Technol. 60(6):565-578.
- Mehta, V. D.; Sharma, M. M. (1971) Mass transfer in mechanically agitated gas-liquid contactors. Chem. Eng. Sci. 26:461-479.

- Meyer, J.** (1993) Gamma-decalactone microbial production from alkyl ricinoleate – by hydrolysis, beta-oxidation, and chemical cyclisation of 4-hydroxy decanoic acid produced for flavouring and perfume. Patent DE 4126997 (referido em Aguedo, 2002).
- Miquel, J.; Quintanilha, A.; Weber, H.** (1989) Radicals and antioxidants in biomedicine. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- Moo-Young, M.; Blanch, H. W.** (1981) Design of biochemical reactors. Mass transfer criteria for simple and complex systems. *Adv. Biochem. Eng.* 19:1-69.
- Moradas-Ferreira, P.; Costa, V.; Piper, P.; Mager, W.** (1996) The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. *Molec. Microbiol.* 19(4):651-658.
- Murad, S.; Gupta, S.** (2000) A simple molecular dynamics simulation for calculating Henry's constant and solubility of gases in liquids. *Chem. Phys. Lett.* 319:60-64.
- Nagy, I.** (1989) Functional consequences of free radical damage to cell membranes. *In: Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine*, vol. I, CRC Press, Inc., USA, Florida.
- Nascimento, A. E.; Shariá, A. E. N.; Lima, M. A. B.; Campos-Takaki, G. M.** (2000) A cytochemical study of acid carbohydrates on the surface of *Candida lipolytica* grown in Tween 80-containing medium. *Braz. J. Microbiol.* 31:30-36.
- Neidhardt, F. C.; Ingraham, J. L.; Schaechter, M.** (1990) Physiology of the bacterial cell: a molecular approach. Sinauer Associates, Inc., New York.
- Neto, R. S.; Pastore, G. M.; Macedo, G. A.** (2004) Biocatalysis and biotransformation producing  $\gamma$ -decalactone. *J. Food Sci. C* 69(9):677-680.
- Nielsen, D. R.; Daugulis, A. J.; McLellan, P. J.** (2003) A novel method of simulating oxygen mass transfer in two-phase portioning bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 83(6):735-742.
- Nielsen, J.; Villadsen, J.** (1994) Bioreaction engineering principles. Plenum Press, New York.
- Nicaud, J.-M.; Belin, J.-M.; Pagot, Y.; Endrizzi-Joran, A.** (1996) Bioconversion of substrate with microbe auxotrophic for compound in medium deficient in this compound. FR2734843 (referido em Aguedo, 2002).
- Nicaud, J.-M.; Clainche, A.; LeDall, M. T.; Wang, H.; Gaillardin, C.** (1998) *Yarrowia lipolytica*, a yeast model for the genetic studies of hydroxy fatty acids biotransformation into lactones. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 5:175-181.
- Nicaud, J.-M.; Fabre, E.; Beckerich, J.-M.; Fournier, P., Gaillardin, C.** (1989) Cloning, sequencing and amplification of the alkaline extracellular protease (XPR2) gene of the yeast *Y. lipolytica*. *J. Biotechnol.* 12:285-298.
- Nietschke, M.; Pastore, G. M.** (2002) Biossurfactantes: propriedades e aplicações. *Quim. Nova* 25(5):772-776.
- Nozaki, M.** (1994) Production of gamma-decalactone and new microorganism to be used therefore. Patent JP 6133789 (referido em Aguedo, 2002).

