

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
ESCOLA DE QUÍMICA

Felipe Cappella de Freitas Castro



ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO $K_L A$ INICIAL NA PRODUÇÃO DE
 β -CAROTENO POR *YARROWIA LIPOLYTICA*

RIO DE JANEIRO

2023

Felipe Cappella de Freitas Castro

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO $K_L A$ INICIAL NA PRODUÇÃO DE β -CAROTENO POR
YARROWIA LIPOLYTICA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenheiro de Bioprocessos.

Orientador(es): Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc.
Rodrigo Volcan de Almeida, D.Sc.
Leticia Dobler, D.Sc.

Rio de Janeiro

2023

CIP - Catalogação na Publicação

F247e Freitas Castro, Felipe Cappella de
Estudo da influência do kLa inicial na produção
de β -caroteno por *Yarrowia lipolytica* / Felipe
Cappella de Freitas Castro. -- Rio de Janeiro,
2023.
66 f.

Orientadora: Maria Alice Zarur Coelho.
Coorientador: Rodrigo Volcan de Almeida.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de
Química, Bacharel em Engenharia de Bioprocessos,
2023.

1. Engenharia bioquímica. 2. Desenvolvimento
experimental. I. Zarur Coelho, Maria Alice, orient.
II. Almeida, Rodrigo Volcan de , coorient. III.
Título.

Felipe Cappella de Freitas Castro

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO $K_L A$ INICIAL NA PRODUÇÃO DE β -CAROTENO POR
YARROWIA LIPOLYTICA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenheiro de Bioprocessos.

Aprovado em 15 de dezembro de 2023.

Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc., Professora Titular, UFRJ

Rodrigo Volcan de Almeida, D.Sc., Professor Associado, UFRJ

Leticia Dobler, D.Sc.

Priscilla Filomena Fonseca Amaral Secca, D.Sc., Professora Associada, UFRJ

Carla Luciane Manske Camargo, D.Sc., Professora Adjunta, UFRJ

Rio de Janeiro
2023

AGRADECIMENTOS

Gratidão é um sentimento que eu sempre tento expressar nas minhas relações. Não somente pelo melhor convívio e solidariedade entre as pessoas, receber um “Obrigado!” sincero dá uma satisfação e alegria para qualquer pessoa. E aqui é um espacinho que irei tentar passar esse sentimento para quem me ajudou nessa empreitada com o beta. Ainda é algo novo separar toda uma parte do trabalho para colocar em palavras, então, por favor, relevem!

Primeiro de tudo, quero agradecer à minha família. À minha avós, Darle, que é minha segunda mãe, e Marlene, que sempre buscaram me dar todo o conforto para eu poder focar em minha formação profissional por mais de. Ao meu pai, Luis Eduardo, que sempre me motiva para o próximo passo, buscando oportunidades e me apoiando. À minha mãe, Patricia, que apesar de muitos momentos tortuosos, sei que no fundo sempre quer o meu bem. Muito Obrigado!

Aos meus orientadores, por todo ensinamento, paciência e dedicação, e que já ouviram tanto agradecimento depois de toda vez que eu ia tirar uma dúvida. À prof.^a Maria Alice, detentora de um conhecimento e experiência astronômicas, que me dá honra e alegria de dizer que me guiou com toda paciência durante o trabalho desde o dia que bati no laboratório perguntando se poderia estagiar lá. Ao prof. Rodrigo, ou como todos do LaMMP conhecem, Volcan, do qual sou pupilo há mais de 5 anos, ainda me lembrando de algumas aulas de bioquímica (não todas, viu?), sendo guia por 2 anos de Iniciação Científica e com quem ainda não consegui dividir uma cerveja. À Letícia, minha super veterana do LaMMP e que só havia ouvido histórias antes do início desse ano de 2023. Muitas dessas histórias que se provaram exageradas, pois foi alguém que bateu cabeça junto comigo para dar início ao trabalho, nos virando para conseguir fazer funcionar o biorreator e o que ela aprendeu na parte de engenharia no trabalho, me fez lembrar e aprender na parte de microbiologia e biologia molecular. Muito Obrigado!

À todo o grupo do Laboratório de Engenharia de Sistemas Biológicos (BIOSE.- *Biological System Engineering*), que fez o espaço do laboratório ser tão agradável durante esses meses de luta. Ao Adriano e à Nathalia, que me ajudaram tanto principalmente com o biorreator e que ainda tentam fazer minha cabeça para que eu entre no mestrado. À Caroline, a quem eu sinto como uma quase-orientadora por toda a experiência e sabedoria passada, além da amizade. Aos professores Ailton e Bernardo, por toda a ajuda e orientação em pequenos contratempos e grandes dúvidas, bem como nos momentos de confraternização. À

Rachel, Rhonyele, Gabrielle, Gabriella, Dalal, João, Lucas e Luan, pela amizade com todos e pelos momentos de descontração que com certeza me ajudaram a manter a saúde mental durante o trabalho. Muito Obrigado!

À todo grupo do Laboratório de Microbiologia Molecular e Proteínas (LaMMP), em especial à Gabriela, que é a sous-chef do laboratório, mais um poço de conhecimento e experiência, e que já me ajudou incontáveis vezes, e à Camilla, que apesar de não fazer mais parte do grupo, foi minha orientadora na época de Iniciação Científica e quem andou para que eu pudesse correr junto da *Yarrowia*. Muito Obrigado!

Ao pessoal do laboratório EQ-123. À prof.^a Priscilla, que disponibilizou o espaço e o biorreator para eu realizar as fermentações, e me ajudou em diversas dúvidas que apareciam. Ao Deja e ao Robson, que me deram uma mão com as fermentações e com o controle do biorreator. Muito obrigado!

Ao pessoal do Laboratório de Termodinâmica Aplicada e Simulação Molecular (ATOMS), pela colaboração durante os testes de viscosidade do trabalho, em especial ao prof. Márcio Nele, ao André e à Thamires. Muito Obrigado!

Às amigas feitas antes e durante a jornada pela UFRJ. Sem vocês, certamente a caminhada teria sido muito mais difícil. Numa época de conscientização sobre saúde mental, ter amigos com quem desabafar, se divertir e trocar experiências é um dos melhores remédios contra qualquer enfermidade à mente. Desde os UFriendsRJ: Rafael, João Victor, João Carlos, Pamella, Dayanandra, Lívia, Giovanna, Thaís, Mariana, Ísis, Matheus, Gabriel; indo para as amigas que o LaMMP trouxe: Juliana, Gabriel, Luca, Eduarda; à Manuela e Lucas que foram amigas da Escola de Química; aos amigos do Brotherhood: Mario, João Gabriel, Sergio, Heron, Lucas, Pedro. Muito Obrigado!

RESUMO

CASTRO, F. C. F.. **Estudo da influência do k_La inicial na produção de β -caroteno por *Yarrowia lipolytica***. Rio de Janeiro, 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Bioprocessos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

O β -caroteno é uma molécula de interesse tecnológico pela sua ação antioxidante e participação na formação de vitamina A em organismos vivos. Através de uma modificação genética, a cepa da levedura oleaginosa *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 é capaz de realizar sua síntese. Além disso, esse micro-organismo consegue produzir o carotenoide em meios de cultivo compostos por subprodutos industriais, como a glicerina loira e a milhocina. Estes subprodutos ainda possuem uma gama de nutrientes que podem ser aproveitados pelo micro-organismo, validando o seu uso por interesse econômico e ambiental. Como *Y. lipolytica* é um microrganismo estritamente aeróbio, a transferência de oxigênio durante a fermentação é vital para seu crescimento e, conseqüentemente, terá influência na quantidade de β -caroteno que a levedura produz e acumula. Logo, é importante caracterizar e analisar a influência do coeficiente global de transferência de oxigênio, k_La , no crescimento e na produção do β -caroteno. Neste contexto, o presente trabalho de conclusão de curso teve como objetivo empregar um meio de cultivo composto por glicerina loira e milhocina para a produção de β -caroteno pela levedura *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 geneticamente modificada, além de caracterizar e determinar a influência do k_La na produção do carotenoide em um biorreator de bancada. Após a caracterização do k_La , foram propostas duas condições de agitação/aeração para o cultivo: 400 RPM e 1 vvm; e 600 RPM e 1,5 vvm. Obteve-se em 400 RPM e 1 vvm: $13,80 \pm 2,10 \text{ mg.L}^{-1}$ de concentração de β -caroteno, X_{Max} de $21,95 \pm 1,20 \text{ g.L}^{-1}$ e $Y_{\text{P/X}}$ de 0,63. Já em 600 RPM e 1,5 vvm: $77,73 \pm 0,66 \text{ mg.L}^{-1}$ de β -caroteno, X_{Max} de $19,35 \pm 0,78 \text{ g.L}^{-1}$ e $Y_{\text{P/X}}$ de 4,10. Esses resultados evidenciam que um k_La inicial maior acarreta numa maior produção e acúmulo celular do carotenoide. Além disso, menores valores de k_La revelaram um potencial de produção voltado para o licopeno, precursor direto do β -caroteno e que também possui potencial biotecnológico.

Palavras-chave: β -caroteno, subprodutos industriais, transferência de oxigênio.

ABSTRACT

CASTRO, F. C. F.. **Estudo da influência do k_La inicial na produção de β -caroteno por *Yarrowia lipolytica***. Rio de Janeiro, 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Bioprocessos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

β -carotene is a molecule of technological appeal due to its antioxidant activity and role in the vitamin A biosynthesis. Through genetic modification the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* strain IMUFRJ 50682 can produce it. Furthermore, this microorganism can utilize culture media with industrial byproducts in their composition, namely crude glycerin and corn steep liquor (CSL) for this pathway. These byproducts still retain an array of nutrients that may still be used by microorganisms validating an interest in their potential use for economical and environmental interest. Being a strictly aerobic organism, oxygen transfer plays a fundamental role in the growth of *Y. lipolytica*, and consequently, in the β -carotene production and storage by the yeast. Thus, characterization and analysis of the global oxygen transfer rate (k_La) and its influence on cell growth and β -carotene yield is critical. In this context, the following work had the objective of utilizing a culture medium with crude glycerin and CSL for β -carotene production by the yeast genetically modified *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 CRP23 on a lab-scale bioreactor, while characterizing and determining k_La 's influence on the carotenoid's production. After obtaining different k_La values using various aeration/agitation pairings, two settings were chosen: 400 RPM e 1 vvm; e 600 RPM e 1.5 vvm. Using 400 RPM e 1 vvm yielded $13.80 \pm 2.10 \text{ mg.L}^{-1}$ of β -carotene, X_{Max} of $21.95 \pm 1.20 \text{ g.L}^{-1}$ and $Y_{\text{P/X}}$ de 0.63. While $77.73 \pm 0.66 \text{ mg.L}^{-1}$, $19.35 \pm 0.78 \text{ g.L}^{-1}$ and 4.10 were obtained for β -carotene, X_{Max} and $Y_{\text{P/X}}$ respectively in a 600 RPM e 1.5 vvm combination. These results highlight that a higher initial k_La returns a higher β -carotene output and cells with bigger stocks of the carotenoid. Moreover, the lower aeration/agitation pairing unveiled a potential use of this strain for lycopene production as well being the direct precursor of β -carotene on the pathway, another carotenoid with biotechnological uses, thus revealing the versatility and potential of this *Y. lipolytica* strain.

Keywords: β -carotene, industrial byproducts, oxygen transfer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 - Estruturas moleculares de: (A) β -caroteno; (B) licopeno; (C) cantaxantina e (D) astaxantina.....	16
Figura 2.2 - Via metabólica do β -caroteno a partir da glicose em uma célula de <i>Y. lipolytica</i> modificada com os genes CarRP e CarB.....	22
Figura 2.3 - Caminho de uma molécula gasosa desde a bolha de ar, passando pelo meio de cultivo até chegar no ambiente intracelular.....	25
Figura 2.4 - Configuração da Teoria de Whitman, com uma aproximação da interface gás-líquido para a transferência de massa de um gás.....	26
Figura 2.5 - Ciclos de mecanismo de combate à EROs utilizando GSH e NADPH e suas formas de regeneração.....	31
Figura 2.6 - Representação esquemática da via das pentoses-fosfato, com destaque para a redução de 2 moléculas de NADP ⁺ a NADPH.....	32
Figura 4.1 - Gráfico tempo x O ₂ dissolvido durante o método da desgaseificação.....	38
Figura 4.2 - Gráfico destacando que o coeficiente angular do gráfico é o valor de $-k_L a$	39
Figura 4.3 - Ciclo de etapas para extração do β -caroteno.....	41
Figura 5.1 - Distribuição dos valores de $k_L a$ (h ⁻¹) em água, MM30 e MM30 com 0,3 g.L ⁻¹ de células mortas com a variação da rotação (RPM): (A) 0,5 vvm; (B) 1 vvm; (C) 1,5 vvm; (D) 2 vvm.....	43
Figura 5.2 - Gráfico comparativo entre os valores de $k_L a$ (h ⁻¹) no meio MM30 nas condições de 400 RPM 1 vvm e 600 RPM 1,5 vvm com e sem adição de antiespumante a uma concentração de 0,03%.....	45
Figura 5.3 - Produção de biomassa, concentração de glicerol e evoluções de pO ₂ e pH durante o processo fermentativo em: (A) 400 RPM e 1 vvm; (B) 600 RPM e 1,5 vvm.....	47
Figura 5.4 - Produção de biomassa e β -caroteno durante o processo fermentativo nas condições: (A) 400 RPM e 1 vvm; (B) 600 RPM e 1,5 vvm.....	49
Figura 5.5 - Cromatogramas obtidos durante a análise por HPLC para quantificação de β -caroteno: (A) 600 RPM 1,5 vvm em 72 h; (B) 400 RPM 1 vvm 72 h; (C) 400 RPM 1 vvm 96 h.....	52
Figura 5.6 - Espectros de absorvância obtidos para as frações destacadas na Figura 5.5 (C) e comparadas com padrão de β -caroteno: (A) β -caroteno, (B) 7 min, (C) 10 min, (D) 16 min.....	53
Figura 5.7 - Diferença de coloração entre os pellets obtidos nas condições: (A) 400 RPM e 1 vvm, com uma coloração avermelhada; (B) 600 RPM e 1,5 vvm, com uma coloração alaranjada.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Produção de β -caroteno por diferentes microrganismos, fontes de carbono e métodos de produção divulgados na literatura.....	19
Tabela 2.2 - Concentrações de saturação de O ₂ em diferentes condições de temperatura, pressão e concentração de soluto.....	24
Tabela 4.1 - Parâmetros utilizados no biorreator.....	36
Tabela 4.2 - Razões de interesse entre parâmetros e dimensões do biorreator.....	36
Tabela 5.1 - Valores de viscosidade relativos a cada sistema estudado a 28 °C.....	46
Tabela 5.2 - Comparativo entre produtividades, rendimentos de biomassa e produto, e taxas de consumo de substrato entre as condições de cultivo estudadas.....	50
Tabela 5.3 - Comparativo entre os parâmetros de produção de β -caroteno por <i>Y. lipolytica</i> modificada entre este Trabalho de Conclusão de Curso e outros trabalhos da literatura.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina Trifosfato
CNPE	Conselho Nacional de Política Energética
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CSL	<i>Corn Steep Liquor</i>
DCW	<i>Dry Cell Weight</i>
DMAPP	Pirofosfato de dimetilalilo
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
EFSA	<i>European Food and Safety Authority</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FPP	Farnesil pirofosfato
G6P	Glicose-6-fosfato
G6PD	Glicose-6-fosfato-desidrogenase
GGPP	Geranyl geranyl pirofosfato
GRAS	<i>Generally Recognised as Safe</i>
GSH	Glutathiona Reduzida
GSSG	Glutathiona Oxidada
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
IPP	Isopentenil pirofosfato
MVA	Mevalonato
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PDA	<i>Photo Diode Array</i>
TAG	Triacilglicerol
TCA	Ácido tricarboxílico
TCO	Taxa de Consumo de Oxigênio
TTO	Taxa de Transferência de Oxigênio

LISTA DE SÍMBOLOS

a	Área interfacial específica (m^{-1})
X	Biomassa ($g.L^{-1}$)
k_G	Coefficiente de Transferência de Oxigênio na Fase Gasosa ($gO_2.m^{-2}.h^{-1}.atm^{-1}$)
k_L	Coefficiente de Transferência de Oxigênio na Fase Líquida ($m.s^{-1}$)
K_T	Coefficiente Global de Transferência de Oxigênio ($m.s^{-1}$)
C_L^*	Concentração de Saturação de O_2 ($gO_2.L^{-1}$)
P_{Max}	Concentração Máxima de β -caroteno ($mg.L^{-1}$)
X_{Max}	Concentração Máxima de Biomassa ($g.L^{-1}$)
C_L	Concentração na Fase Líquida ($gO_2.L^{-1}$)
C_i	Concentração na Interface Gás-Líquido ($gO_2.L^{-1}$)
H	Constante de Henry ($atm.m^3.gO_2^{-1}$)
N_{O_2}	Fluxo de Oxigênio por Unidade de Área Interfacial ($gO_2.m^{-2}.h^{-1}$)
$N_{O_2,G}$	Fluxo de Oxigênio por Unidade de Área Interfacial na Fase Gasosa ($gO_2.m^{-2}.h^{-1}$)
$N_{O_2,L}$	Fluxo de Oxigênio por Unidade de Área Interfacial na Fase Líquida ($gO_2.m^{-2}.h^{-1}$)
P	Produto ($mg.L^{-1}$)
p_g	Pressão Parcial na Fase Gasosa (atm)
p_i	Pressão Parcial na Interface Gás-Líquido (atm)
$Y_{P/X}$	Rendimento de β -caroteno por massa de célula
$Y_{P/S}$	Rendimento de β -caroteno por substrato consumido
$Y_{X/S}$	Rendimento de células por substrato consumido
S	Substrato ($g.L^{-1}$)
Q_S	Taxa de consumo de substrato ($g.L^{-1}.h^{-1}$)
$k_L a$	Taxa de Transferência Global de Oxigênio (h^{-1})
q_{O_2}	Taxa Específica de Consumo de Oxigênio (h^{-1})
t	Tempo (h)
μ	Viscosidade Dinâmica (Pa.s)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 INTERESSE BIOTECNOLÓGICO DO β -CAROTENO	16
2.2 PRODUÇÃO DE β -CAROTENO	17
2.3 <i>YARROWIA LIPOLYTICA</i>	20
2.4 TRANSFERÊNCIA DE MASSA DE OXIGÊNIO EM UM MEIO DE CULTIVO	23
2.5 UTILIZAÇÃO DE GLICERINA LOIRA E MILHOCINA	33
3 OBJETIVOS	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 MATERIAIS	35
4.2 EQUIPAMENTOS	35
4.3 MICRORGANISMOS	37
4.4 CULTIVOS	37
4.5 ANÁLISE DO COEFICIENTE GLOBAL DE TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO	38
4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS	40
4.6.1 Quantificação de Crescimento Celular	40
4.6.2 Quantificação de Glicerol	40
4.6.3 Extração e Quantificação de β-caroteno	41
4.6.4 Análise de Viscosidade	42
5 RESULTADOS	43
5.1 ESTUDO DE K_{LA}	43
5.2 PRODUÇÃO DE β -CAROTENO	46
6 CONCLUSÕES	58
7 REFERÊNCIAS	60
APÊNDICE A – CURVA ANALÍTICA PARA O CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL	67
APÊNDICE B – CURVA ANALÍTICA PARA O CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DE BETA-CAROTENO	67

1 INTRODUÇÃO

Carotenoides são pigmentos lipossolúveis naturais com ação antioxidante, sendo metabolizados naturalmente por uma variedade de microalgas, plantas e fungos filamentosos (ZHANG, 2020). Um componente de destaque deste grupo é o β -caroteno, carotenoide de coloração alaranjada característica. É naturalmente sintetizado por vegetais como cenoura e tomate, e por microrganismos como algas do gênero *Dunaliella*, as leveduras do gênero *Rhodotorula* e o fungo filamentoso *Blakeslea trispora* (BOGACZ-RADOMSKA, 2018). Além de sua ação antioxidante, o β -caroteno também tem função em organismos como corante e como precursor do retinol, a vitamina A. Comercialmente, o β -caroteno pode ser empregado em suplementos alimentares, como corante para dietas alimentares de peixes e para cosméticos de uso tópico. Em 2022, o mercado de β -caroteno movimentou cerca de US\$ 350-575 milhões, com expectativa de crescimento em especial na alimentação humana (GLOBAL MARKET INSIGHTS, 2022).