- Okamoto, K.; Chimori, M.; Iwanaga, F.; Hattori, T.; Yanase, H.** (2002) Production of  $\gamma$ -lactones by the brown-rot basidiomycete *Piptoporus soloniensis*. *J. Biosci. Bioeng.* 94(2):182-185.
- Okui, S.; Uchiyama, M.; Mizugaki, M.** (1963) Metabolism of hydroxy fatty acids: II. Intermediates of the oxidative breakdown of ricinoleic acid by genus *Candida*. *J. Biochem.* 54:536-540.
- Onken, U.** (1990) Batch and continuous cultivation of *Pseudomonas fluorescens* at increased pressure. *Biotechnol. Bioeng.* 35:983-989.
- Onken, U.; Jostmann, T.** (1984) Influence of pressure on growth of *Pseudomonas fluorescens*. *Biotechnol. Lett.* 6:413-418.
- Onken, U.; Liefke, E.** (1989) Effect of total and partial pressure (oxygen and carbon dioxide) on aerobic microbial processes. *In: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Vol. 40: Bioprocesses and Engineering*, A. Fiechter (Ed.), Springer-Verlag, Berlin, 137-169.
- Páca, J.; Gregr, V.** (1979) Effect of  $P_{O_2}$  on growth and physiological characteristics of *Candida utilis* in multistage tower fermentor. *Biotechnol. Bioeng.* 21:1827-1843.
- Page, G. V.; Eilerman, R. G.** (1989) Process for the preparation of gamma and delta lactones. Patent WO 8912104 (referido em Aguedo, 2002).
- Pagot, Y.** (1997) Étude des mécanismes cellulaires et moléculaires de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale chez les levures. Effets sur la biotransformation du ricinoléate de méthyle en  $\gamma$ -déalactone. Tese de doutoramento, Université de Bourgogne, Dijon, France (referido em Aguedo, 2002).
- Peeva, L.; Yona, S. B.-Z.; Merchuk, J. C.** (2001). Mass transfer coefficients of decane to emulsions in a bubble column reactor. *Chem. Eng. Sci.* 56:5201-5206.
- Pelletier, C.; Bouley, C.; Cayuela, C.; Bouttier, S.; Bourlioux, P.; Bellon-Fontaine, M.-N.** (1997) Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(5):1725-1731.
- Pereira-Meirelles, F. V.; Rocha-Leão, M. H.; Sant'Anna, G. L.** (1997) A stable lipase from *Candida lipolytica* – cultivation conditions and crude enzyme characteristics. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 63-65:73-85.
- Pinheiro, R.** (2004) Estudo do efeito da pressão na fisiologia de leveduras. Tese de doutoramento, Universidade do Minho, Braga.
- Pinheiro, R.; Belo, I.; Mota, M.** (1997) Physiological behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* under increased air and oxygen pressures. *Biotechnol. Lett.* 19:703-708.
- Pinheiro, R.; Belo, I.; Mota, M.** (1999) Air pressure effects on biomass yield of two different *Kluyveromyces* strains. *Enz. Microbiol. Technol.*
- Pinheiro, R.; Belo, I.; Mota, M.** (2002) Oxidative stress response of *Kluyveromyces marxianus* to hydrogen peroxide, paraquat and pressure. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58:842-847.
- Postgate, J. R.** (1967) *Adv. Microbiol. Physiol.* 1:1-23. (referido em Lange *et al.*, 1995)

- Rabenhorst, J.; Gatfield, I. L.** (2000) Process for the production of gamma-decalactone. European Patent 0997533 (referido em Aguedo, 2002).
- Rabenhorst, J.; Gatfield, I. L.** (2001) Method of producing  $\gamma$ -decalactone. Patent WO 0024920 (referido em Aguedo, 2002).
- Richard, H.; Multon, J. L.** (1992). Les arômes alimentaires. Collection sciences et techniques agro-alimentaires. Tec & Doc – Lavoisier, Paris.
- Rols, J. L.; Condoret, J. S.; Fonade, C.; Goma, G.** (1990) Mechanism of enhanced oxygen transfer in fermentation using emulsified oxygen-vectors. *Biotechnol. Bioeng.* 35:427-435.
- Ruchti, G.; Dunn, I. J.; Bourne, J. R.** (1981) Comparison of dynamic oxygen electrode methods for the measurement of  $K_L a$ . *Biotechnol. Bioeng.* 23:277-290.
- Santoro, N.; Thiele, D. J.** (1997) Oxidative stress responses in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *In: Yeast Stress Response*. Hohmann, S.; Mager, W. H. (eds.), Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.
- Sarris, J.; Latrassé, A.** (1985) Production of odoriferous gamma lactones by *Fusarium poae*. *Agric. Biol. Chem.* 49:3227-3230.
- Sato, S.; Mukataka, S.; Kataoka, H.; Takahashi, J.** (1984). *J. Ferment. Technol.* 62:71-76 (referido em Onken e Liefke, 1989).
- Schrader, J.; Etschmann, M. M. W.; Sell, D.; Hilmer, J.-M.; Rabenhorst, J.** (2004) Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavour compounds – current industrial processes and future prospects. *Biotechnol. Lett.* 26:463-472.
- Sharma, M. M.; Mashelkar, R. A.** (1968) Absorption with reaction in bubble columns. I. *Chem. E. Symp. Series* 28:10-21.
- Sheppard, J. D.; Cooper, D. G.** (1990) The effects of a biosurfactant on oxygen transfer in a cyclone column reactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 48(3):325-336.
- Singh, V.** (1996) On-line measurement of oxygen uptake in cell culture using the dynamic method. *Biotechnol. Bioeng.* 52:443-448.
- Spinnler, H. E.; Dufossé, L.; Souchon, I.; Latrassé, A.; Piffaut-Juffard, C.; Volley, A.; Delest, P.** (1994) Production of gamma-decalactone by bioconversion. Patent FR 2705971 (referido em Aguedo, 2002).
- Spinnler, H. E.; Giniès, C.; Khan, J. A.; Vulfson, E. N.** (1996) Analysis of metabolic pathways by the growth of cells in the presence of organic solvents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:3373-3376 (referido em Aguedo, 2002).
- Stanbury, P. F.; Whitaker, A.** (1984) Principles of fermentation technology. Pergamon Press, Oxford, England.
- Szabo, R.** (2001) Cla4 protein kinase is essential for filament formation and invasive growth of *Yarrowia lipolytica*. *Molec. Genet. Genom.* 265:172-179.