Globalmente, a produção industrial de β -caroteno se dá de maneira majoritária pela via sintética. Contudo, o aumento da conscientização ambiental junto de novas legislações fazem com que a produção biológica esteja em ascensão. A extração de β -caroteno em plantas, microalgas e fungos filamentosos ainda é limitada por alguns fatores como: competição com a indústria alimentícia, baixa produtividade em cepas naturalmente produtoras e matrizes complexas com outros carotenoides que dificultam a extração. Portanto, a utilização de transformação heteróloga é uma via promissora que permite a implementação da produção do carotenoide em larga escala (DE SOUZA, 2020).

Analisando a natureza lipossolúvel do β -caroteno, uma espécie ideal para servir de plataforma de produção é a levedura oleaginosa *Yarrowia lipolytica*. Com o alto acúmulo de lipídeos, especificamente em estruturas em seu citoplasma chamadas de corpúsculos lipídicos (BEOPOULOS, 2011), a solvatação do β -caroteno pode ser facilitada, aumentando o acúmulo intracelular (SABIROVA, 2011; XU, 2016). Seu genoma e metabolismo já estão descritos na literatura (GUO, et al. 2014, MAGNAN et al. 2016, DEVILLERS et al. 2016), e mostra-se uma espécie versátil e adaptável em diversas condições de ambiente. Por possuir *status* GRAS (do inglês, *Generally Recognized as Safe*) concedido pelo órgão estadunidense FDA, há uma garantia de não-patogenicidade à humanos. Isso permite sua ampla manipulação e a segurança no consumo de seus produtos. Ademais, a *Y. lipolytica* é capaz de metabolizar uma diversa

variedade de fontes de carbono. Também pode se desenvolver em subprodutos industriais, em especial de origem na indústria alimentícia (DA SILVA, 2012; CARVALHO, 2023).

A *Y. lipolytica* é um microrganismo estritamente aeróbio. Logo, a transferência de O_2 para um meio de cultivo inoculado com a levedura é primordial para a concretização de seu crescimento, e, conseqüentemente, de um bioprocesso. Entretanto, a baixa solubilidade do O_2 em meios aquosos é limitante para o metabolismo aeróbico. Assim, estabelecer parâmetros de controle da transferência de massa de O_2 se torna necessário para a otimização de um cultivo com células que utilizam respiração celular exclusivamente. Um parâmetro que traduz a transferência de massa de O_2 é o k_{La} , coeficiente global de transferência de O_2 . O valor de k_{La} varia com o progresso de uma fermentação, devido à modificação da composição do sistema, por consumo dos componentes do meio e geração de metabólitos, e do crescimento celular (GALACTION, 2004; SCHAEPE, 2013). Porém, ter seu valor inicial estabelecido e conhecido é essencial para compreender a disponibilidade do gás para as células (SCHMIDELL, 2001).

Durante toda a linha de produção para qualquer tipo de indústria, são gerados subprodutos que, ou não possuem um valor agregado alto, ou requerem um alto custo energético ou existe uma limitação tecnológica que não compensa a transformação. Somente no setor industrial agro-alimentício, cerca de 1,3 bilhões de toneladas de resíduos e subprodutos são gerados (FAO, 2019).

A glicerina loira é o principal subproduto da produção do biodiesel, com 10% de toda a geração do biocombustível sendo composta pelo subproduto (KUMAR, 2019). A inclusão de biodiesel na composição do diesel é definida pela Resolução N° 16, de 29 de Outubro de 2018 do Conselho Nacional de Política Energética, onde, a partir do ano de 2023, o diesel deve ser composto por 12% de biodiesel. A produção nacional de biodiesel em 2022 foi de 6,3 bilhões de litros, com expectativa de aumento para 7,4 bilhões de litros em 2023 (TOOGE, 2023). Ou seja, a geração de glicerina loira irá acompanhar essa tendência, podendo gerar mais oportunidades para a pesquisa de sua utilização. A composição da glicerina loira varia dependendo do óleo de origem utilizado na transesterificação, mas geralmente é majoritariamente composto por volta de 60-80% de glicerol. O glicerol pode ser usado como fonte de carbono por algumas espécies microbianas, podendo ser transformado em acetil-CoA para sua inserção na rota de produção do β -caroteno, contornando o longo processo da via glicolítica. A glicerina loira já é descrita como um substituto de fontes de carbono de baixo custo para a produção de diversos produtos sintetizados por uma variedade de microrganismos.

Análogo à glicerina loira, a milhocina também é um subproduto industrial (em inglês denominado de *corn steep liquor*), oriundo do beneficiamento do milho, cuja colheita mundial passa de 1 bilhão de toneladas anualmente, representando cerca de 35% da produção de grãos global (ZHOU, 2022). Apesar do principal grão de origem brasileira ser a soja, o Brasil representou na safra de 2020/21 cerca de 87 milhões de toneladas de milho, sendo 7,7% da produção global (DERAL-PR, 2021). Possuidor de potencial biotecnológico tal qual a glicerina loira, a milhocina possui uma variedade de nutrientes que podem complementar o meio de cultivo ao mesmo tempo que reduz o custo do processo (RIVAS, 2004; BARROS, 2016).

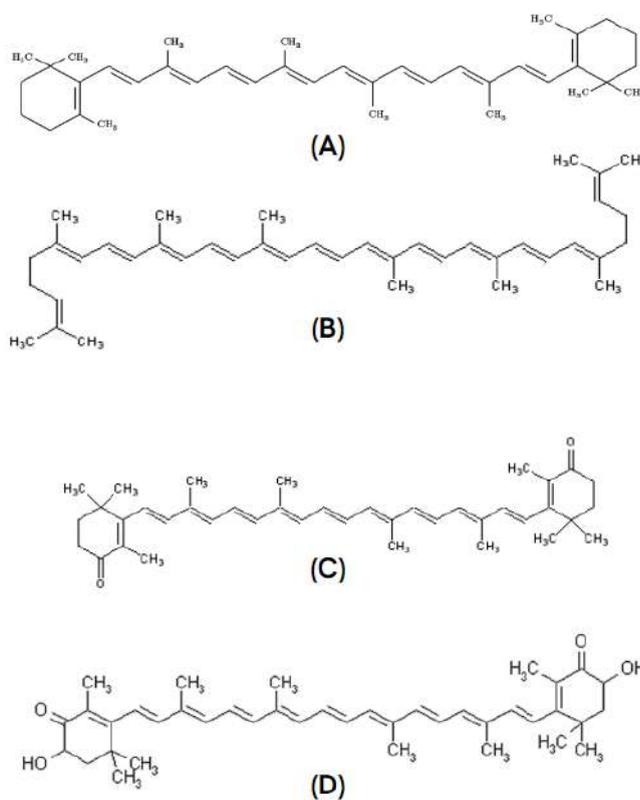
Assim, com a utilização de um meio que se utiliza destes subprodutos industriais para a produção de β -caroteno por um transformante de *Y. lipolytica*, se torna necessário um estudo para verificar a influência de diferentes valores de transferência de O_2 na biossíntese. Através da observação em diversas condições e seus respectivos valores de $k_L a$, pode-se chegar a uma otimização da produção de β -caroteno, enquanto há a transformação de subprodutos de baixo valor agregado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 INTERESSE BIOTECNOLÓGICO DO β -CAROTENO

O β -caroteno é um terpeno do grupo dos carotenoides, assim como licopeno, cantaxantina e astaxantina, e possui uma coloração alaranjada característica. Sua principal atuação no ambiente intracelular é como antioxidante. Ou seja, é um alvo de ataques de moléculas reativas, como radicais livres e espécies reativas de oxigênio, e energia ionizante, como a radiação ultravioleta, protegendo outros compostos celulares importantes para o metabolismo celular (LI, SWOFFORD & SINSKEY, 2020). Ademais, sua mais conhecida função no metabolismo humano é como o precursor do retinol, a vitamina A. Devido a essa característica antioxidante, esta molécula é consideravelmente instável termicamente e na presença prolongada ao oxigênio. Isso leva a pesquisas por algum mecanismo de proteção, como microencapsulamento (DANG, 2017). Ou mesmo utilizar a própria estrutura celular das espécies que o sintetizam naturalmente.

Figura 2.1 - Estruturas moleculares de: (A) β -caroteno; (B) licopeno; (C) cantaxantina e (D) astaxantina



Além do uso terapêutico, o β -caroteno também pode ser utilizado como corante. Uma utilização com esta finalidade é na indústria cosmética, onde o apelo por ser considerado um composto natural podem ser um diferencial. Além disso, sua função antioxidante pode trazer benefícios durante sua utilização tópica. Uma outra possibilidade de destaque é sua inclusão na dieta de peixes ornamentais. Pois sua aplicação na alimentação de alguns animais aquáticos traz uma melhora no desenvolvimento e aspecto destes (DE CARVALHO & CARAMUJO, 2017). Apesar deste potencial, o carotenoide mais amplamente utilizado para este fim, é a astaxantina, com um mercado já estabelecido no melhoramento visual de peixes em aquicultura (TUAN HARITH, 2022).

Em termos financeiros, o β -caroteno movimentou cerca de US\$350-575 milhões no ano de 2022, com sua principal aplicação na química sintética. A expectativa, no entanto, é que o mercado mude essa distribuição para focar na alimentação humana, suplementação e produtos naturais, com um crescimento projetado de 5% até 2032 (GLOBAL MARKET INSIGHTS, 2022).

2.2 PRODUÇÃO DE β -CAROTENO

Atualmente, a principal obtenção do β -caroteno é através da rota sintética, contribuindo para cerca de 90% de sua origem global (YANG, 2014). Contudo, com preocupações e leis sanitárias sobre o uso de compostos de origem sintética, sua obtenção via produtores naturais vem ascendendo. Neste caminho, o β -caroteno pode ser obtido através de algumas espécies de plantas, como cenoura, tomate e abóbora. Porém, este processo não é favorável pela sazonalidade e alto custo de extração (BOGACZ-RADOMSKA, 2018), além da competição com a indústria alimentícia. Isso traz em destaque a rota microbiológica, como as algas do gênero *Dunaliella*, as leveduras do gênero *Rhodotorula* e o fungo filamentosso *Blakeslea trispora* (BOGACZ-RADOMSKA, 2018). Contudo, a matriz complexa de carotenoides sintetizados por esses microrganismos e a baixa produtividade em microalgas e fungos filamentosos limitam sua possibilidade de comercialização em larga escala. Assim, a via de produção heteróloga se mostra promissora, podendo se utilizar de microrganismos modelos, cujas características no meio científico já são disseminadas e conhecidas, como a bactéria *Escherichia coli* e a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Isso abre caminhos para uma melhor produção de β -caroteno, como já descrito na literatura (YOON, 2009; LANGE AND STEINBÜCHEL, 2011).

Alguns exemplos desenvolvidos na literatura com diversos microrganismos e suas produções estão ilustrados na Tabela 2.1. Nela, é possível notar a diversidade de microrganismos, desde cepas naturalmente produtoras, até transformantes com expressão heteróloga. Além disso, em clones superprodutores, ou seja, que possuem múltiplas cópias de genes que codificam enzimas que participam do metabolismo de produção do β -caroteno, possuem os maiores valores de produção. Comparando-as com as cepas selvagens naturalmente produtoras, que tem uma escala de menos de 1 g.L^{-1} , os clones superprodutores conseguiram produzir acima de 3 g.L^{-1} . Esses resultados demonstram o potencial da modificação genética, em especial, para microrganismos com um maquinário e estrutura celular que favorecem o metabolismo de um produto que eles geralmente não produzem.

Tabela 2.1 - Produção de β -caroteno por diferentes microrganismos, fontes de carbono e métodos de produção divulgados na literatura

Referência	Substrato e Método Utilizado	Produção de β -caroteno	Microrganismo Utilizado
HU et al. (2013)	Glicose e parafina em Frasco Agitado de 500 mL	715 mg.L ⁻¹	<i>Blakeslea trispora</i> ATCC14271 ATCC14272*
YANG et al. (2014)	Glicerol em Batelada Alimentada em Biorreator de 5 L	3,2 g.L ⁻¹	<i>Escherichia coli</i> YJM49**
BAGY et al. (2016)	Extrato Ácido de Cebola em Frasco Agitado de 250 mL	204,29 mg.L ⁻¹	<i>Rhodotorula glutinis</i> KU550702*
NANOUE et al. (2017)	Milhocina e Óleo de Fritura em Batelada Simples em Biorreator de 0,7 L	695,8 mg.L ⁻¹	<i>Blakeslea trispora</i> ATCC14271 *
WU et al. (2017)	Glicerol em Frasco Agitado de 100 mL	268 mg.L ⁻¹	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739**
GAO et al. (2017)	Glicose em Batelada Alimentada em Biorreator de 5 L	4 g.L ⁻¹	<i>Yarrowia lipolytica</i> CIBTS2112**
LARROUDE et al. (2017)	Glicose em Batelada Alimentada em Biorreator de 5 L	6,5 g.L ⁻¹	<i>Yarrowia lipolytica</i> ob-CHC ^{TEF} C ^{TEF} **
SUN et al. (2020)	Xilose em Frasco Agitado de 250 mL	772,8 mg.L ⁻¹	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SR8**
DE SOUZA et al. (2020)	Glicerina Loira e Milhocina em Frasco Agitado de 125 mL	154,7 mg.L ⁻¹	<i>Yarrowia lipolytica</i> IMUFRJ 506282 CRP23**
ZHANG et al. (2020)	Glicose em Batelada Alimentada em Biorreator de 5 L	4,5 g.L ⁻¹	<i>Yarrowia lipolytica</i> XK19**

*Cepa selvagem que produz β -caroteno naturalmente

**Cepa com expressão heteróloga

Fonte: elaboração própria.

Analisando a estrutura do β -caroteno pela Figura 2.1, conclui-se que é uma molécula muito pouco polar, fazendo com que seu armazenamento e produção sejam facilitados se o microrganismo escolhido possui corpos que acumulem moléculas também de alta hidrofobicidade. A levedura *Yarrowia lipolytica* tem esse potencial, pois é uma espécie de levedura oleaginosa. Com o alto acúmulo de lipídeos, especificamente em estruturas em seu citoplasma chamadas de corpúsculos lipídicos (BEOPOULOS, 2011), a solvatação do β -caroteno pode ser facilitada, aumentando o acúmulo intracelular, levando a uma maior produção por massa de células do que em *E. coli* ou *S. cerevisiae* (SABIROVA, 2011; XU, 2016).

2.3 *YARROWIA LIPOLYTICA*

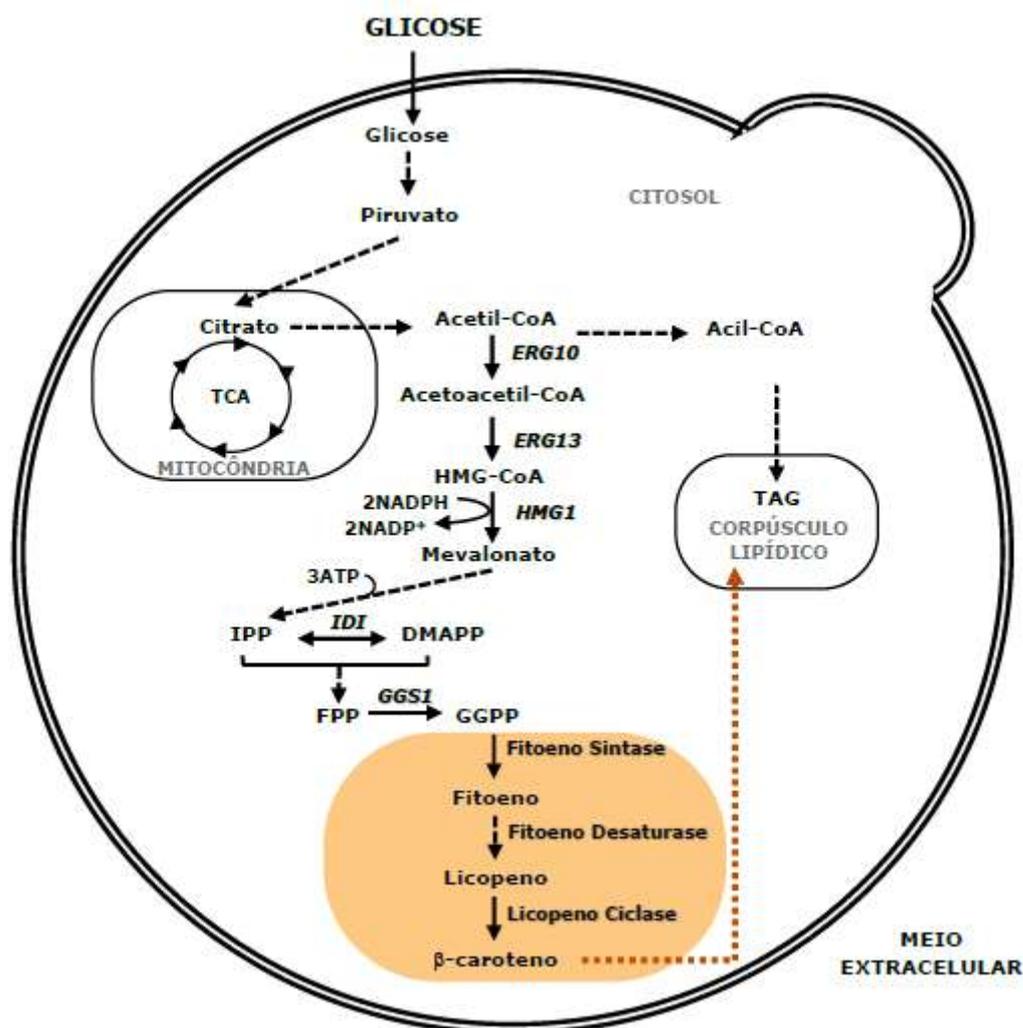
A *Y. lipolytica* é uma levedura oleaginosa não-convencional (leveduras convencionais são das espécies *Saccharomyces cerevisiae* ou *Schizosaccharomyces pombe*, leveduras utilizadas e caracterizadas há mais tempo (SPENCER, 2002)), cujas diversas linhagens já têm genoma e metabolismo descritos na literatura (GUO, et al. 2014, MAGNAN et al. 2016, DEVILLERS et al. 2016), mostrando-se uma espécie versátil e adaptável em diversas condições de ambiente. Também é capaz de metabolizar uma vasta gama de compostos como fonte de carbono, que vão desde glicídios e lipídeos com padrão de cultivo laboratorial, como glicose e glicerol, até subprodutos industriais mais complexos de variadas origens, em especial da indústria alimentícia, como a glicerina bruta e a milhocina. Com este conhecimento, viu-se que esta espécie é capaz de se tornar uma fábrica celular para variados produtos de interesse biotecnológico como: ácidos orgânicos (PAPANIKOLAOU, 2002; BEOPOULOS, 2014), enzimas (GOMES, 2007; NASCIMENTO, 2022; CARVALHO, 2023), e mesmo carotenoides como licopeno (MATTHÄUS, 2014) e o próprio β -caroteno (GAO, 2017; LARROUDE, 2018; DE SOUZA, 2020; JACOBSEN, 2020; ZHANG, 2020).

Outro fator que encoraja a pesquisa e desenvolvimento com a *Y. lipolytica* como chassi celular é seu *status* GRAS (do inglês, *Generally Recognized as Safe*, Amplamente Reconhecida como Segura) concedido pelo órgão estadunidense FDA (*Food and Drug Administration*) e como segura pelo órgão europeu EFSA (*European Food and Safety Authority*) garantindo que esta é uma espécie não-patológica a seres humanos, e que não há riscos durante à saúde para a realização de pesquisas e para uso alimentício dos produtos gerados (EFSA BIOHAZ PANEL, 2018).

Existe mais de uma via de produção biológica de β -caroteno (YANG, 2014), mas a que se utiliza da ramificação da lipogênese pela síntese do mevalonato (JACOBSEN, 2020) é a mais conhecida e utilizada em expressões heterólogas pela *Y. lipolytica*. Isso pois a via requisita enzimas específicas, disponibilidade de coenzimas como $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ e fosforilações para transformações, ou seja, uso de adenosina trifosfato (ATP) (YANG, 2014), que são regeneradas durante a respiração celular em espécies aeróbias, e um metabolismo propício para o acúmulo de lipídeos, características encontradas na levedura.

A Figura 2.2 ilustra a síntese metabólica do β -caroteno a partir da glicose, onde a *Y. lipolytica* consegue produzir naturalmente o geranyl-geranyl pirofosfato (GGPP), composto que está bem próximo da transformação a β -caroteno na via. Ademais, a *Y. lipolytica* produz altas quantidades de acetil-CoA, outro precursor dessa mesma via. O acetil-CoA é transformado em acetoacetil-CoA e em seguida em HMG-CoA, respectivamente pelas enzimas acetoacetil-CoA tiolase e HMG-CoA sintase (cada uma codificada pelos genes *ERG10* e *ERG13*). O HMG-CoA então é reduzido se utilizando de 2 moléculas de NADPH pela enzima HMG-CoA redutase, codificada pelo gene por *HMG1*, resultando em uma molécula de mevalonato (MVA). Após uma série de reações que utilizam 3 ATP no total, o MVA é levado a isopentenil pirofosfato (IPP), podendo ser isomerizado a pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP) pela enzima codificada pelo gene *IDI*. A condensação de duas moléculas de IPP a uma de DMAPP gera farnesil pirofosfato (FPP), que gera GGPP com a adição de mais uma molécula de IPP, catalisada pela GGPP sintase, codificada pelo gene *GGS1* (DE SOUZA, 2020).

Figura 2.2 - Via metabólica do β -caroteno a partir da glicose em uma célula de *Y. lipolytica* modificada com os genes *CarRP* e *CarB*



TCA: ácido tricarbóxico; IPP: isopentenil pirofosfato; DMAPP: pirofosfato de dimetilalilo; FPP: farnesil pirofosfato; GGPP: geranyl geranyl pirofosfato; TAG: triacilglicerol.

Fonte: de Souza (2020).

Com a inserção dos genes que codificam a enzima de dupla função fitoeno sintase/licopeno ciclase (*CarRP*), que leva o GGPP a fitoeno e licopeno a β -caroteno, e os que codificam a enzima fitoeno desaturase (*CarB*), que leva fitoeno a licopeno, ambos do fungo filamentoso *Mucor circinelloides*, a biossíntese β -caroteno pela *Y. lipolytica* é viabilizada. Através de uma inserção de mais uma cópia do gene *GGS1*, da *Y. lipolytica*, observou-se uma produção considerável de β -caroteno (GAO, 2017; LARROUDE, 2018; JACOBSEN, 2020).

DE SOUZA (2020) realizou uma clonagem utilizando uma cepa selvagem nacional. Isolada da Baía de Guanabara, Rio de Janeiro (HAGLER & MENDONÇA-HAGLER, 1981), a cepa IMUFRJ 50682 possui um fator diferencial por ser uma linhagem brasileira, isolada e

descrita por pesquisadores da própria UFRJ. Utilizando da técnica CRISPR/Cas9 (do inglês, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), o gene *URA3* foi nocauteado, seguido de inserções de uma cópia dos genes *CarRP*, *CarB* e *GGS1*, gerando o clone designado como CRP23. Com uma produção de 154,7 mg.L⁻¹ de β-caroteno e rendimento de β-caroteno por massa de célula ($Y_{P/X}$) de 11,6 com apenas estas modificações genéticas, em um meio composto somente por glicerina bruta e milhocina, o clone se mostrou comparável a outros transformantes de *Y. lipolytica* com essa mesma modificação genética na literatura. Com isso, ele foi selecionado como agente de biotransformação do presente trabalho.

2.4 TRANSFERÊNCIA DE MASSA DE OXIGÊNIO EM UM MEIO DE CULTIVO

Para espécies estritamente aeróbias, ou seja, que utilizam exclusivamente O₂ no seu metabolismo aeróbio, como a levedura *Y. lipolytica*, sendo o suprimento constante desse gás para seu crescimento imprescindível. A molécula de O₂ contudo, possui uma baixa solubilidade em meio aquoso e sua utilização por microrganismos aeróbios é permanente e cresce conforme a concentração da biomassa (X) no meio fermentativo aumenta. Na Tabela 2.2, observa-se que a solubilidade do O₂ sofre uma diminuição com a redução de pressão, aumento da temperatura e da concentração de solutos no meio. Logo, a massa de O₂ que é transferida para o meio, ou a Taxa de Transferência de Oxigênio (TTO), dependerá dos parâmetros adotados para a fermentação. Com o oxigênio solubilizado no meio, as células poderão utilizá-lo em seu metabolismo, através de uma taxa correspondente ao consumo do oxigênio dissolvido pelas células, ou Taxa de Consumo de Oxigênio (TCO). A Equação 2.1 descreve a variação da concentração de O₂ em solução (C_L) com o tempo, que depende dos valores de TTO e TCO. A TCO irá depender da concentração de X no meio e da taxa específica de consumo de O₂ (q_{O2}), demonstrado pela Equação 2.2.

Tabela 2.2 - Concentrações de saturação de O₂ em diferentes condições de temperatura, pressão e concentração de soluto

Temperatura (°C)	Concentração NaCl (0,5 mol.L ⁻¹)	Pressão Parcial O ₂ (atm)	Concentração de Saturação O ₂ (mg/L)
25	-	0,209	8,10
35	-	0,209	6,99
25	-	1,0	40,3
25	0,5	1,0	34,2
25	1,0	1,0	28,5
25	2,0	1,0	22,7

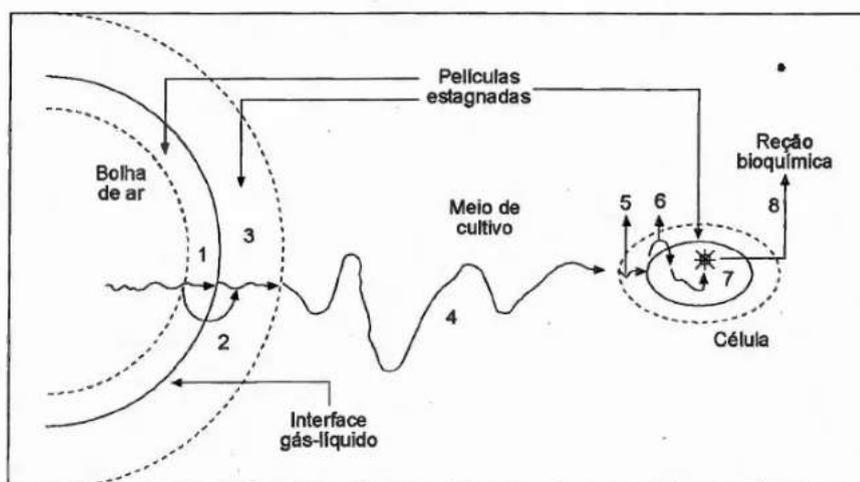
Fonte: Schmidell (2001).

$$\frac{dC_L}{dt} = TTO - TCO \quad (2.1)$$

$$TCO = q_{O_2} * X \quad (2.2)$$

Devido à baixa solubilidade do oxigênio, é possível afirmar que existem diversas resistências durante o processo de transferência de massa da fase gasosa para uma fase líquida e subsequente incorporação para o interior celular. Logo, para descrever a TTO, primeiro deve-se entender o caminho que uma molécula gasosa faz até poder ser utilizada por uma célula, como descrito na Figura 2.3, representando as etapas de transferência para a utilização do O₂ no citoplasma celular (BAYLEY & OLLIS, 1986). Em relação às resistências de cada etapa, primeiramente pode-se desprezar a que se refere a etapa 4, pois, em uma fermentação submersa em um meio pouco viscoso, a fase líquida deve estar suficientemente agitada para garantir a homogeneidade e transporte adequado de solutos para o entorno celular.

Figura 2.3 - Caminho de uma molécula gasosa desde a bolha de ar, passando pelo meio de cultivo até chegar no ambiente intracelular



1) difusão através de uma película de gás estagnada; 2) difusão pela interface gás-líquido; 3) difusão por uma película de líquido estagnada ao redor da bolha de gás; 4) movimentação pelo seio do meio de cultivo; 5) difusão por uma película de líquido estagnada ao redor da célula; 6) transferência através da membrana celular; 7) difusão pelo citoplasma; 8) utilização em uma reação e consumo celular na mitocôndria

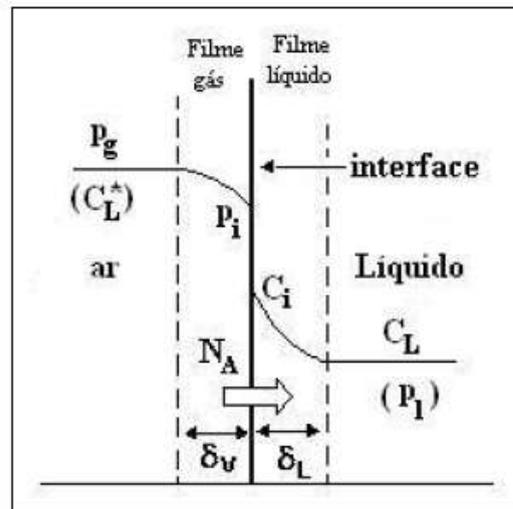
Fonte: Schmidell (2001)

Em relação às resistências na região gás-líquido, considera-se que as etapas 1 e 2 podem ser desprezadas, devido a intensa movimentação das moléculas de oxigênio na fase gasosa e a baixa resistência da interface gás líquido, respectivamente. Contudo, existem espécies que podem alterar a resistência interfacial, como antiespumantes, causando uma maior interferência desta etapa para a TTO. Portanto, na região gás-líquido, pode-se considerar que a resistência da etapa 3 é quem terá mais influência na transferência de O_2 , sendo função da difusividade do gás na fase líquida, assim como da espessura da película estagnada. Com relação à região líquido-célula, devido às dimensões muito menores da célula quando comparada a uma bolha de ar, a razão área-superficial/volume da célula é significativamente maior, além do transporte através da membrana ser controlado por difusão simples, considera-se que toda esta região pode ser desprezada. Em conclusão, a transferência de massa de oxigênio em um sistema aerado é controlado majoritariamente nas proximidades da interface gás-líquido, principalmente pela resistência na região 3 (AMARAL, 2007).

Através da Figura 2.4, tem-se uma representação da teoria de Whitman, ou teoria das duas películas, ao redor da interface gás-líquido. Admitindo-se uma pressão parcial constante no seio da fase gasosa, p_g , em estado estacionário e solução homogênea, as pressões parciais e concentrações de O_2 solubilizado se comportam da seguinte forma: partindo de p_g , a pressão

parcial vai decrescendo conforme se atravessa o filme de gás estagnado com comprimento δ_v , nas imediações da interface, atingindo o mínimo com a pressão parcial na interface, p_i . Atravessando a interface, o gás começa a ser solubilizado, tendo a maior concentração imediatamente após a interface, C_i , atravessado toda a barreira de líquido estagnado, de comprimento δ_L , chegando a um valor mínimo que é a concentração de O_2 no meio, C_L . A transferência entre fases é dada pelo fluxo de O_2 por unidade interfacial da fase gasosa e da fase líquida, $N_{O_2,G}$ e $N_{O_2,L}$, respectivamente, dados pela Equação 2.3 e Equação 2.4, onde k_G e k_L são os coeficientes de transferência locais de transferência de O_2 na fase gasosa e na fase líquida, respectivamente.

Figura 2.4 - Configuração da Teoria de Whitman, com uma aproximação da interface gás-líquido para a transferência de massa de um gás



Fonte: Amaral (2007)

$$N_{O_2,G} = k_G * (p_g - p_i) \quad (2.3)$$

$$N_{O_2,L} = k_L * (C_i - C_L) \quad (2.4)$$

Em uma solução diluída, com p_i e C_i em equilíbrio termodinâmico, pode-se definir a Equação 2.5, a Equação de Henry, onde H é a constante de Henry.

$$p_i = H * C_i \quad (2.5)$$

Contudo, não é possível mensurar as concentrações interfaciais, sendo necessário utilizar o coeficiente global de transferência, K_T , dado pela equação de fluxo global de oxigênio, N_{O_2} , definido pela Equação 2.6. O termo C_L^* é a concentração de saturação de O_2 no meio, caracterizada pela Equação 2.7.

$$N_{O_2} = K_T * (C_L^* - C_L) \quad (2.6)$$

$$C_L^* = \frac{p_g}{H} \quad (2.7)$$

Com a admissão de um estado estacionário, os fluxos da fase líquida, da fase gasosa e global são iguais. Assim, substituindo as Equações 2.5 e 2.7 em 2.3, tem-se a Equação 2.8:

$$\frac{1}{K_T} = \frac{1}{H*k_G} + \frac{1}{k_L} \quad (2.8)$$

Como mencionado, a resistência da fase líquida à transferência de massa de moléculas gasosas é muito maior do que a da fase gasosa. Logo, pode-se admitir que k_G é muito maior que k_L , ou seja, o termo da fase gasosa na Equação 2.8 tende a 0. Portanto, K_T é igual a k_L , ou seja, a transferência de massa de O_2 pode ser descrita somente considerando-se a fase líquida. Contudo, o fluxo N_{O_2} está definido por área interfacial das bolhas de gás, cuja medição é de difícil obtenção. Para contornar este problema, considera-se a área interfacial específica, a , definida pela Equação 2.9.

$$a = \frac{\text{área interfacial de transferência de massa (m}^2\text{)}}{\text{volume total da bolha de ar (m}^3\text{)}} \quad (2.9)$$

Por fim, pode-se definir TTO pela Equação 2.10, onde o termo $k_L a$ define o coeficiente global de transferência de O_2 e sua obtenção depende apenas de conhecer a concentração de saturação de O_2 no meio e sua concentração instantânea.

$$TTO = \frac{dC_L}{dt} = N_{O_2} * a = k_L a * (C_L^* - C_L) \quad (2.10)$$

O valor de $k_L a$ não é fixo para um tipo de meio ou de uma configuração de biorreator. O valor de transferência varia com a vazão de gás alimentada, a velocidade de rotação e tipos de impelidores utilizados, o tipo de célula que está atuando como agente de transformação, bem como as reações específicas que a espécie utiliza, entre outros (GALACTION, 2004; SCHAEPE, 2013).

O principal fator que irá influenciar na transferência de O_2 é a combinação aeração/agitação utilizada. Para a aeração, esta é a forma de fornecer gás ao meio, e conseqüentemente, às células. Inicialmente, quanto maior o fluxo de gás alimentado ao reator, maior será a TTO, garantindo um maior $k_L a$. Contudo, uma vazão muito alta de ar pode retornar um $k_L a$ menor, pois afeta o tempo de residência das bolhas, ou seja, quanto tempo elas ficam em contato com a solução. Apesar de ter maior oferta de moléculas de O_2 , elas terão menos tempo para realizar a transferência devido ao alto fluxo, diminuindo a TTO. Em termos de agitação, uma maior agitação além de garantir uma melhor homogeneização do meio, terá maior força de cisalhamento, induzindo maior quebra de bolhas. Com as bolhas tendo menor diâmetro, maior será o termo a , levando mais uma vez ao aumento do $k_L a$. O diâmetro de abertura e localização do sparger e o tipo de impelidor também têm papel importante na transferência de massa, modificando o tamanho das bolhas, o tempo de residência, as forças de cisalhamento e perfil de homogeneização do meio (GOMES, 2007; MICHELIN, 2013; SCHAEPE, 2013).

Em termos de meio de cultivo, quanto maior for a complexidade do meio, menor será o $k_L a$ relativo, em especial pela redução do fator k_L . Isso ocorre também pela menor solubilidade do O_2 com o aumento da concentração de outros solutos no meio utilizado. Ademais, a viscosidade do meio também tem papel importante, por atuar no tempo de residência das bolhas, gerando um maior tempo de residência, e, por conseqüência, maior TTO. Contudo, a viscosidade pode o termo k_L ocasionando uma redução da transferência de

O₂, sendo o efeito global dependente da extensão dos dois efeitos mencionados (JAMNONGWONG, 2010).