- Szabo, R.; Stofanikova, V.** (2002) Presence of organic sources of nitrogen is critical for filament formation and pH-dependent morphogenesis in *Yarrowia lipolytica*. FEMS Microbiol. Lett. 206:45-50.
- Taguchi, H.; Humphrey, A.** (1966) Dynamic method of the volumetric oxygen transfer coefficient in the fermentation systems. J. Ferm. Technol. 44:881-889.
- Tahara, S.; Fujiwara, K.; Mizutani, J.** (1973) Neutral constituents of volatiles in cultured medium of *Sporobolomyces odorus*. Agr. Biol. Chem. 37:2855-2861.
- Toma, M. K.; Ruklisha, M. P.; Vanags, J. J.; Zeltina, M.O.; Leite, M. P.; Galinina, N. I.; Viesturs, U. E.; Tengerdy, R. P.** (1991) Inhibition of microbial growth and metabolism by excess turbulence. Biotechnol. Bioeng. 38:552-556.
- Tribe, A.; Briens, C. L.; Margaritis, A.** (1995) Determination of the volumetric mass transfer coefficient ( $K_L a$ ) using the dynamic "gas out-gas in" method: analysis of errors caused by dissolved oxygen probes. Biotechnol. Bioeng. 46:388-392.
- Tsugawa, R.; Nakase, T.; Koyabashi, T.; Yamashita, K.; Okumura, S.** (1969). Fermentation of *n*-paraffins by yeast. Part III.  $\alpha$ -Ketoglutarate productivity of various yeasts. Agr. Biol. Chem. 33:929-938.
- Vandamme, E. J.; Soetaert, W.** (2002) Bioflavours and fragrances via fermentation and biocatalysis. J. Chem. Technol. Biotechnol. 77:1323-1332.
- Van der Meer, A. B.; Beenackers, A. A. C. M.; Burghard, R.; Mulder, N. H.; Fok, J. J.** (1992) Gas/liquid mass transfer in a four-phase stirred fermentor: effects of organic phase hold-up and surfactant concentration. Chem. Eng. Sci. 47(9-11):2369-2374.
- Van der Mei, H. C.; van de Belt-Gritter, B.; Busscher, H. J.** (1995) Implications of microbial adhesion to hydrocarbons for evaluating cell surface hydrophobicity 2. Adhesion mechanisms. Colloids Surfaces B: Biointerfaces 5:117-126.
- Van Ede, C. J.; Van Houten, R.; Beenackers, A. A. C. M.** (1995) Enhancement of gas to water mass transfer rates by a dispersed organic phase. Chem. Eng. Sci. 50(18):2911-2922.
- van't Riet, K.; Tramper, J.** (1991) Basic bioreactor design. Marcel Dekker, New York, USA.
- Waché, Y.; Aguedo, M.; Choquet, A.; Gatfield, I.; Nicaud, J.-M., Belin, J.-M.** (2001) Role of  $\beta$ -oxidation enzymes in  $\gamma$ -decalactone production by the yeast *Yarrowia lipolytica*. Appl. Environ. Microbiol. 67(12):5700-5704.
- Waché, Y.; Aguedo, M.; Le Dall, M.-T.; Nicaud, J.-M.; Belin, J.-M.** (2002) Optimization of *Yarrowia lipolytica*'s  $\beta$ -oxidation pathway for  $\gamma$ -decalactone production. J. Mol. Catal. B: Enzymatic 5:347-351.
- Waché, Y.; Aguedo, M.; Nicaud, J.-M., Belin, J.-M.** (2003) Catabolism of hydroxyacids and biotechnological production of lactones by *Yarrowia lipolytica*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 61:393-404.