Durante a fermentação, existe a possibilidade de formação de espuma na região da superfície do líquido, podendo ser ocasionado pela própria aeração, liberação gasosa pelo metabolismo celular, pela alta carga proteica do meio, e outros fenômenos. Essa espuma pode causar problemas ao processo, principalmente pela deposição de células na superfície, retirando contato com o meio e afetando o rendimento do processo, e também por potencialmente ocupar o volume do *headspace*, aumentando a pressão interna do biorreator ou entrar em contato com sensores e rotores, levando a danos materiais. Conseqüentemente, a utilização de antiespumantes se tornou indispensável para prevenção desses contratemplos. Contudo, assim como na modificação dos componentes do meio, a adição desses produtos acarreta na modificação do $k_L a$. Em baixas concentrações de antiespumante, esse efeito é negativo, diminuindo as taxas de transferência de O₂. As principais modificações descritas são em k_L , afetando a película interfacial e a difusão gasosa pela mesma, assim como o termo a , ao causar maior coalescência das bolhas, diminuindo a razão área superficial/volume. Em maiores concentrações de antiespumante, foram observados efeitos que na verdade aumentam o valor de $k_L a$, principalmente por aumentarem o tempo de residência das bolhas. Apesar disso, a adição de antiespumante em concentrações elevadas acarreta num maior gasto material, não compensando a diminuição de $k_L a$ causada em concentrações baixas (MORÃO, 1999; SCHAEPE, 2013).

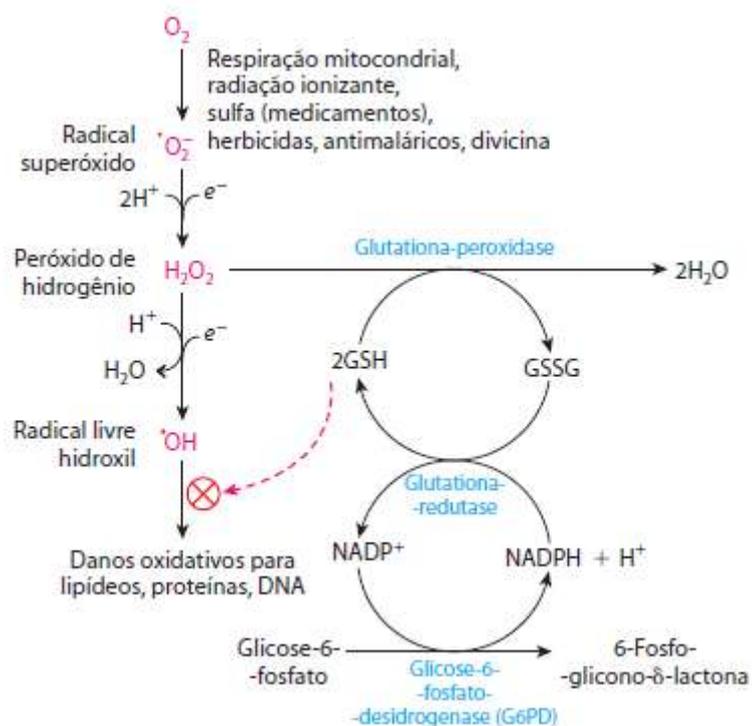
O valor de $k_L a$ inicial é influenciado pelos fatores citados. Porém, durante um bioprocessamento, a taxa de transferência de O₂ é afetada por um elemento crucial na TCO: as células. Conforme ocorre o crescimento celular, a demanda por O₂ cresce, necessitando cada vez mais do fornecimento do gás para atender a demanda. Além disso, o aumento de biomassa modifica a reologia do meio, alterando a composição do meio pelo consumo dos substratos, excreção de metabólitos, modificação da viscosidade e interação com as bolhas de ar, entre outros. Portanto, a chamada taxa de transferência ideal, que é o valor de TCO ótimo para o crescimento celular máximo (em outras palavras, TCO), vai aumentando com o tempo de fermentação. Até que atinge um ponto em que o consumo se sobressai à demanda, ou seja, o crescimento passa da fase exponencial para a fase estacionária. Assim, a taxa ideal vai diminuindo, até que o crescimento atinja o ponto de morte celular. Além disso, o tipo de célula utilizada como agente de transformação também vai influenciar no comportamento do $k_L a$ durante o bioprocessamento, com certas espécies podendo aumentar a taxa de transferência com o crescimento celular. A modificação do $k_L a$ se dá principalmente pelo bloqueio da superfície

das bolhas pela adsorção celular, com sua magnitude dependendo do tipo de célula utilizada (GALACTION, 2004; MOUNSEF, 2015).

Como o suprimento de O_2 é essencial para o crescimento celular de células aeróbias, o valor de $k_L a$ terá efeito sobre a quantidade de produto planejada, seja o produto a própria biomassa ou metabólitos sintetizados pelas células, através da disponibilização de O_2 para regeneração de coenzimas, como $NADP^+/NADPH$ e obtenção de ATP através da fosforilação oxidativa.

Contudo, o O_2 também traz um problema que é a possibilidade de formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Essas EROs são geradas naturalmente pela utilização do gás na respiração celular, pela exposição a radiações ionizantes, entre outros. A principal molécula gerada é o peróxido de hidrogênio, que pode gerar radicais livres e causar danos a diversas estruturas celulares, comprometendo o funcionamento e podendo levar à morte das células. Uma via de síntese importante que combate estas EROs e regenera a coenzima $NADP^+/NADPH$ é a via das pentoses-fosfato. Como ilustrado pela Figura 2.5, a glutathiona reduzida (GSH) reage com o H_2O_2 através da enzima glutathiona peroxidase, gerando água e glutathiona oxidada (GSSG), assim prevenindo a formação de radicais livres. Para produzir uma nova molécula de GSH, a enzima glutathiona-redutase oxida uma molécula de NADPH, restaurando a glutathiona a sua forma reduzida (NELSON, 2014).

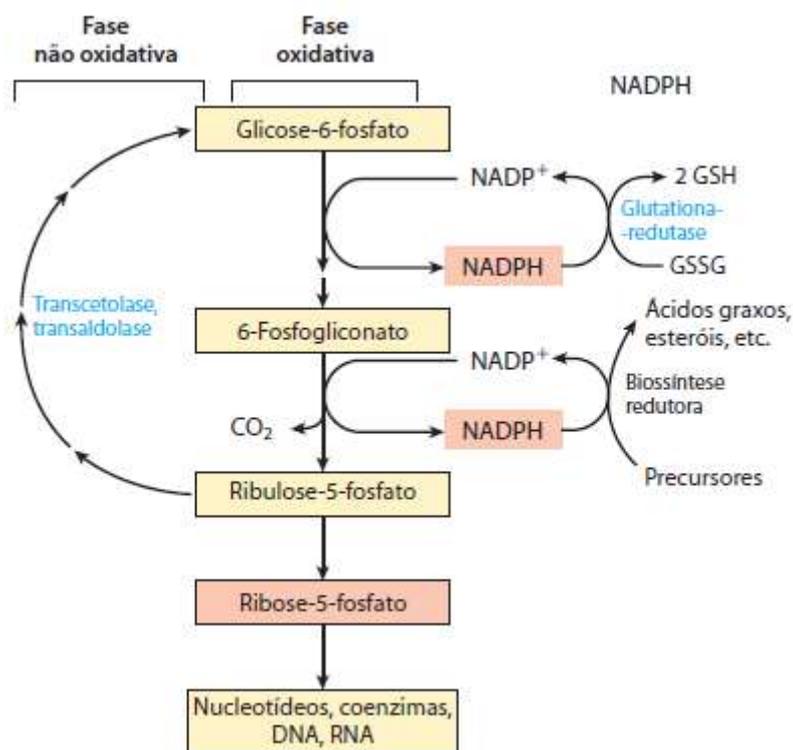
Figura 2.5 - Ciclos de mecanismo de combate à EROs utilizando GSH e NADPH e suas formas de regeneração



Fonte: Nelson (2014)

Para reduzir o $NADP^+$, este entra na fase oxidativa da via das pentoses-fosfato, ilustrado pela Figura 2.6. Através da enzima glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD), ocorre a redução à NADPH e a glicose-6-fosfato (G6P) é transformada em 6-fosfogliconato. Este composto pode ser um agente redutor para uma outra coenzima $NADP^+$, totalizando 2 moléculas de NADPH geradas pela via das pentoses-fosfato. A ribulose-5-fosfato gerada na oxidação do 6-fosfogliconato pode ser transformada em G6P através das enzimas transcetolase e transaldolase, reiniciando a via e podendo gerar mais coenzimas reduzidas (NELSON, 2014).

Figura 2.6 - Representação esquemática da via das pentoses-fosfato, com destaque para a redução de 2 moléculas de NADP⁺ a NADPH



Fonte: Nelson (2014)

No contexto geral, uma maior taxa de transferência acarreta numa maior produção de diversas espécies, como enzimas, carboidratos, carotenoides e até mesmo β -caroteno (GOMES, 2007; WANG, 2009; MICHELIN, 2013; HU, 2013). Contudo, em certas circunstâncias maiores valores de $k_L a$ foram prejudiciais para o crescimento e síntese dos produtos desejados, sendo esse efeito atribuído ao estresse oxidativo ao qual as células são submetidas em altas taxas de transferência. Uma forma de contornar isso é através da metodologia DO-stat, isto é, trabalhar para que a concentração de O₂ dissolvido seja constante, variando agitação e aeração, ou seja, TTO para que se adeque ao aumento de TCO durante o bioprocessamento (LV, 2020).

2.5 UTILIZAÇÃO DE GLICERINA LOIRA E MILHOCINA

O reuso de subprodutos industriais é uma necessidade inescapável com o avanço tecnológico industrial e a conscientização dos problemas ambientais que conseqüentemente podem ser gerados. A preocupação com o descarte indevido e a elaboração de legislações para minimizar o impacto levam a necessidade de tratamento dos efluentes, que podem acarretar num gasto energético e financeiro alto. Em outro sentido, a busca pela economia circular também é de interesse econômico buscando baratear o processo com fontes alternativas e que seriam descartadas para reutilização, uma vez que as substâncias do meio de cultivo representam uma boa fatia do gasto de produção na indústria biotecnológica.

A glicerina loira é o principal subproduto gerado no processo de transesterificação de óleos durante a produção do biodiesel, gerando cerca de 1 kg de glicerina loira para cada 10 kg de biodiesel produzido (KUMAR, 2019). A inclusão de biodiesel na composição do diesel é definida pela Resolução Nº 16, de 29 de Outubro de 2018 do Conselho Nacional de Política Energética, onde, a partir do ano de 2023, o diesel deve ser composto por 12% de biodiesel. A composição da glicerina loira varia dependendo do óleo de origem utilizado na transesterificação, mas geralmente é majoritariamente composto por volta de 60-80% de glicerol, com triacilgliceróis (TAGs), sais, proteínas e água sendo os outros componentes de maior expressão. Devido ao alto teor de glicerol, a glicerina loira já é descrita como um substituto de fontes de carbono de baixo custo para a produção de diversos produtos sintetizados por uma variedade de microrganismos. Alguns destes produtos são: etanol (BAUTISTA, 2023), lipídeos (KUMAR, 2019; DE SOUZA, 2020), ácido cítrico (PAPANIKOLAOU, 2002), ácido succínico (BLANKSCHEIN, 2010; YUZBASHEV, 2010), eritritol (DA SILVA, 2018).

A milhocina (em inglês, *Corn Steep Liquor* (CSL)) é o principal subproduto gerado na moagem úmida do milho, cuja colheita mundial passa de 1 bilhão de toneladas anualmente, representando cerca de 35% da produção de grãos global (ZHOU, 2022). Apesar do principal grão de origem brasileira ser a soja, o Brasil representou na safra de 2020/21 cerca de 87 milhões de toneladas de milho, sendo 7,7% da produção global (DERAL-PR, 2021). A milhocina tem uma composição bastante complexa e que varia com o tipo e safra do milho, mas geralmente possui um alto teor de aminoácidos, açúcares e também de micronutrientes, como vitaminas (KIM, 2022). A milhocina também é composta por muitos sulfetos e tem um alto teor ácido, tornando descarte imediato custoso em água ao gerar o efluente e potencialmente ser muito danoso ao meio ambiente (ZHOU, 2022). Devido a complexidade e

vasta disponibilidade de nutrientes da milhocina, assim como para glicerina loira, sua utilização como componente para meios de cultivo como substituto de reagentes de alto valor agregado já é divulgada. Trabalhos que envolvem a produção de álcoois (MADDIPATI, 2011; CHOI, 2013), biossurfactantes (ALMEIDA, 2015, DE SOUZA, 2020), uso como bioestimulante (OBAYORI, 2010).

A utilização da combinação glicerina loira/milhocina pode ter um impacto ainda maior na diminuição de custos e reutilização de subprodutos industriais, unindo a fonte de carbono oriunda da glicerina com a variedade de nutrientes e fonte proteica da milhocina. Essa combinação ainda não foi muito explorada, mas já existem trabalhos que utilizam esses compostos na formulação do meio de cultivo, para a produção de 1,3-propanodiol por *Clostridium beijerinckii* (WISCHRAL, 2016) de carotenoides, como o licopeno por *Deinococcus radiodurans* (KANG, 2020) e β -caroteno por *Y. lipolytica* (DE SOUZA, 2020), sendo este último estudo o que originou este trabalho de conclusão de curso.

3 OBJETIVOS

Este Trabalho de Conclusão de Curso teve como objetivos:

- Caracterizar os valores de k_La em diferentes combinações aeração/agitação;
- Verificar a influência de k_La inicial na produção de β -caroteno.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Os materiais utilizados para a composição dos meios foram: extrato de lêvedo (*Sigma*), peptona (*Oxoid*), Glicerol (*Isofar*), Agar-agar (*Sigma*), complexo YNB (*Sigma*), milhocina (cedido pela *Ingredion*) e Glicerina Loira (cedido pela *BS Bio*).

Os demais compostos utilizados nas análises foram: Na_2CO_3 (*Isofar*), acetato de etila (*Vetec*), β -caroteno (*Sigma*), CuSO_4 (*Vetec*), NaOH (*Synth*), H_2SO_4 (*Synth*), acetonitrila (*Sigma*) e *Antifoam 204* (*Sigma*).

4.2 EQUIPAMENTOS

Os equipamentos que utilizados no trabalho foram: centrífuga (*Eppendorf* modelo *5804R*), espectrofotômetro (*Spectramax M2^e*), aparelhos de HPLC (*Shimadzu* modelos LC-20 e LC-40), incubadoras orbitais (*Tecnal* TE-420), reômetro rotativo (*TA Instruments* modelo AR-G2), biorreator de bancada (*Infors* Multifors). Os parâmetros utilizados e razões de interesse do biorreator se encontram nas Tabelas 4.1 e 4.2.

Tabela 4.1 - Parâmetros utilizados no biorreator

Parâmetro	Símbolo	Comprimento (mm)
Diâmetro impelidor	d	30
Diâmetro eletrodo O₂	d'	12
Diâmetro biorreator	T	70
Altura biorreator	H	195
Distância impelidores	h ₁	35
Distância impelidor inf. ao fundo do biorreator	h ₂	55
Comprimento pás impelidor	l	8
Comprimento de imersão eletrodo O₂	l'	60
Comprimento chicana	s	9
Altura lâmina impelidor	w	8

Fonte: elaboração própria.

Tabela 4.2 - Razões de interesse entre parâmetros e dimensões do biorreator

Razão	Valor Razão
d/T	0,43
H/T	2,79
w/d	0,27
l/d	0,27
h₁/d	1,17
h₂/d	1,83
s/d	0,30
d'/d	0,40
l'/d	2,00

Fonte: elaboração própria.

4.3 MICRORGANISMOS

O clone de *Y. lipolytica* utilizado no trabalho foi o transformante denominado CRP23 (DE SOUZA, 2020), que foi construído a partir da cepa IMUFRJ 50682 isolada da Baía de Guanabara, Rio de Janeiro (HAGLER & MENDONÇA-HAGLER, 1981). Este clone teve o gene *URA3* deletado como marca de auxotrofia, e a integração dos genes *CarB* e *CarRP*, do fungo filamentososo *Mucor circinelloides*, e do gene *GGSI*, de *Y. lipolytica*, obtido no INRAE (*Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement*), na França, em parceria prévia com o Dr. Jean-Marc Nicaud.

4.4 CULTIVOS

Foram utilizados três meios de cultivo:

- *Yeast Nitrogen Base* (YNB) sólido: padrão YNB 1% (m/v), glicose 1% (m/v), NH_4Cl 1% (m/v), ágar-ágar 0,5% (m/v), como meio de conservação de células;
- *Yeast Peptone Glycerol* (YPG): extrato de levedo 1% (m/v), peptona 2% (m/v), glicerol 2% (m/v), como pré-inóculo;
- MM30 (DE SOUZA, 2020): glicerina loira 42,17 g.L⁻¹, milhocina 15 g.L⁻¹, como meio para a fermentação.

O meio MM30 apresentou um alto grau de sólidos suspensos. Com isto, foi necessário realizar uma filtração simples para remoção dos sólidos antes de realizar sua esterilização. O meio YNB foi esterilizado através de filtração com filtros de 0,22 μm . Os meios YPG e MM30 foram esterilizados através de autoclavação à 121°C, 1 atm por 15 minutos.

Durante os estudos, verificou-se a necessidade de adição de antiespumante durante as fermentações. Assim, o meio MM30 teve a adição em 0,03 % (m/v) de *Antifoam 204*.

Uma alíquota de células de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 CRP23 foi inoculada em meio YNB sólido, mantendo o cultivo à 28 °C por 72 h. Após o crescimento das células, o meio foi armazenado a 4 °C para estocagem das células. Após isso, foi retirada uma colônia de células que foi cultivada em um pré-inóculo em frasco agitado de 125 mL com 25 mL de meio YPG, permanecendo por 72 h à 28 °C, 160 RPM. Em seguida, uma alíquota foi retirada com um volume ajustado para 0,1 de absorvância a 750 nm (DE SOUZA, 2020) em 500 mL de meio MM30 no biorreator de bancada. Foram utilizadas duas combinações agitação/aeração, selecionadas arbitrariamente, para os cultivos:

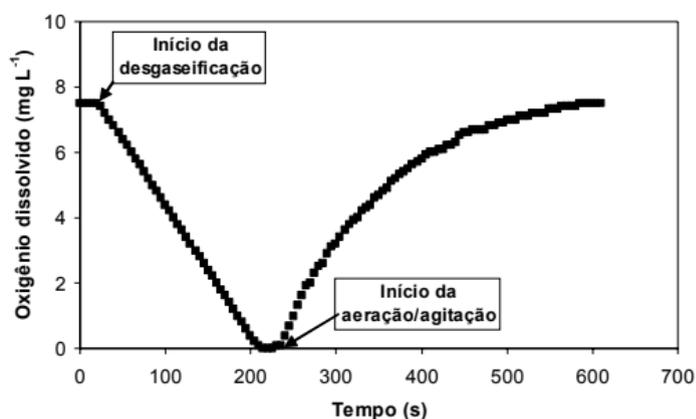
- a) 400 RPM, 0,5 L.min⁻¹ (1 vvm) de ar comprimido;
- b) 600 RPM, 0,75 L.min⁻¹ (1,5 vvm) de ar comprimido.