- Waché, Y.; Bergmark, K.; Courthudon, J.-L.; Aguedo, M.; Nicaud, J.-M.; Belin, J.-M.** (2000a) Medium-size droplets of methyl ricinoleate are reduced by cell-surface activity in the  $\gamma$ -decalactone production by *Yarrowia lipolytica*. *Lett. Appl. Microbiol.* 30:183-187.
- Waché, Y.; Laroche, C.; Bergmark, K.; Moller-Andersen, C.; Aguedo, M.; Le Dall, M.-T.; Wang, H.; Nicaud, J.-M.; Belin, J.-M.** (2000b) Involvement of acyl coenzyme A oxidase isozymes in biotransformation of methyl ricinoleate into  $\gamma$ -decalactone by *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(3):1233-1236.
- Waché, Y.; Pagot, Y.; Nicaud, J.-M.; Belin, J.-M.** (1998) Acyl-CoA oxidase, a key step for lactone production by *Yarrowia lipolytica*. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 5:165-169.
- Wagner, M.; Pöpel, H. J.** (1996) Surface active agents and their influence on oxygen transfer. *Wat. Sci. Technol.* 34(3-4):249-256.
- Wang, H.; Le Dall, M.-T.; Waché, Y.; Laroche, C.; Belin, J.-M.; Gaillardin, C.; Nicaud, J.-M.** (1999) Evaluation of acyl coenzyme A oxidase (Aox) isozyme function in the *n*-alkane-assimilating yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Bacteriol.* 181:5140
- Wayman, M.; Wein, E.** (1969) The effect of air pressure on the growth of *Candida lipolytica* on *n*-hexadecane. *Can J Microbiol.* 15(11):1255-61.
- Wilde, P. J.** (2000) Interfaces: their role in foam and emulsion behaviour. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 5:176-181.
- Wise, W.** (1951) The measurement of the aeration of culture media. *J. Gen. Microbiol.* 5:167-177.
- Wolf, K.** (1996) *Non-Conventional Yeast in Biotechnology. A Handbook.* Springer, Berlin.
- Yang, J. D.; Wang, N. S.** (1992) Oxygen mass transfer enhancement via fermentor headspace pressurization. *Biotechnol. Prog.* 8:244-251.
- Yoshida, F.; Yamane, T.; Miyamoto, Y.** (1970) Oxygen absorption into oil-in-water emulsions. A study on hydrocarbon fermentors. *Ind. Eng. Chem. Des. Develop.* 9(4):570-577.
- Zhang, Y.; Miller, R. M.** (1992) Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas rhamnolipid* surfactant (biosurfactant). *Appl. Environ. Microbiol.* 58(19):3276-3282.
- Zhao, S.; Kuttuva, S. G.; Ju, L.-K.** (1999) Oxygen transfer characteristics of multiple-phase dispersions simulating water-in-oil xanthan fermentations. *Bioproc. Eng.* 20: 313-323.
- Zobell, C. E.; Oppenheimer, C. H.** (1950) Some effects of hydrostatic pressure on the multiplication and morphology of marine bacteria. *J. Bacteriol.* 60:771-781.

## **Anexos**

---

Nas próximas páginas serão apresentadas as rectas de calibração e exemplos de cálculos utilizados, assim como os resultados da análise de variância, efectuados ao longo deste trabalho.