Para ambas as condições, além da vazão de ar comprimido e da velocidade de rotação, somente a temperatura foi controlada, em 28 °C, havendo apenas monitoramento da pressão parcial de oxigênio (pO₂) e do pH. Os cultivos foram mantidos até que o valor de pO₂ ultrapassasse a faixa de 80% de saturação.

4.5 ANÁLISE DO COEFICIENTE GLOBAL DE TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO

Para a obtenção dos valores de k_La inicial, utilizou-se o método da degaseificação. Este método consiste na purga de O₂ solubilizado nos meios através do borbulhamento de N₂, até a leitura de pO₂ chegar a 0%. Em seguida, o meio foi aerado com ar comprimido até atingir a saturação de O₂ dissolvido, compilando os valores de pO₂ em intervalos de tempo observados. Este processo é ilustrado pela Figura 4.1.

Figura 4.1 - Gráfico tempo x O₂ dissolvido durante o método da degaseificação



Fonte: Amaral (2007)

A partir da Equação 2.10, integram-se os dois lados da mesma e, ao reorganizá-la, obtém-se a Equação 4.3, que associa a razão C_L/C_L^* , que é a concentração de oxigênio dissolvido em relação a concentração de saturação, ou seja, pO₂, com o valor de k_La da condição estudada.

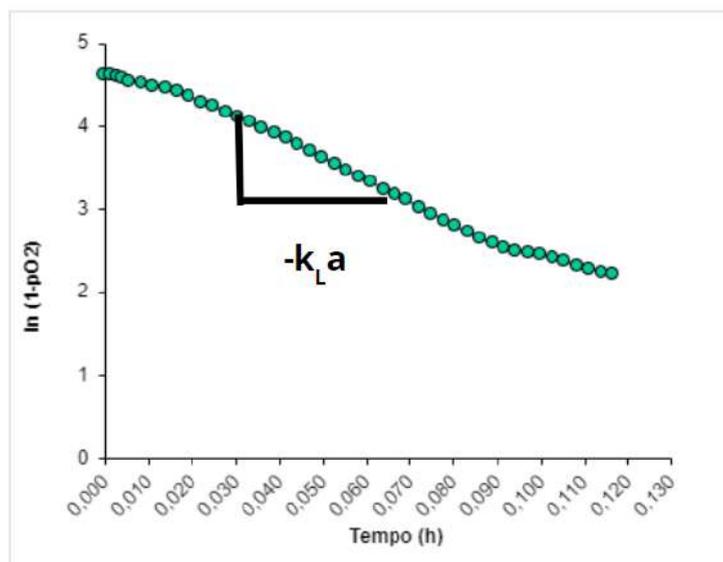
$$\int_0^{C_L} \frac{dC_L}{(C_L^* - C_L)} = \int_0^t k_L a * dt \quad (4.1)$$

$$- \ln\left(\frac{C_L^* - C_L}{C_L^*}\right) = k_L a * t \quad (4.2)$$

$$\ln\left(1 - \frac{C_L}{C_L^*}\right) = - k_L a * t \quad (4.3)$$

Por fim, plotou-se um gráfico tempo x $\ln(1-(C_L/C_L^*))$, obtendo o valor de coeficiente angular, que é igual a $-k_L a$, ilustrado pela Figura 4.2.

Figura 4.2 - Gráfico destacando que o coeficiente angular do gráfico é o valor de $-k_L a$



Fonte: elaboração própria.

Esse estudo foi feito nas agitações de 300, 400, 500 e 600 RPM, combinando com as vazões de aeração de 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0 $L \cdot \text{min}^{-1}$ de ar comprimido, correspondendo a 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 vvm, respectivamente.

A caracterização do $k_L a$ foi realizada para os meios:

- H₂O destilada;
- MM30;
- MM30 com 0,03% de antiespumante;
- MM30 com 0,3 g.L⁻¹ de células mortas.

Para os meios com células mortas, realizou-se um pré-inóculo seguindo o procedimento descrito nos meios de cultivo. No momento seguinte à inoculação em MM30, o meio inoculado foi autoclavado a 0,5 atm por 30 minutos. Retirou-se uma alíquota que foi levada a um microscópio para verificar a integridade e atividade celular, utilizando o reagente azul de metileno para confirmação.

4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.6.1 Quantificação de Crescimento Celular

Os valores de concentração de biomassa foram monitorados através do peso seco de células (DCW, do inglês *Dry Cell Weight*). Durante a fermentação, foram retiradas alíquotas de 1 mL do meio em microtubos de 2 mL previamente pesados. Levou-se estas amostras para centrifugação a 8000 RPM por 5 minutos. Retirou-se o sobrenadante, que foi armazenado para análise de glicerol e proteínas remanescentes, e o *pellet* foi levado a uma estufa a 60 °C, realizando pesagens até que o valor de massa se mantenha constante entre as pesagens.

4.6.2 Quantificação de Glicerol

Utilizando o sobrenadante obtido na centrifugação do meio de cultivo durante a quantificação de massa celular, esta amostra foi injetada em um aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High-Performance Liquid Chromatography*), utilizando uma coluna Aminex HPX-87H a 50 °C e fase móvel H₂SO₄ 5 mmol.L⁻¹ com fluxo de 0,5 mL.min⁻¹, com detecção por índice de refração (RID, do inglês *Refractive Index Detector*). As leituras obtidas foram comparadas com uma curva de calibração previamente obtida utilizando soluções com concentrações conhecidas de glicerol, que se encontra no Apêndice A.

4.6.3 Extração e Quantificação de β -caroteno

Assim como na quantificação da concentração de crescimento celular, foram retiradas alíquotas de 1 mL do meio em microtubos de 2 mL ao longo da fermentação. Estas amostras foram centrifugadas a 8000 RPM por 5 minutos, descartando o sobrenadante. Os *pellets* formados foram ressuspensos com 1,0 mL de tampão PBS (do inglês, *Phosphate-buffered saline*) pH 7,0, separando 500 μ L em dois microtubos de 2 mL, que foram centrifugados a 5000 RPM, 4 °C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e um dos microtubos foi armazenado como reserva. Ao microtubo remanescente, foram adicionados aproximadamente 500 μ L de micropérolas de vidro e 500 μ L de acetato de etila com 0,01% de butilhidroxitolueno (BHT). A figura 4.3 ilustra o procedimento de extração do β -caroteno:

Figura 4.3 - Ciclo de etapas para extração do β -caroteno



Iniciando com a adição de acetato de etila com 0,01% de BHT, seguindo para os ciclos no disruptor de células, centrifugação e retirada do sobrenadante. Caso o pellet ainda apresentasse coloração alaranjada, o ciclo era reiniciado.

Fonte: elaboração própria.

Os extratos foram analisados por HPLC utilizando como fase estacionária uma coluna Zorbax Eclipse Plus C18 a 30 °C e como fase móvel uma mistura acetato de etila/acetonitrila (3:7) com fluxo de 0,6 mL.min⁻¹, com detecção por um Detector por Arranjo de Diodos (PDA, do inglês *Photo Diode Array*). As leituras obtidas foram comparadas com uma curva

de calibração previamente obtida utilizando soluções com concentrações conhecidas de β -caroteno, que se encontra no Apêndice B.

4.6.4 Análise de Viscosidade

Para avaliar as diferenças de viscosidade entre os meios, foi feita uma rampa de taxa de cisalhamento utilizando um reômetro rotativo. Variou-se a taxa de cisalhamento de 1 a 100 s^{-1} , a uma temperatura de 28 °C, utilizando cinco valores randômicos da taxa a cada múltiplo de 10 e sua viscosidade dinâmica (μ) correspondente. Foi feita uma média dos valores para encontrar μ de cada meio. A geometria utilizada foi de cilindros concêntricos lisos. Este ensaio foi feito em parceria com o Professor Associado da Escola de Química, Márcio Nele de Souza, do grupo do laboratório EngPol (Laboratório de Engenharia de Polimerização, na COPPE-UFRJ).

Os testes foram realizados com os seguintes meios:

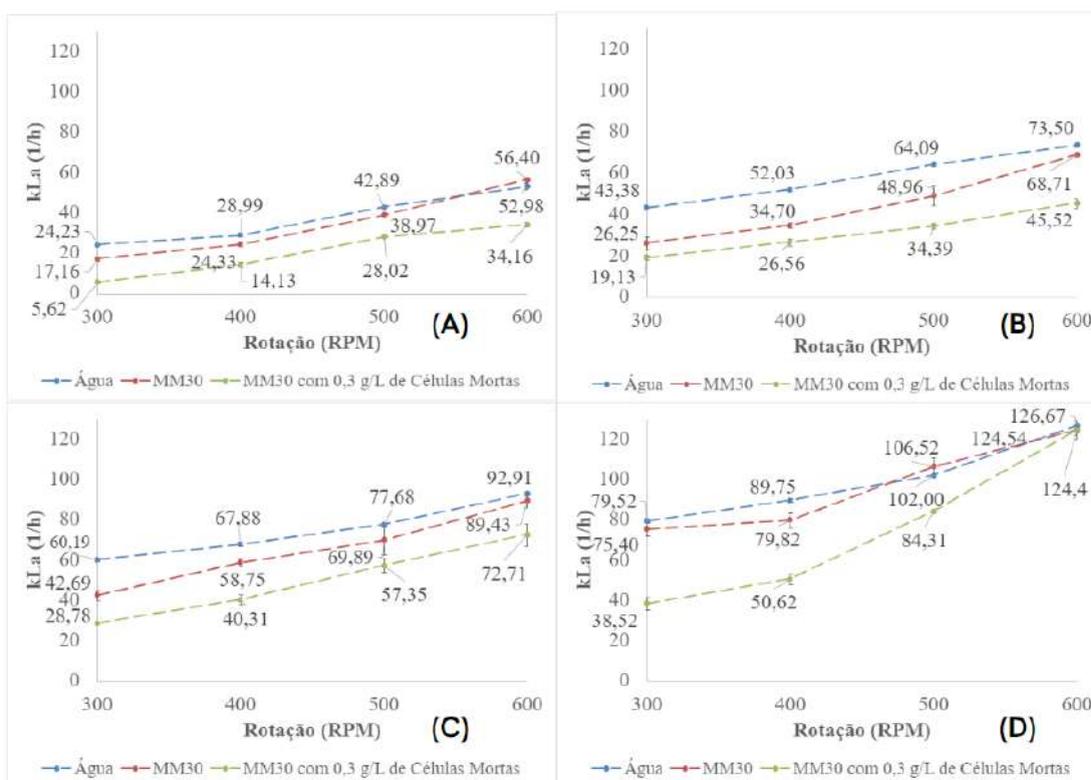
- H₂O destilada;
- MM30 sem antiespumante;
- MM30 com 0,03% de antiespumante;
- MM30 com 0,3 g.L⁻¹ de células mortas;
- MM30 com 6,3 g.L⁻¹ de células mortas.

5 RESULTADOS

5.1 ESTUDO DE $K_{L,A}$

A Figura 5.1 ilustra os resultados observados para a variação dos valores de $k_{L,A}$ nas diversas combinações aeração/agitação. Observa-se que os coeficientes globais de transferência de oxigênio dissolvido apresentam maiores valores nas condições de maior agitação e aeração, sendo os maiores valores de $k_{L,A}$ em torno de 125 h^{-1} , obtidos em todos os sistemas a 600 RPM , 2 vvm . Esses valores de $k_{L,A}$ mostraram um comportamento esperado, pois quando ocorre um aumento da agitação, há um aumento da quebra de bolhas, diminuindo a razão área/volume. Em conjunto com um aumento da turbulência do meio, isso possibilita uma melhor transferência de massa e homogeneidade. Para a aeração, seu aumento dará uma maior disponibilidade de O_2 a ser transferido ao meio, atingindo a concentração de saturação do gás mais rapidamente, com os valores de $k_{L,A}$ também aumentando por consequência.

Figura 5.1 - Distribuição dos valores de $k_{L,A}$ (h^{-1}) em água, MM30 e MM30 com $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ de células mortas com a variação da rotação (RPM): (A) $0,5 \text{ vvm}$; (B) 1 vvm ; (C) $1,5 \text{ vvm}$; (D) 2 vvm



Fonte: elaboraco própria.

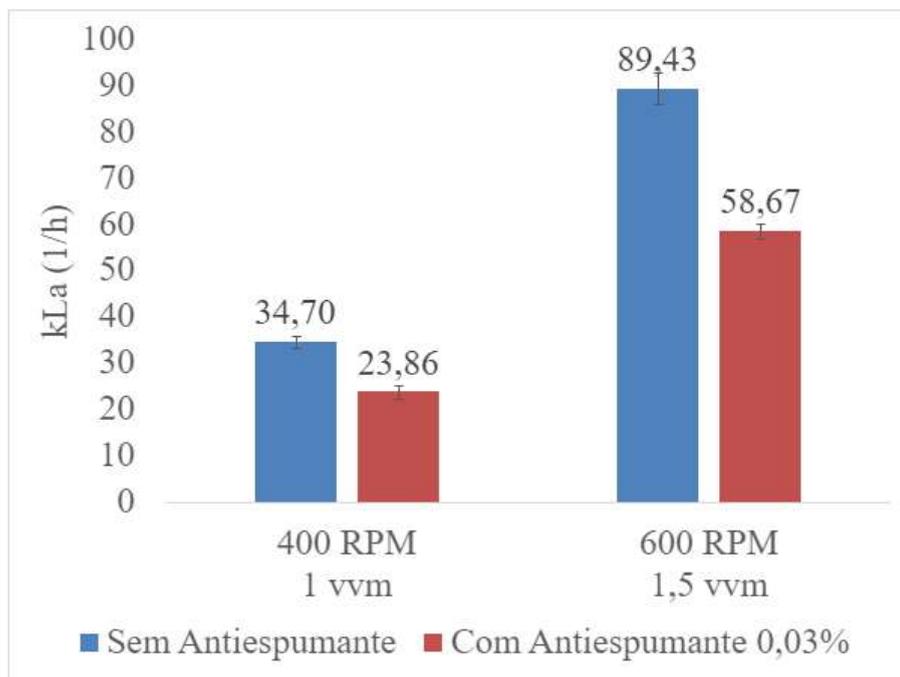
Além disso, existe uma redução da transferência de O_2 conforme se aumenta a complexidade de solutos dos meios estudados, com os maiores valores sendo obtidos, em sua maioria, com H_2O destilada, e os menores valores para o meio MM30 com células mortas. Essa tendência também foi dentro do esperado, pois mesmo com as células mortas, mas ainda preservadas, causam uma perturbação e o bloqueio em partes da superfície das bolhas, afetando a transferência de massa e, por conseguinte, o $k_L a$.

O meio MM30 sem células apresentou resultados intermediários, e em certos pontos com valores de $k_L a$ equivalentes aos valores relativos à H_2O destilada, com essa tendência destacada na condição de 2 vvm. Esse comportamento demonstrou a influência da adição de solutos ao meio para a transferência de massa de O_2 . Ainda, no maior valor da combinação aeração/agitação (600 RPM, 2 vvm) os valores de $k_L a$ são idênticas, independente do meio estudado, provavelmente atribuído à maior turbulência e disponibilidade de O_2 se sobressaindo às forças que dificultam a solubilização do mesmo nos meios.

O intuito de realizar o estudo com células mortas, mas tentando preservar a integridade da estrutura celular, é deixar o meio o mais próximo possível do momento inicial de fermentação. Pois, como mencionado anteriormente e comprovado com os resultados, as células têm grande influência na transferência de massa de O_2 . A esterilização é uma garantia para que os microrganismos não causem modificações na reologia do meio entre as variações das condições durante o estudo. Pois, como se demandam horas de trabalho para o estudo em todas as condições, as células com esse intervalo de tempo em um meio de cultivo com aeração e agitação cresceriam. O que causaria uma mudança nas condições do meio e concentração celular, levando a diferentes valores de $k_L a$.

Em testes iniciais para a fermentação, observou-se que ocorria formação excessiva de bolhas no meio, inviabilizando o processo sem a adição de antiespumante. Com isso, realizou-se um estudo de $k_L a$ do meio MM30 com antiespumante a uma concentração de 0,03% (m/v) em duas combinações agitação/aeração nas quais seriam utilizadas para o estudo do bioprocessamento (400 RPM 1 vvm e 600 RPM 1,5 vvm) para avaliar a influência que este fator teria para a transferência de massa. A Figura 5.2 demonstra que a adição de antiespumante causou uma redução de aproximadamente 30 % nos valores de $k_L a$ em ambas as condições, passando de $34,70 \pm 1,31 \text{ h}^{-1}$ para $23,86 \pm 1,50 \text{ h}^{-1}$ em 400 RPM 1 vvm, e de $89,43 \pm 3,28 \text{ h}^{-1}$ para $58,67 \pm 1,65 \text{ h}^{-1}$ em 600 RPM 1,5 vvm.

Figura 5.2 - Gráfico comparativo entre os valores de k_La (h^{-1}) no meio MM30 nas condições de 400 RPM 1 vvm e 600 RPM 1,5 vvm com e sem adição de antiespumante a uma concentração de 0,03%



Fonte: elaboração própria.

Essa redução pode ser atribuída ao maior fator de coalescência causado pelo antiespumante nesta concentração, ocasionando uma diminuição da razão área/volume em bolhas maiores comparadas a bolhas de menor diâmetro. Como a utilização de antiespumante se mostra indispensável para o processo, um estudo válido para o futuro é a otimização da concentração de antiespumante, pois em concentrações mais altas o fator de influência no k_L se sobressai, afetando menos a transferência de O_2 , mas tendo um aumento de gastos para sua utilização. No lado contrário, em menor concentração, o antiespumante terá uma menor influência no k_La ; contudo, em concentrações mais baixas, existe a possibilidade da espuma voltar a inviabilizar o processo.

A fim de avaliar a variação de viscosidade e sua possível influência para a transferência de massa entre as diferentes condições dos meios e em diferentes concentrações de célula, realizou-se um teste comparativo, ilustrado pela Tabela 5.1. As diferentes condições estudadas são relativas à influência do meio MM30, do antiespumante, e das células em concentrações inicial ($0,3 \text{ g.L}^{-1}$) e em uma concentração arbitrária durante a fermentação ($6,3 \text{ g.L}^{-1}$).