---

## A.1 Curvas de Calibração

### A.1.1 Curva de calibração da biomassa

Tal como foi referido no sub-capítulo 3.4.1.1, a quantificação da biomassa, em  $\text{g.L}^{-1}$ , foi efectuada através da curva de calibração obtida para o microrganismo em estudo.

Na Tabela A.1.1 apresenta-se a expressão representativa da recta de calibração para a concentração celular.

**Tabela A.1.1 - Expressão da recta de calibração da biomassa.**

Microrganismo	Gama de validade ( $\text{g.L}^{-1}$ )	Equação	
		$A_{600\text{ nm}} = (m \pm S_m) \times C + (b \pm S_b)$	
		$(m \pm S_m)$	$(b \pm S_b)$
<i>Yarrowia lipolytica</i> W29	0.04 – 0.9	$(0.9813 \pm 0.14)$	$-(0.1277 \pm 0.07)$

Sendo:

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

$m$ , o declive da recta

$S_m$ , o erro padrão associado ao declive

$b$ , a ordenada na origem da recta

$S_b$ , o erro padrão associado à ordenada na origem

$C$ , a concentração celular, em  $\text{g.L}^{-1}$

### A.1.2 Curva de calibração dos açúcares redutores

Conforme referido no sub-capítulo 3.4.2, a quantificação dos açúcares redutores, em  $\text{g.L}^{-1}$ , foi efectuada através da curva de calibração obtida para o açúcar em estudo.

Na Tabela A.1.2 apresenta-se a expressão representativa da recta de calibração para a glucose.

**Tabela A.1.2 - Expressão da recta de calibração dos açúcares redutores.**

Açúcar	Gama de validade ( $\text{g.L}^{-1}$ )	Equação	
		$A_{540\text{ nm}} = (m \pm S_m) \times C + (b \pm S_b)$	
		$(m \pm S_m)$	$(b \pm S_b)$
Glucose	0.05 – 1.0	$(0.3021 \pm 0.007)$	$-(0.0088 \pm 0.004)$

Sendo:

$A_{540\text{ nm}}$ , a absorvância lida a 540 nm

$C$ , a concentração de açúcar, em  $\text{g.L}^{-1}$

### A.1.3 Curva de calibração do GC

Tal como foi referido no sub-capítulo 3.4.3, a quantificação dos compostos analisados, em  $\text{mg.L}^{-1}$ , foi efectuada através da curva de calibração obtida para o composto.

Na Tabela A.1.3 apresenta-se a expressão representativa da recta de calibração para a concentração de  $\gamma$ -decalactona.

**Tabela A.1.3 – Expressão das rectas de calibração do GC, para cada composto analisado.**

Composto	Gama de validade ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	Equação	
		$[I] = (m \pm S_m) \times A + (b \pm S_b)$	
		$(m \pm S_m)$	$(b \pm S_b)$
$\gamma$ -decalactona	50 - 800	$(1.1813 \pm 0.08)$	$(13.829 \pm 27.4)$
$\gamma$ -undecalactona	50 - 800	$(1.1959 \pm 0.02)$	$(14.757 \pm 8.7)$

Sendo:

$[I]$ , a concentração dos compostos, em  $\text{mg.L}^{-1}$

$A$ , a área dos picos detectados pelo GC para os vários compostos

## A.2 Cálculos utilizados ao longo do trabalho

### A.2.1 Cálculo das potências de agitação

O consumo de potência em sistemas agitados de fluidos não arejados ( $P_A$ ) depende da velocidade de agitação ( $N$ ), do diâmetro do agitador ( $D_A$ ), da geometria do agitador e das propriedades do fluido (viscosidade e densidade).

A relação entre estas propriedades é normalmente expressa em termos dos grupos adimensionais, número de potência ( $N_p$ ) e número de Reynolds da agitação ( $Re_A$ ), que são definidos pelas Equações A.2.1 e A.2.2).

$$N_p = \frac{P_A}{\rho \times N_A^3 \times D_a^5} \quad (\text{A.2.1})$$

$$Re_A = \frac{D_a^2 \times N_A \times \rho}{\nu} \quad (\text{A.2.2})$$

Sendo:

$N_p$ , o número de potência

$P_A$ , a potência de agitação, sem arejamento (W)

$\rho$ , a densidade do líquido ( $\text{Kg.m}^{-3}$ )

$N_A$ , a velocidade de agitação (rps)

$D_a$ , o diâmetro do agitador ( $\text{m}^{-1}$ )

$Re_A$ , o número de Reynolds de agitação

$\nu$ , a viscosidade do líquido ( $\text{Kg.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$ )

### Exemplo de cálculo de número de Reynolds para uma agitação de 300 rpm:

Dados:

$$D_a = 0.057 \text{ m}$$

$$N_A = 5 \text{ rps}$$

$$\rho = 1009.6 \text{ Kg.m}^3$$

$$\nu = 8.6 \times 10^{-4} \text{ Kg.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$$

$$Re_A = \frac{0.057^2 \times 5 \times 1009.6}{8.6 \times 10^{-4}} = 1.9 \times 10^4$$

Procedendo aos cálculos para qualquer velocidade de agitação testada, verificou-se que  $Re_A > 10000$ , o que permite concluir que se trata de um regime turbulento em todas as condições, sendo  $N_p$  constante. Assim, a potência de agitação, sem arejamento, pode ser calculada pela Equação A.2.3.

$$(P_a) = K_T \times \rho \times N_A^3 \times D_a^5 \quad (\text{A.2.3})$$

Sendo  $K_T$ , uma constante que depende do tipo de agitador utilizado (Tabela A.2.1).

**Tabela A.2.1 – Valores de  $K_T$ , de acordo com o tipo de agitador utilizado.**

	Tipo de agitador	$K_T$
Hélice	3 lâminas, passo 1:1	0.32
	2 lâminas, passo 2:1	1.00
Turbina	6 lâminas planas	<b>6.30</b>
	6 lâminas curvas	4.80
	coberta com 6 lâminas curvas	1.08
Pás	2 lâminas planas	1.70

A potência consumida num sistema arejado e agitado por um impulsor tipo turbina com 6 lâminas planas, pode ser calculada recorrendo à Equação A.2.4, a partir das variáveis de operação.

$$(P_a)_G = c \times \left( \frac{P_a^2 \times N_A \times D_a^3}{F_g^{0.56}} \right)^{0.45} \quad (\text{A.2.4})$$

Sendo:

$(P_a)_G$ , a potência de agitação com arejamento (W)

$c$ , uma constante, normalmente igual a 0.15

$F_g$ , caudal volumétrico do gás ( $\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ )

Exemplo de cálculo da potência de agitação para velocidades de agitação de 300 rpm e caudais de arejamento de 0.3 vvm:

Dados:

$$K_T = 6.3$$

$$c = 0.15$$

$$N_A = 5 \text{ rps}$$

$$F_g = 0.3 \text{ vvm, que corresponde a } 0.5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1} = 8.3 \times 10^{-6} \text{ m}^3\cdot\text{s}^{-1}$$

Aplicando a Equação A.2.3, para determinar a potência de agitação sem arejamento, vem:

$$P_a = 6.30 \times 1009.6 \times 5^3 \times 0.057^5 \Leftrightarrow P_a = 0.48 \text{ W}$$

Aplicando desta vez a Equação A.2.4, para determinar a potência de agitação com arejamento, vem:

$$(P_a)_G = 0.15 \times \left( \frac{0.48^2 \times 5 \times 0.057^3}{(8.3 \times 10^{-6})^{0.56}} \right)^{0.45} \Leftrightarrow (P_a)_G = 0.064 \text{ W}$$

### A.2.2 Cálculo dos volumes

O meio de biotransformação foi preparado com 1700 mL de fase aquosa aos quais ainda se adicionaram os volumes correspondentes às fracções de RM e de Tween 80. Estes volumes foram calculados recorrendo à Equação A.2.5.

$$\rho = \frac{m}{V} \tag{A.2.5}$$

Sendo:

$m$ , a massa (Kg)

$V$ , o volume ( $\text{m}^3$ )



Exemplo de cálculo dos volumes para um meio com 25 % do volume total de RM e 100 % do volume total de Tween:

Dados:

$$\rho_{RM} = 921 \text{ Kg.m}^{-3}$$

$$\rho_{Tween} = 1070 \text{ Kg.m}^{-3}$$

$$V_{fase\ aquosa} = 1.7 \times 10^{-3} \text{ m}^3$$

100 % de RM corresponde a 0.017 Kg, pelo que, recorrendo à Equação A.2.5, o volume correspondente é:

$$921 = \frac{0.017}{V} \Leftrightarrow V = 1.8 \times 10^{-5} \text{ m}^3 \text{ RM}$$