Tabela 5.1 - Valores de viscosidade relativos a cada sistema estudado a 28 °C

Meio	Viscosidade (Pa.s)
H ₂ O	$6,57 \times 10^{-4} \pm 2,55 \times 10^{-5}$
MM30 sem antiespumante	$7,48 \times 10^{-4} \pm 3,44 \times 10^{-5}$
MM30 com antiespumante	$7,26 \times 10^{-4} \pm 4,19 \times 10^{-5}$
MM30 com 0,3 g.L ⁻¹ de célula	$7,23 \times 10^{-4} \pm 7,05 \times 10^{-5}$
MM30 com 6,3 g.L ⁻¹ de célula	$7,40 \times 10^{-4} \pm 3,41 \times 10^{-5}$

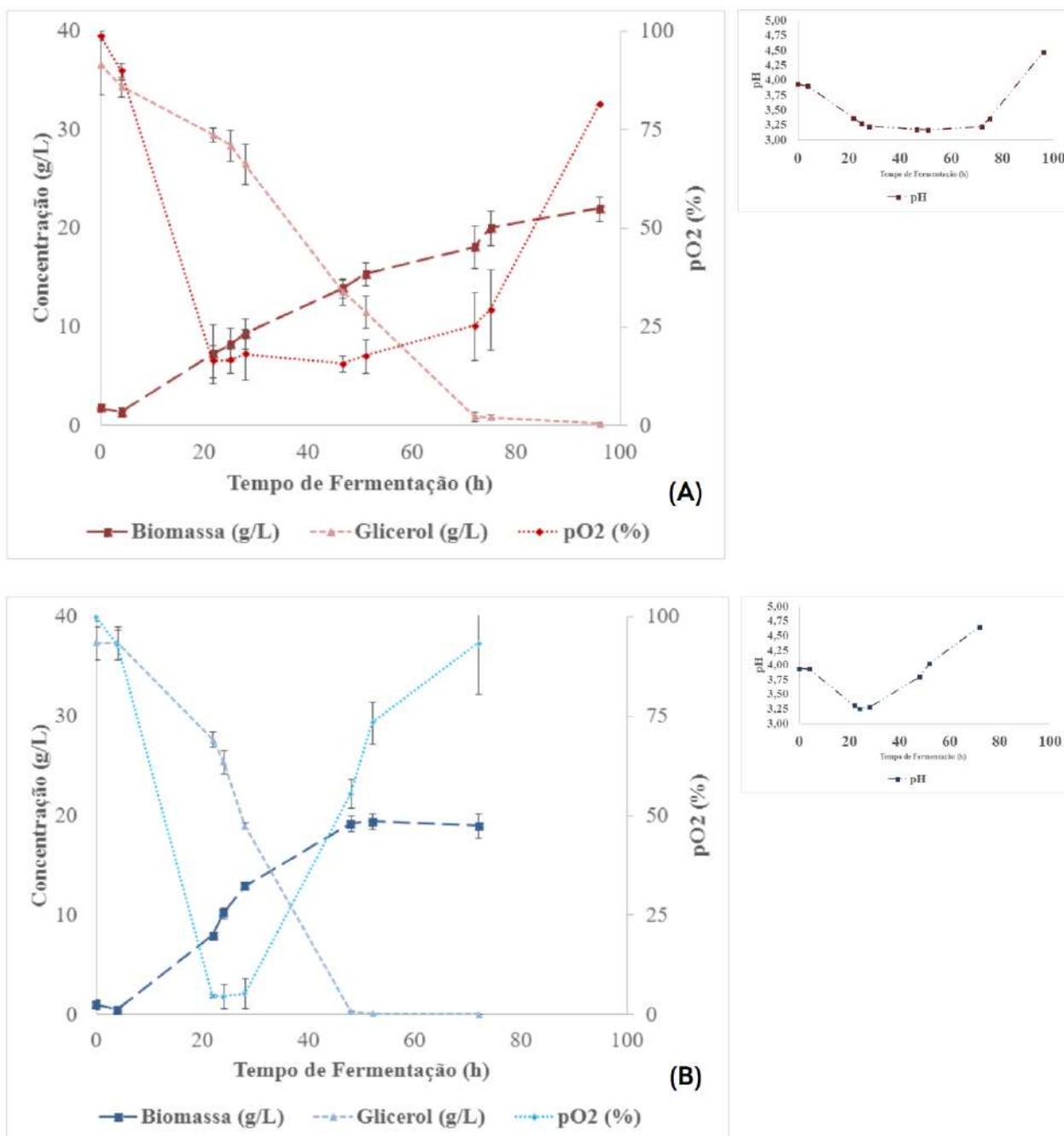
Fonte: elaboração própria.

Comparando os valores de viscosidade, a viscosidade da H₂O destilada se apresentou menor do que os valores relativos aos meios estudados, o que pode ser um dos fatores que leva aos valores maiores de $k_L a$ observados. Realizou-se um teste t , e foi comprovado que a viscosidade da água é considerada estatisticamente diferente, portanto, menor que os valores das variações de meio MM30. Entre as diferentes amostras de meio MM30, os valores de viscosidade foram similares, comprovados por um teste t , mesmo com adição de antiespumante ou com diferentes concentrações de célula. Esse comportamento indica que a viscosidade não pode ser atribuída como um fator de influência nos diferentes valores de $k_L a$ entre os sistemas estudados, sendo o rompimento das células e o efeito do antiespumante, fenômenos com maior peso para o estudo.

5.2 PRODUÇÃO DE β -CAROTENO

Em termos de crescimento celular, a Figura 5.3 ilustra que a condição de maior combinação aeração/agitação, ou seja, maior $k_L a$ (600 RPM e 1,5 vvm), apresentou o valor mais elevado de concentração máxima de biomassa (X_{Max}) igual a $19,35 \pm 0,78$ g.L⁻¹ em 52 h, enquanto em um menor $k_L a$ (400 RPM e 1 vvm) este valor (X_{Max}) foi de $21,95 \pm 1,20$ g.L⁻¹ em 96 h de cultivo. Através de um teste estatístico t , a diferença entre estes valores foram considerada estatisticamente significativa. Ou seja, um menor $k_L a$ retornou um maior X_{Max} . Já em termos de substrato (S), ambas as condições consumiram totalmente o glicerol, com a condição de 600 RPM 1,5 vvm atingindo o consumo total em 48 h, e a condição de 400 RPM 1 vvm em 72 h. Observa-se que a condição de 600 RPM e 1,5 vvm teve uma maior valores absolutos de taxa de consumo de S (dS/dt) e taxa de crescimento de X (dX/dt). Porém, as células conseguiram atingir um valor de X_{Max} maior na condição de menor $k_L a$.

Figura 5.3 - Produção de biomassa, concentração de glicerol e evoluções de pO₂ e pH durante o processo fermentativo em: (A) 400 RPM e 1 vvm; (B) 600 RPM e 1,5 vvm



Fonte: elaboração própria.

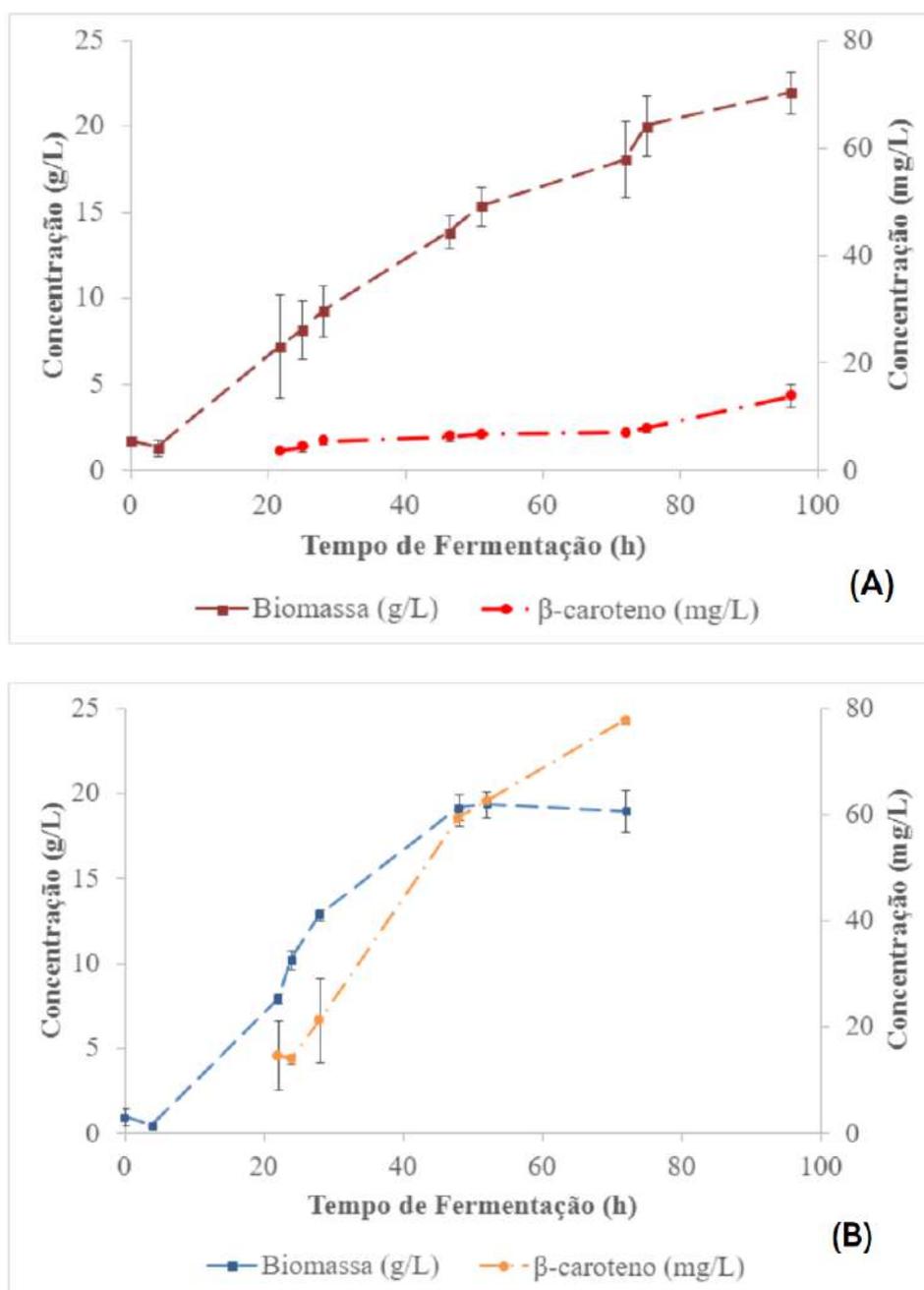
Ademais, é possível observar que o comportamento de pO₂ para a condição de 600 RPM e 1,5 vvm atinge um valor mínimo de pO₂ menor do que em 400 RPM e 1 vvm, com $4,45 \pm 3,04$ % em 24 h e $15,57 \pm 1,99$ % em 48 h, respectivamente. As fases de crescimento e sua relação com o consumo de O₂ ficam evidenciadas, com as células passando pela fase

exponencial durante os valores mínimos de pO_2 , e conforme o crescimento atinge um platô, a concentração de O_2 solubilizado aumenta. Esta combinação de fatores indica que as células diminuíram a atividade aeróbica, ou seja, entraram em fase estacionária. Os valores mínimos de pO_2 serem menores a 600 RPM e 1,5 vvm fazem sentido, pois dX/dt e dS/dt são maiores. Isso é indicado pelos maiores alicive na curva de crescimento e declive na curva de substrato para o maior valor de $k_L a$ inicial, na faixa de 24 h de tempo de fermentação. Em outras palavras, era esperado que a TCO fosse maior, pois nessa condição tanto o crescimento celular quanto o consumo de substrato se dão de maneira mais rápida.

Os valores de pH acompanharam a tendência de pO_2 , sendo mais ácidos durante a fase exponencial e gradualmente se tornando mais alcalinos conforme as células atingiam a fase estacionária. Em outras palavras, os valores de pH começaram a ficar mais altos após o consumo total da fonte de carbono. Esse comportamento também foi observado na literatura (SILVA, 2012; EGERMEIER, 2017; OTERO, 2019; DE SOUZA, 2020), com outras espécies naturalmente carotenogênicas e com *Y. lipolytica*, e parece estar associado com utilização de metabólitos após o esgotamento de glicerol.

Para a produção de β -caroteno, ilustrada pela Figura 5.4, a condição de 400 RPM e 1 vvm levou a um valor de concentração máxima de β -caroteno (P_{Max}) igual a $13,80 \pm 2,10$ $mg.L^{-1}$ em 96 h, enquanto que em 600 RPM e 1,5 vvm, este valor foi de $77,73 \pm 0,66$ $mg.L^{-1}$ em 72 h. Os valores de β -caroteno iniciam a partir de 24 h pois em tempos anteriores as respostas do método de quantificação foram menores que o mínimo detectável. Em ambas as condições o β -caroteno demonstrou ser um produto associado ao crescimento celular. Isto é, a taxa de produção do produto acompanha o aumento de X, comportamento também descrito na literatura (GAO, 2017; LARROUDE 2018). Em termos de transferência de O_2 , os resultados demonstraram que um maior valor de $k_L a$ inicial levou a uma maior produção de β -caroteno. Este fenômeno pode ser atribuído à rota de síntese do β -caroteno, que requer o uso de $NADP^+/NADPH$ (na transformação de HMG-CoA em MVA) e ATP (nas reações de MVA a IPP). E estas moléculas são regeneradas através da via das pentoses e da respiração celular, respectivamente. E ambas as vias são reguladas por uma maior presença de O_2 no meio. Desse modo, uma configuração que permitiu um maior $k_L a$ inicial levou ao fornecimento de oxigênio dissolvido para regeneração das substâncias participantes da rota e produção do β -caroteno.

Figura 5.4 - Produção de biomassa e β -caroteno* durante o processo fermentativo nas condições: (A) 400 RPM e 1 vvm; (B) 600 RPM e 1,5 vvm



*Os valores de β -caroteno iniciam a partir de 24 h pois em tempos menores de fermentação não foi possível realizar sua detecção

Fonte: elaboração própria.

Deve-se lembrar, no entanto, que os valores de $k_L a$ variam conforme ocorre a fermentação, por diversos fatores, como aumento de TCO e efeito de adsorção pela membrana celular com o aumento de biomassa, modificação da reologia do meio com o consumo de seus componentes durante o metabolismo celular e formação de metabólitos. Nesse contexto, com o aumento da disponibilidade de O_2 dissolvido quando as células começam a atingir a fase

estacionária, a produção de β -caroteno ainda pode estar ativa e a concentração no meio ainda continuar subindo mesmo com o X atingindo um platô. Esse fenômeno pode ser observado ainda na Figura 5.4 com a concentração de β -caroteno ainda crescente após as células atingirem a fase estacionária de crescimento em ambas as condições. Sendo uma levedura oleaginosa, a *Y. lipolytica* é capaz de utilizar seus lipídeos acumulados como fonte de carbono após o esgotamento de glicerol no meio. Isso possibilita a rota carotenogênica nessa condição e, conseqüentemente, o aumento da concentração de β -caroteno após S ser totalmente consumido. Logo, é provável que os cultivos poderiam ter continuado além do critério de parada assim que atingisse a fase estacionária.

Através da tabela 5.2, conclui-se que o $k_L a$ inicial relativo a condição de 600 RPM e 1,5 vvm apresentou resultados significativamente melhores que em 400 RPM e 1 vvm, alcançando uma concentração de produto no meio aproximadamente 5,9 vezes maior. Também para os parâmetros de rendimento de β -caroteno por substrato consumido ($Y_{P/S}$), rendimento de β -caroteno por massa de célula ($Y_{P/X}$) e produtividade de produto, houve um aumento em 6,5; 5,4 e 7,9 vezes, respectivamente. O consumo de substrato também foi maior para a condição de maior TTO, explicitado pelos valores de taxa de consumo de substrato (Q_S) no tempo de 48 h e no tempo final de fermentação (72 h para 600 RPM e 1,5 vvm; 96 h para 400 RPM e 1 vvm). No que tange a biomassa, as duas condições apresentaram valores próximos nos parâmetros de produtividade e rendimento de células por substrato consumido ($Y_{X/S}$), podendo ser atribuídos ao maior valor de X_{Max} a 400 RPM e 1 vvm com seu menor estresse oxidativo pela menor TTO.

Tabela 5.2 - Comparativo entre produtividades, rendimentos de biomassa e produto, e taxas de consumo de substrato entre as condições de cultivo estudadas

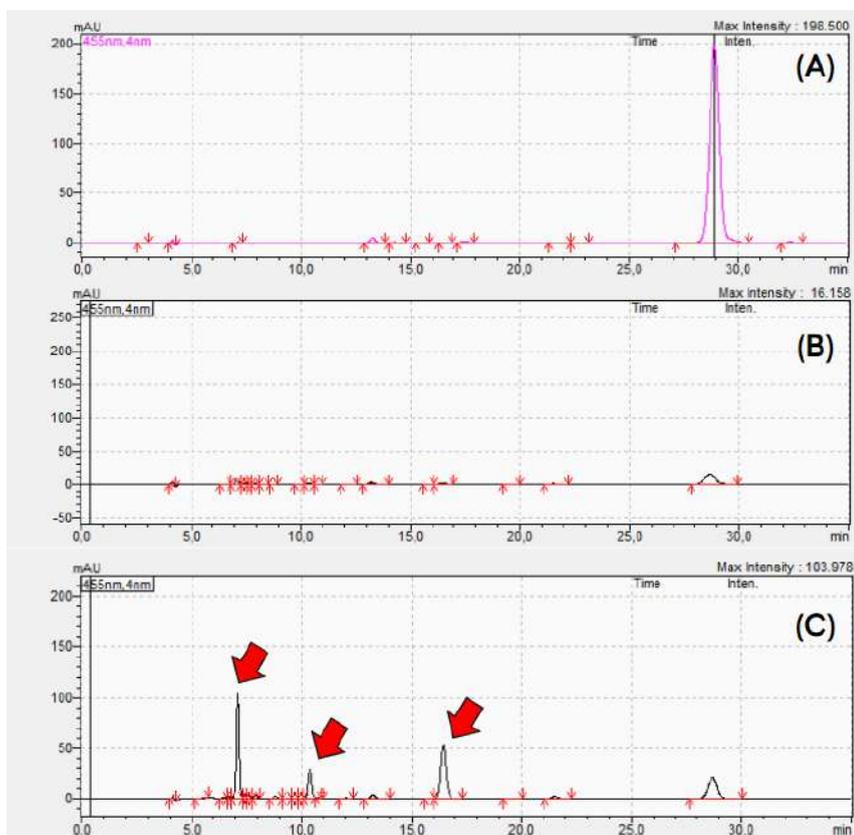
Condição	Produtividade X (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	$Y_{X/S}$ *	Produtividade P (mg.L ⁻¹ .h ⁻¹)	$Y_{P/S}$ *	$Y_{P/X}$ *	Q_S 48 h (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Q_S Final (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
400 RPM 1 vvm	0,23	0,60	0,14	0,37	0,63	0,77	0,52
600 RPM 1,5 vvm	0,26	0,52	1,11	2,08	4,10	0,49	0,38

*Em base mássica

Fonte: elaboração própria.