100 % de Tween corresponde a 0.0017 Kg, pelo que, recorrendo à Equação A.2.5, o volume correspondente é:

$$1070 = \frac{0.0017}{V} \Leftrightarrow V = 1.6 \times 10^{-6} \text{ m}^3 \text{ Tween}$$

Assim, o volume total deste meio de biotransformação é:

$$V_{total} = 1.7 \times 10^{-3} + 0.25 \times 1.8 \times 10^{-5} + 1.6 \times 10^{-6} = 1.71 \times 10^{-3} \text{ m}^3$$

### A.2.3 Cálculo das velocidades superficiais do gás

A velocidade superficial do gás é calculada pela Equação A.2.6.

$$v_s = \frac{F_g}{\text{Área secção recta}} \quad (\text{A.2.6})$$

Em que a área de secção recta é calculado pela Equação A.2.7.

$$\text{Área secção recta} = \pi \times r^2 \quad (\text{A.2.7})$$

Sendo:

$r$ , o raio do biorreactor (m)

Exemplo de cálculo da velocidade superficial para um caudal de ar de 0.3 vvm:

Dados:

$$F_g = 8.3 \times 10^{-6} \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$$

$$r = 5.5 \times 10^{-2} \text{ m}$$

$$\text{Área secção recta} = \pi \times (5.5 \times 10^{-2})^2 \Leftrightarrow \text{Área secção recta} = 9.5 \times 10^{-3} \text{ m}^2$$

$$v_s = \frac{8.3 \times 10^{-6}}{9.5 \times 10^{-3}} \Leftrightarrow v_s = 8.8 \times 10^{-4} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$$

**A.2.4 Cálculo das fracções volúmicas de RM e de Tween**

De acordo com os resultados apresentados no ponto A.2.2, 100 % de RM corresponde a  $1.8 \times 10^{-5} \text{ m}^3$  e 100 % de Tween corresponde a  $1.6 \times 10^{-6} \text{ m}^3$ .

Exemplo de cálculo das fracções volúmicas para um meio com 25 % de RM e 100 % de Tween:

Dados:

$$V_{total} = 1.71 \times 10^{-3} \text{ m}^3$$

Calculando os volumes correspondentes às fracções utilizadas, vem:

$$25 \% \text{ RM} = 0.25 \times 1.8 \times 10^{-5} = 4.5 \times 10^{-6} \text{ m}^3$$

$$100 \% \text{ Tween} = 1.6 \times 10^{-6} \text{ m}^3$$

As fracções de cada componente foram determinadas através da razão do seu volume pelo volume total. Assim, obteve-se:

$$X_{RM} (\%) = \frac{4.5 \times 10^{-6}}{1.71 \times 10^{-3}} \times 100 = 0.27 \%$$

$$X_{Tween} (\%) = \frac{1.6 \times 10^{-6}}{1.71 \times 10^{-3}} \times 100 = 0.093 \%$$

### A.3 Análise de Variância (ANOVA)

Para averiguar se as diferenças obtidas na produção de  $\gamma$ -decalactona em função dos valores de  $K_La$  eram estatisticamente significativas, procedeu-se a uma análise de variância. Os resultados são apresentados na Tabela A.3.1.

**Tabela A.3.1 – ANOVA de factor único para a produção de  $\gamma$ -decalactona em função dos valores de  $K_La$ .**

<b>SUMÁRIO</b>						
<b>Grupos</b>	<b>Contagem</b>	<b>Soma</b>	<b>Média</b>	<b>Variância</b>		
Coluna 1	3	234	78	243		
Coluna 2	3	180	60	144		
Coluna 3	3	219	73	213		
Coluna 4	3	423	141	795		
Coluna 5	3	258	86	296		
Coluna 6	3	330	110	484		
Coluna 7	3	270	90	324		

<b>ANOVA</b>						
<b>Fonte de variação</b>	<b>SQ</b>	<b>gl</b>	<b>MQ</b>	<b>F</b>	<b>valor P</b>	<b>F crítico</b>
Entre grupos	13023	6	2170	6.1	0.003	2.8
Dentro de grupos	4999	14	357			
Total	18022	20				