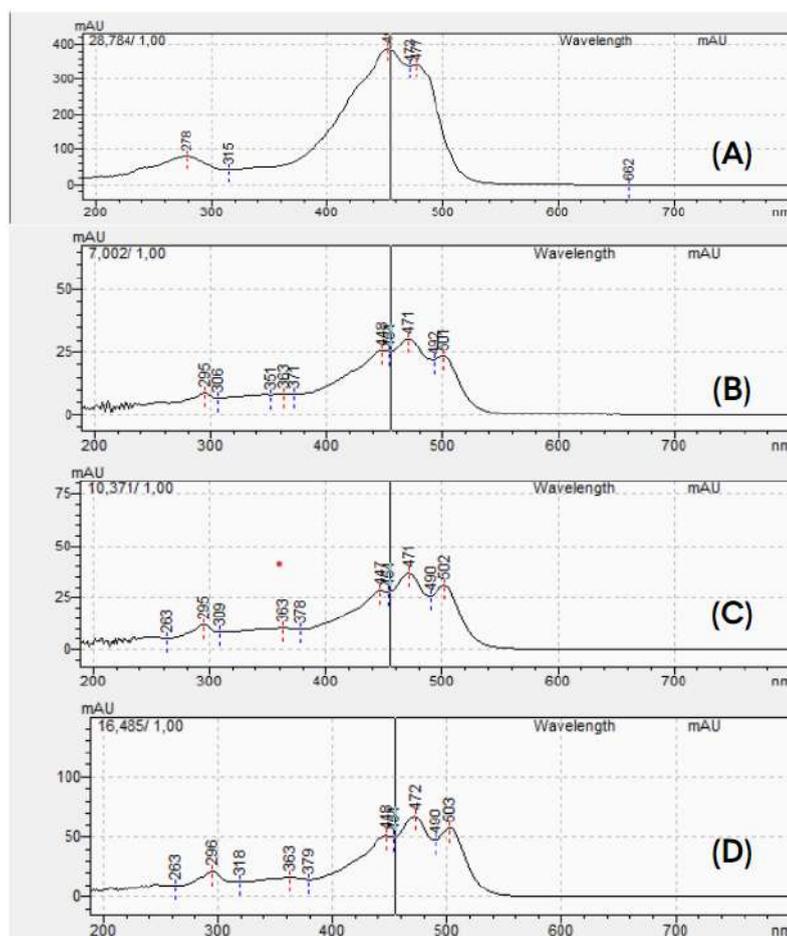
Durante as análises da produção de β -caroteno, observou-se um fenômeno que vale ser destacado. Observando a Figura 5.5, percebe-se uma diferença de produtos gerados entre as duas condições nos cromatogramas: a 600 RPM e 1,5 vvm é produzido majoritariamente β -caroteno, caracterizado pelo pico em aproximadamente 27,5 min e absorvância 455 nm com o método utilizado. A mesma produção também ocorreu a 400 RPM e 1 vvm, como pode ser visto pelo sinal observado no mesmo tempo de retenção, porém em menor intensidade. Contudo, entre os tempos de 72 e 96 h de fermentação, na condição de 400 RPM e 1 vvm outros sinais começaram a aparecer em intensidade que se sobressaíram ao do β -caroteno, indicando a possível produção de outros compostos durante este intervalo da fermentação. Estes picos foram observados em tempos aproximados de 7, 10 e 16 min durante a análise por HPLC, destacados no item (C) da Figura 5.5. Em um estudo mais aprofundado através dos espectros de absorvância gerados por esses picos, ilustrado pela Figura 5.6, nota-se que os três apresentam perfis idênticos, variando apenas na intensidade, com picos de absorvância aproximadamente em 448, 471 e 502 nm. Esse perfil difere do padrão de β -caroteno, com comprimento de absorvância máximo em 453 nm.

Figura 5.5 - Cromatogramas obtidos durante a análise por HPLC para quantificação de β -caroteno: (A) 600 RPM 1,5 vvm em 72 h; (B) 400 RPM 1 vvm 72 h; (C) 400 RPM 1 vvm 96 h



Fonte: elaboração própria.

Figura 5.6 - Espectros de absorvância obtidos para as frações destacadas na Figura 5.5 (C) e comparadas com padrão de β -caroteno: (A) β -caroteno, (B) 7 min, (C) 10 min, (D) 16 min

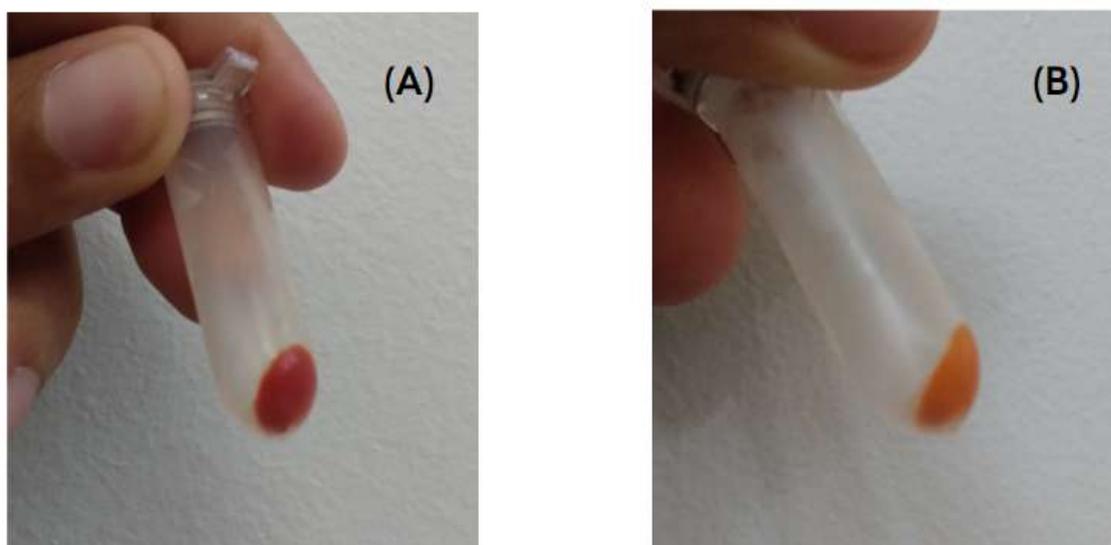


Fonte: elaboração própria.

Considerando a similaridade dos perfis de absorvância entre os compostos, pode-se assumir que sejam isômeros ou espécies com estrutura próxima. Ao procurar na literatura moléculas que poderiam estar sendo produzidas, chegou-se ao licopeno (Figura 2.1 (B)), que possui um espectro característico quando solubilizado em acetona com um triplete de picos de absorvância por volta de 446, 472 e 505 nm (BUTNARIU, 2011), sendo bastante característico quando comparado com outros carotenoides. Ademais, durante os cultivos, no intervalo de tempo de 72 para 96 h, o meio assim como os pellets obtidos passaram de uma coloração alaranjada para um tom mais avermelhado, cores características do β -caroteno e do licopeno, respectivamente. Esta diferença de coloração é ilustrada pela Figura 5.7. Por fim, observando a rota de biossíntese do β -caroteno (Figura 2.2), o licopeno é o precursor imediatamente anterior. Através destes fatos, é grande a possibilidade de os compostos

observados nos cromatogramas serem o licopeno. Como mencionado, a diferença entre os tempos de retenção pode estar relacionada com diferentes isômeros do licopeno, gerado por modificações nas ligações duplas. Apesar de não ter sido possível realizar um ensaio de identificação utilizando um padrão para confirmar essa possibilidade, o potencial de desenvolver duas condições diferentes que resultam em dois produtos de interesse tecnológico diferentes revela a versatilidade do clone CRP23 e uma perspectiva de um outro projeto focando na produção de licopeno.

Figura 5.7 - Diferença de coloração entre os *pellets* obtidos nas condições: (A) 400 RPM e 1 vvm, com uma coloração avermelhada; (B) 600 RPM e 1,5 vvm, com uma coloração alaranjada



Fonte: elaboração própria.

Este fenômeno pode estar acontecendo também pela variação de TTO entre as condições estudadas. Entre 72 e 96 h de cultivo, ou seja, quando começa a atingir a fase estacionária em 400 RPM e 1 vvm, observa-se na Figura 5.3 que a subida de pO_2 é mais suave que na condição de 600 RPM e 1,5 vvm, indicando uma menor disponibilidade de O_2 . Com essa menor disponibilidade, há uma maior competição para sua utilização no maquinário celular, afetando a regeneração $NADP^+/NADPH$ e produção de ATP. Isso pode acarretar que o metabolismo de síntese do β -caroteno não seja priorizado, com a rota parando no licopeno, indicado pelos picos com um nível de intensidade consideravelmente maior que o do β -caroteno na Figura 5.6.

A Tabela 5.3 ilustra um comparativo dos valores de produção obtidos neste trabalho com outros que utilizam *Y. lipolytica* para produção de β -caroteno já com escala de biorreator de bancada, e o trabalho de de Souza et al. (2020) que foi anterior e trabalhou em frascos agitados. Observa-se que os valores deste trabalho foram consideravelmente menores, com todos os parâmetros apresentando uma redução. Isso pode ter ocorrido devido ao encerramento do cultivo antes que as células atingissem um máximo de produção β -caroteno, já que na Figura 5.4 ainda observa-se um perfil ascendente nos valores de concentração. Outra possibilidade é que na condição de 600 RPM e 1,5 vvm chegue-se a um valor de TTO prejudicial ao crescimento celular se comparado a combinações agitação/aeração menores, indicando que mais estudos para encontrar o k_L inicial ótimo são necessários. Em relação aos demais estudos na literatura, todos os clones descritos têm números de modificações em seu genoma que superam em muito o clone CPR23, sendo múltiplas inserções de genes codificantes das enzimas da via metabólica do β -caroteno ou ainda para genes que estimulam o acúmulo de lipídeos. Em outras palavras, o clone CPR23 é mais simples em termos de transformação gênica, assim sendo esperado que os resultados fossem menores.

Tabela 5.3 - Comparativo entre os parâmetros de produção de β -caroteno por *Y. lipolytica* modificada entre este Trabalho de Conclusão de Curso e outros trabalhos da literatura

Trabalho	Meio de Cultivo Utilizado	Estratégia de Transferência de O ₂ e Escala de Trabalho	Concentração de β -caroteno (mg.L ⁻¹)	Produtividade de β -caroteno (mg.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Y _{P/X} **
Este Trabalho	MM30 com 0,03% de antiespumante	Agitação/Aeração fixa Biorreator de 0,5 L	77,73	1,11	4,10
de Souza et al. (2020)	MM30	Frasco agitado de 125 mL	154,7	1,6	7,59
Gao et al. (2017)*	Glicose (2%) Peptona (2%) EL (1%)	dC _L /dt fixo Biorreator de 5 L	3968	14	-
Larroude et al. (2018)*	Glicose (1%) Peptona (1%) EL (1%)	dC _L /dt fixo Biorreator de 5 L	6500	53,27	89,6
Jacobsen et al. (2020)*	Glicose (2%) (NH ₄) ₂ SO ₄ (0,5%)	dC _L /dt fixo Biorreator de 1 L	407,96	-	20
Zhang et al. (2020)*	Glicose (4%) Peptona (4%) EL (2%)	dC _L /dt fixo Biorreator de 5 L	4500	24,85	57,5

*Trabalhos em que as transformantes utilizadas são super produtoras, ou seja, possuem múltiplas cópias de genes codificantes de enzimas da rota biossintética do β -caroteno ou de acúmulo de lipídeos.

**Em base mássica.

Fonte: elaboração própria.

Além disso, os meios utilizados pelos outros trabalhos têm composição de reagentes de alto teor de pureza, diferente do meio MM30 composto apenas de milhocina e glicerina loira. Logo, em termos econômicos, após uma etapa de otimização do processo, a utilização dos subprodutos pode compensar uma produção menor. Outro fator a se destacar são os tipos de aeração diferentes quando comparado a outros trabalhos. Neste trabalho, a TTO foi fixada, ou seja, a combinação aeração/agitação se manteve constante durante todo o cultivo. Nos trabalhos da literatura, o procedimento foi de manter a taxa dC_L/dt constante, através da programação de um pO₂ alvo para os controles do biorreator. Ou seja, os parâmetros de aeração e agitação do meio eram variáveis para se adaptar ao crescimento de TCO com o aumento da biomassa. Com essa compensação, a disponibilidade de O₂ não é tão limitante

durante o cultivo como no método de TTO fixada, permitindo uma melhor produção de β -caroteno.

Por fim, outros parâmetros de cultivo também podem ter influência no crescimento celular e na produção de β -caroteno, a exemplo do pH, que, mesmo não sendo um interferente em termos de k_La , sua variação pode ter grande peso no metabolismo das células, e conseqüentemente, na produção de β -caroteno. Outro fator importante e que comprovadamente com este trabalho modifica a transferência de massa de O_2 é a presença de antiespumante. Como sua presença no meio se mostrou indispensável, vale a investigação do mínimo de concentração que maximize a produção, a fim de perturbar o mínimo possível a disponibilidade do oxigênio dissolvido e também reduzir um possível gasto de recursos.

6 CONCLUSÕES

O $k_L a$ inicial é um fator importante durante o desenvolvimento e engenharia de um bioprocesso, determinando a taxa de transferência de O_2 e, conseqüentemente, a disponibilidade do gás para ser utilizado em diversas reações pelas células. Porém, ele depende de diversos fatores como aeração, agitação, configuração do vaso reacional, composição do meio, concentração celular, uso de antiespumante, entre outros. Em situações de baixa combinação aeração/agitação, observou-se que a influência da composição do meio, e em especial, a presença de células para a TTO é grande, sendo indispensável ser levado em conta durante o desenvolvimento do bioprocesso. Estes efeitos, contudo, são minimizados em situações de alta combinação aeração/agitação. A adição de antiespumante se mostrou necessária e sua presença na composição do meio modificou o valor de $k_L a$ inicial em cerca de 30% para as duas condições estudadas em meio sem células, tendo influência na disponibilidade de O_2 mesmo no maior valor de $k_L a$. Para otimização da produção, torna-se necessário futuramente um estudo do $k_L a$ com células mortas na concentração de antiespumante utilizada de 0,03% e também variando sua concentração, a fim de minimizar a perda de TTO aliado a prevenção de problemas relacionados à formação de espuma.

O $k_L a$ inicial mostrou realmente ter influência na produção de β -caroteno pela levedura *Y. lipolytica*, pois na condição de maior TTO (600 RPM e 1,5 vvm) a produção atingiu $77,73 \pm 0,66 \text{ mg.L}^{-1}$, comparado com $13,80 \pm 2,10 \text{ mg.L}^{-1}$ a uma menor TTO (400 RPM e 1 vvm). Esta diferença pode se tornar maior com uma extensão do tempo de fermentação, já que existe uma tendência de acúmulo de β -caroteno mesmo depois das células atingirem a fase estacionária, sendo um aspecto a ser avaliado para a continuidade do projeto. Mais importante é a investigação da influência de outras combinações aeração/agitação, pois o maior $k_L a$ inicial estudado pode ter sido prejudicial à produção em comparação a valores ligeiramente menores.

Mesmo com uma menor produção de β -caroteno, observou-se que a linhagem CRP23 tem o potencial de se tornar uma fábrica celular não somente do carotenoide em destaque, mas também do licopeno, com a suspeita de um deslocamento para sua síntese em condições de $k_L a$ inicial menor. É animador ter a possibilidade de usar um mesmo clone para a produção de dois compostos de interesse biotecnológico, bastando apenas modificar as condições de aeração/agitação.

Em comparação com os resultados da literatura descritos em frascos agitados e em outros tipos de biorreatores de bancada, a produção se mostrou menor. Isso mostra que as

condições ainda não foram otimizadas para essa escala e, mais uma vez, o tempo de reação pode ser ajustado. Entretanto, o clone CRP23 não possui tantas cópias exógenas em seu genoma em comparação com as cepas de alta produção de β -caroteno da literatura. Além disso, os cultivos utilizados eram em batelada alimentada ou em DO-stat, condições com mais controle do crescimento celular do que em uma batelada simples como deste trabalho, sendo uma possibilidade de adoção para futuros estudos. Por último, o projeto se utiliza de subprodutos industriais, que certamente barateiam o processo e tem um escopo de produção em larga escala melhor do que em relação aos comparativos da literatura, que usam meios complexos e com reagentes purificados.

7 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, F.C.G., SILVA, T.A.L., GARRARD, I., SARUBBO, L.A., CAMPOS-TAKAKI, G. M., & TAMBOURGI, E. B.. Optimization and evaluation of biosurfactant produced by *Pantoea* sp. using pineapple peel residue, vegetable fat and corn steep liquor. **Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, v. 9, p. 269–279, 2015.

AMARAL, PRISCILLA F. FONSECA. **Produção de lipase de *Yarrowia lipolytica* em biorreator multifásico**, 2007. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

BAGY, M. M. K.; ABD-ALLA, M. H.; NAFADY, N. A.; MORSY, F. M.; MAHMOUD, G. A. E. Bioconversion of plant wastes to β -carotene by *Rhodotorula glutinis* KU550702. **European Journal of Biological Research**, v. 6, n. 4, p. 226-241, 2016.

BARROS, P.D.S. et al. Subproduto Agroindustrial Milhocina Usado como uma Fonte de Indução da Produção de Proteases por *Arthrospira platensis*. **XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática**, 2016.

BAUTISTA, V. M., HERNÁNDEZ, S. C., GONZÁLEZ, L. R., AND JIMÉNEZ, L. D. *Saccharomyces cerevisiae* vs *Escherichia coli* in the valorization of crude glycerol to produce ethanol. **Bioresource Technology Reports** v. 101634, 2023.

BEOPOULOS, A.; NICAUD, J.M.; GAILLARDIN, C. An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 90, p. 1193–1206, 2011.

BEOPOULOS, A.; VERBEKE, J.; BORDES, F.; GUICHERD, M.; BRESSY, M.; MARTY, A.; NICAUD, J. M. Metabolic engineering for ricinoleic acid production in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 251–262, 2014.

Beta Carotene Market outlook 2021-2027 | **Industry Statistics**. Disponível em: <https://www.gminsights.com/industry-analysis/beta-carotene-market>. Acesso em: 08 nov. 2023.

BLANKSCHEIN, M.D., CLOMBURG, J.M., GONZALEZ R. *Escherichia coli* strains engineered for homofermentative production of D-Lactic acid from glycerol. **Metabolic Engineering**, v. 12, p.409–419, 2010.

BRASIL. Conselho Nacional de Política Energética. **Resolução N° 16, de 29 de Outubro de 2018**. Dispõe sobre a evolução da adição obrigatória de biodiesel ao óleo diesel vendido ao consumidor final, em qualquer parte do território nacional. Brasília: CNPE, 2018. Disponível em:

https://www.gov.br/mme/pt-br/assuntos/conselhos-e-comites/cnpe/resolucoes-do-cnpe/arquivos/2018/resolucao_16_cnpe_29-10-18.pdf. Acesso em: 08 nov. 2023;

BUTNARIU, M., GIUCHICI, C. The use of some nanoemulsions based on aqueous propolis and lycopene extract in the skin's protective mechanisms against UVA radiation. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 9, 10.1186/1477-3155-9-3, 2011.

CARVALHO, A.S.S., SALES, J.C.S., NASCIMENTO, F.V.D., RIBEIRO, B.D., DE SOUZA, C.E.C., LEMES, A.C., COELHO, M.A.Z. Lipase Production by *Yarrowia lipolytica* in Solid-State Fermentation Using Amazon Fruit By-Products and Soybean Meal as Substrate. **Catalysts**, v. 13, p. 289, 2023.

CHOI, J., JANG, Y. S., CHO, J. H., SEUNG, D., LEE, S. Y., PAPOUTSAKIS, E. T., SONG, H. Characterization and evaluation of corn steep liquid in acetone-butanol-ethanol production by *Clostridium acetobutylicum*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 18(2), p. 266–271, 2013.

CHOZHAVENDHAN, S., PRAVEEN KUMAR, R., ELAVAZHAGAN, S., BARATHIRAJA, B., JAYAKUMAR, M., & VARJANI, S. J. Utilization of Crude Glycerol from Biodiesel Industry for the Production of Value-Added Bioproducts. **Waste to Wealth**, p. 65–82, 2017.

CLINTON, S. K. Lycopene: Chemistry, Biology, and Implications for Human Health and Disease. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 2, p. 35–51, 2009.

DA SILVA, L.V., COELHO, M.A.Z., AMARAL, P.F.F. ET AL. A novel osmotic pressure strategy to improve erythritol production by *Yarrowia lipolytica* from glycerol. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, v. 41, p. 1883–1886, 2018.

DA SILVA, L. V.; TAVARES, C. B.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z. Production of citric acid by *Yarrowia lipolytica* in different crude glycerol concentrations and in different nitrogen sources. **Chemical Engineering Transactions**, v. 27, p. 199–204, 2012.

DE CARVALHO, C.C.C.R., CARAMUJO, M.J. Carotenoids in aquatic ecosystems and aquaculture: A colorful business with implications for human health. **Frontiers in Marine Science**, v. 4, p. 93, 2017.

DE SOUZA, CAMILLA PIRES, **Biologia sintética de *Yarrowia lipolytica* visando a produção de biossurfactantes e carotenoides**. 2020. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

DE SOUZA, C. P.; RIBEIRO, B. D.; ZARUR COELHO, M. A.; ALMEIDA, R. V.; NICAUD, J. M. Construction of wild-type *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 auxotrophic mutants using dual CRISPR/Cas9 strategy for novel biotechnological approaches. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 140, n. 109621, 2020.

DEVILLERS, H. et al. Efficient conversion of crude glycerol from various industrial wastes into single cell oil by yeast *Yarrowia lipolytica*. **Bioresource Technology**, v. 207, p. 237–243, 2016.

EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards), RICCI A., ALLENDE A., BOLTON D., CHEMALY M., DAVIES R., FERNÁNDEZ ESCÁMEZ P.S., et al., Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 8: Suitability of taxonomic units notified to EFSA until march 2018, **EFSA Journal**, v. 16, i. 7, 2018.

EGERMEIER, M.; RUSSMAYER, H.; SAUER, M.; MARX, H. Metabolic flexibility of *Yarrowia lipolytica* growing on glycerol. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–9, 2017.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). The State of Food and Agriculture 2019. Moving forward on food loss and waste reduction. **Routledge Handbook of Religion and Ecology**, p. 1-182, 2019. Disponível em: <https://www.fao.org/3/ca6030en/ca6030en.pdf>, Acesso em: 08 nov. 2023.

GALACTION, A. I. et al. Prediction of oxygen mass transfer coefficients in stirred bioreactors for bacteria, yeasts and fungus broths. **Biochemical Engineering Journal**, v. 20, n. 1, p. 85–94, 2004.

GAO, S. et al. Iterative integration of multiple-copy pathway genes in *Yarrowia lipolytica* for heterologous β -carotene production. **Metabolic Engineering**, v. 41, p. 192–201, 2017.

GOMES, N. et al. Oxygen mass transfer in a biphasic medium: Influence on the biotransformation of methyl ricinoleate into γ -decalactone by the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, n. 3, p. 380–386, 2007.

GOTTARDI, D., SIROLI, L., VANNINI, L., PATRIGNANI, F., AND LANCIOTTI, R. Recovery and valorization of agri-food wastes and by-products using the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*. **Trends in Food Science and Technology**, v. 115, p. 74–86, 2021.

GUO, Y. et al. Draft genomic DNA sequence of *Yarrowia lipolytica* WSH-Z06, a strain for high production of alpha-ketoglutarate. 2014 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/240972>. Acesso em: 08 nov. 2023.

HU, X. et al. Improved β -carotene production by oxidative stress in *Blakeslea trispora* induced by liquid paraffin. **Biotechnology Letters**, v. 35, n. 4, p. 559–563, 2012.

JACOBSEN, I. H.; LEDESMA-AMARO, R.; MARTINEZ, J. L. Recombinant β -Carotene Production by *Yarrowia lipolytica* – Assessing the Potential of Micro-Scale Fermentation Analysis in Cell Factory Design and Bioreaction Optimization. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, 2020.

JAMNONGWONG, M., LOUBIERE, K., DIETRICH, N., HÉBRARD, G. Experimental study of oxygen diffusion coefficients in clean water containing salt, glucose or surfactant: Consequences on the liquid-side mass transfer coefficients. **Chemical Engineering Journal**, v. 165, i. 3, p. 758-768, 2010.

KANG, C. K. et al. High-Yield Production of Lycopene from Corn Steep Liquor and Glycerol Using the Metabolically Engineered *Deinococcus radiodurans* R1 Strain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 18, p. 5147–5153, 2020.

KIM, S., LIM, D., LEE, D., YU, J., AND LEE, T. Valorization of corn steep liquor for efficient paramylon production using *Euglena gracilis*: The impact of precultivation and light-dark cycle. **Algal Research** v. 61, 2022.

KUMAR, L. R., YELLAPU, S. K., TYAGI, R.D., ZHANG X. A review on variation in crude glycerol composition, bio-valorization of crude and purified glycerol as carbon source for lipid production, **Bioresource Technology**, v. 293, 2019.

LARROUDE, M. et al. A synthetic biology approach to transform *Yarrowia lipolytica* into a competitive biotechnological producer of β -carotene. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 115, n. 2, p. 464–472, 2017.

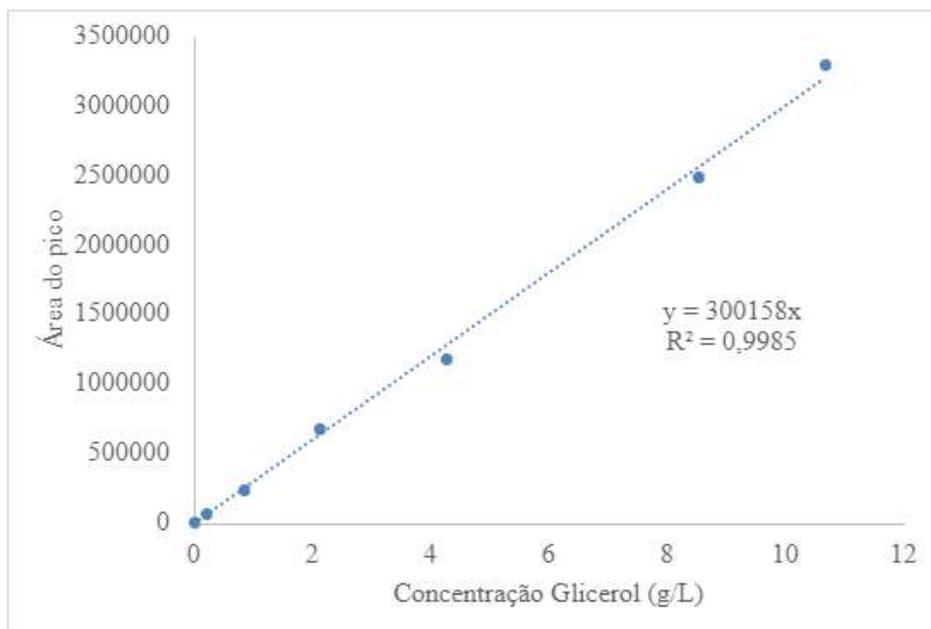
LV, P. J. et al. Dissolved-oxygen feedback control fermentation for enhancing β -carotene in engineered *Yarrowia lipolytica*. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 2020.

MADDIPATI, P., ATIYEH, H. K., BELLMER, D. N., & HUHNKE, R. L. Ethanol production from Syngas by *Clostridium* strain P11 using corn steep liquor as a nutrient replacement to yeast extract. **Bioresource Technology**, v. 102(11), p. 6494–6501, 2011.

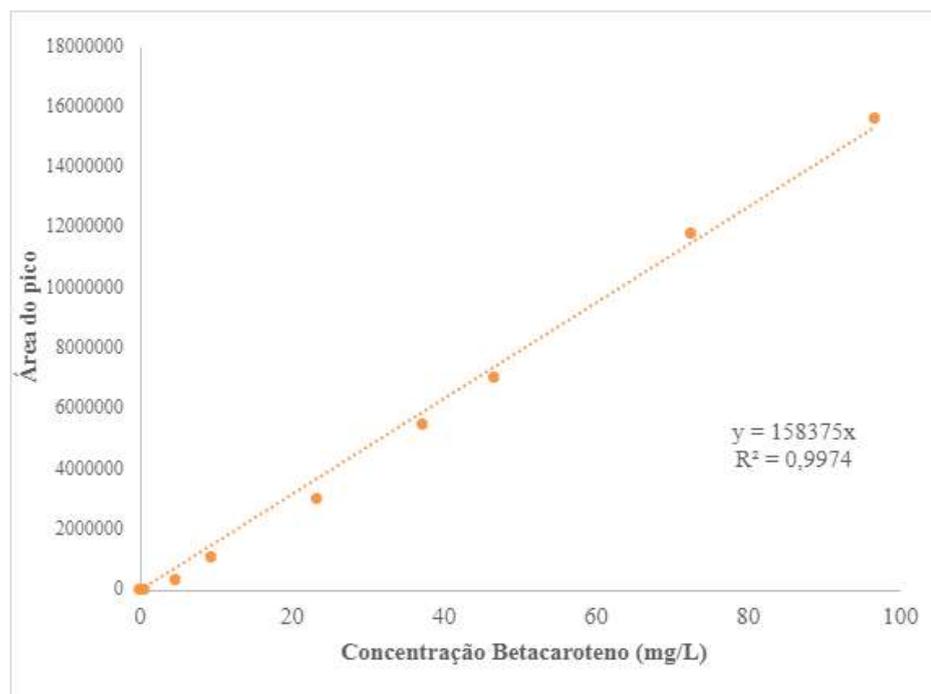
- MAGNAN, C.; YU, J.; CHANG, I.; JAHN, E.; KANOMATA, Y.; WU, J.; ZELLER, M.; OAKES, M.; BALDI, P.; SANDMEYER, S. Sequence assembly of *Yarrowia lipolytica* strain W29/CLIB89 shows transposable element diversity. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, 2016.
- MATTHÄUS, F., KETELHOT, M., GATTER, M., AND BARTH, G.. Production of lycopene in the non-carotenoid-producing yeast *Yarrowia lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, p. 1660–1669, 2014.
- MICHELIN, M. et al. Influence of volumetric oxygen transfer coefficient (kLa) on xylanases batch production by *Aspergillus niger* van Tieghem in stirred tank and internal-loop airlift bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 80, p. 19–26, 2013.
- MORÃO, A. et al. Effect of antifoam addition on gas-liquid mass transfer in stirred fermenters. **Bioprocess Engineering**, v. 20, n. 2, p. 165, 1999.
- MOUNSEF, J. R. et al. The effect of aeration conditions, characterized by the volumetric mass transfer coefficient kLa, on the fermentation kinetics of *Bacillus thuringiensis* kurstaki. **Journal of Biotechnology**, v. 210, p. 100–106, 2015.
- NANO, K.; ROUKAS, T.; PAPADAKIS, E.; KOTZEKIDOU, P. Carotene production from waste cooking oil by *Blakeslea trispora* in a bubble column reactor: The role of oxidative stress. **Engineering in Life Sciences**, v. 17, n. 7, p. 775-780, 2017.
- NASCIMENTO, F. V., DE CASTRO, A. M., SECCHI, A. R., COELHO, M. A. Z. Insights into media supplementation in solid-state fermentation of soybean hulls by *Yarrowia lipolytica*: Impact on lipase production in tray and insulated packed-bed bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 166, 2021.
- NASCIMENTO, F. V., LEMES, A. C., CASTRO, A. M., SECCHI, A. R., COELHO, M. A. Z. A Temporal Evolution Perspective of Lipase Production by *Yarrowia lipolytica* in Solid-State Fermentation. **Processes**, 10, 381, 2022.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre : Artmed, 2014.
- NEUVÉGLISE, C. Draft genome sequence of *Yarrowia lipolytica* strain A-101 isolated from polluted soil in Poland. **Genome Announcements**, v. 4, n.5, 2016.
- NOORMAN, H. An industrial perspective on bioreactor scale-down: What we can learn from combined large-scale bioprocess and model fluid studies. **Biotechnology Journal**, v. 6, n. 8, p. 934–943, 2011.

- OBAYORI, O. S., ILORI, M. O., ADEBUSOYE, S. A., OYETIBO, G. O., OMOTAYO, A. E., & AMUND, O. O. Effects of corn steep liquor on growth rate and pyrene degradation by *Pseudomonas* strains. **Current Microbiology**, v. 60(6), p. 407–411, 2010.
- OTERO, D. M.; BULSING, B. A.; DA M HUERTA, K.; ROSA, C. A.; ZAMBIAZI, R. C.; BURKERT, C. A. V.; DE M BURKERT, J. F. Carotenoid-producing yeasts in the Brazilian biodiversity: Isolation, identification and cultivation in agroindustrial waste. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.36, n. 1, p. 117-129, 2019.
- PAPANIKOLAOU, S., MUNIGLIA, L., CHEVALOT, I., AGGELIS, G., MARC, I. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol, **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. 4, 737–744, 2002.
- RAKICKA, M., LAZAR, Z., DULERMO, T. et al. Lipid production by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* using industrial by-products under different culture conditions. **Biotechnol Biofuels**, v. 8, p. 104, 2015.
- RIVAS, B., MOLDES, A.B., DOMINGUEZ, J.M., PARAJO, J.C. Development of culture media containing spent yeast cells of *Debaryomyces hansenii* and corn steep liquor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus*. **International Journal Of Food Microbiology**, v. 97, p. 93-98, 2004.
- SABIROVA, J.S. et al. The ‘LipoYeasts’ project: using the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* in combination with specific bacterial genes for the bioconversion of lipids, fats and oils into high-value products. **Microbiol. Biotechnol.**, v. 4, p. 47-54, 2011.
- SCHAEPE, S. et al. kLa of stirred tank bioreactors revisited. **Journal of Biotechnology**, v. 168, n. 4, p. 576–583, 2013.
- SCHMIDELL, W., et al. **Biotecnologia Industrial – Volume 2**, 1. ed, São Paulo: Edgard Blücher, 2001.
- SECRETARIA DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO (DERAL-PR). **Prognóstico Agropecuário Milho 2021/2022**. Curitiba, 2021. Disponível em: https://www.agricultura.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/documento/2022-02/VOL%2013%20N%2041%202021%20Prognóstico%20Agropecuário%20MILHO%20-.pdf. Acesso em: 08 nov. 2023.
- SPENCER, J., RAGOUT DE SPENCER, A., LALUCE, C. Non-conventional yeasts. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 58, p. 147–156, 2002.

- TOOGE, R. **Produção de biodiesel deverá crescer mais de 15% em 2023**. Disponível em: <<https://www.infomoney.com.br/negocios/producao-de-biodiesel-devera-crescer-mais-de-15-em-2023/#:~:text=O%20aumento%20de%2010%25%20para>>. Acesso em: 8 dez. 2023.
- TUAN HARITH, Z. et al. Effects of dietary astaxanthin enrichment on enhancing the colour and growth of red tilapia, *Oreochromis* sp. **Aquaculture and Fisheries**, 2022.
- WAGDE, M., SHIVANI, A., RAJ KEER, D.R., SHARMA, S., SHARMA, B. Effect of natural β -carotene from carrot (*Daucus carota*) and Spinach (*Spinacia oleracea*) on colouration of an ornamental fish swordtail (*Xiphophorus hellerii*). **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 6. p. 699-705, 2018.
- WANG, W.; YU, L. Effects of Oxygen Supply on Growth and Carotenoids Accumulation by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 64, n. 11-12, p. 853–858, 2009.
- WISCHRAL, D. et al. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium beijerinckii* DSM 791 from crude glycerol and corn steep liquor: Process optimization and metabolic engineering. **Bioresource Technology**, v. 212, p. 100–110, 2016.
- WU, T. et al. Membrane engineering - A novel strategy to enhance the production and accumulation of β -carotene in *Escherichia coli*. **Metabolic Engineering**, v. 43, n. Pt A, p. 85–91, 2017.
- YANG, J.; GUO, L. Biosynthesis of β -carotene in engineered *E. coli* using the MEP and MVA pathways. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, 2014.
- YUZBASHEV T.V. et al. Production of succinic acid at low pH by a recombinant strain of yeast *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnol Bioengineering**, v. 107, p. 673–682, 2010.
- ZHANG, X. K. et al. Metabolic engineering of β -carotene biosynthesis in *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnology Letters**, v. 42, n. 6, p. 945–956, 2020.
- ZHOU, K. et al. Corn Steep Liquor: Green Biological Resources for Bioindustry. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2022.

APÊNDICE A – Curva analítica para o cálculo da concentração de glicerol

Fonte: elaboração própria.

APÊNDICE B – Curva analítica para o cálculo da concentração de β -caroteno

Fonte: elaboração própria.