



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**Faculdade de Engenharia de Alimentos**

**SUÉLLEN PATRÍCIA HELD AZAMBUJA**

**FISIOLOGIA E CAPACIDADE DE ACÚMULO DE LIPÍDEOS DE DIFERENTES  
LINHAGENS DE *Yarrowia lipolytica* E *Rhodospordium toruloides* EM MEIO  
CONTENDO GLICEROL**

CAMPINAS  
2016

**SUÉLLEN PATRICIA HELD AZAMBUJA**

**FISIOLOGIA E CAPACIDADE DE ACÚMULO DE LIPÍDEOS DE DIFERENTES  
LINHAGENS DE *Yarrowia lipolytica* E *Rhodospiridium toruloides* EM MEIO  
CONTENDO GLICEROL**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção de Mestra em ENGENHARIA DE ALIMENTOS.

Orientador: ANDREAS KAROLY GOMBERT

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À  
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO  
DEFENDIDA PELA ALUNA SUÉLLEN  
PATRICIA HELD AZAMBUJA, E  
ORIENTADA PELO PROF. DR. ANDREAS  
KAROLY GOMBERT

CAMPINAS  
2016

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** CNPq, 130496/2014-6

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos  
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

Azambuja, Suéllen Patricia Held, 1990-

A313f      Fisiologia e capacidade de acúmulo de lipídeos de diferentes linhagens de *Yarrowia lipolytica* e *Rhodosporidium toruloides* em meio contendo glicerol / Suéllen Patricia Held Azambuja. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Andreas Karoly Gombert.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Leveduras oleaginosas. 2. *Yarrowia lipolytica*. 3. *Rhodosporidium toruloides*. 4. Fisiologia. 5. Óleo microbiano. I. Gombert, Andreas Karoly. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

#### Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Physiology and lipid accumulation capacity of different *Yarrowia lipolytica* and *Rhodosporidium toruloides* in medium containing glycerol

**Palavras-chave em inglês:**

Oleaginous yeasts

*Yarrowia lipolytica*

*Rhodosporidium toruloides*

Physiology

Single cell oil

**Área de concentração:** Engenharia de Alimentos

**Titulação:** Mestra em Engenharia de Alimentos

**Banca examinadora:**

Andreas Karoly Gombert [Orientador]

Everson Alves Miranda

Marilda Keico Taciro

**Data de defesa:** 29-03-2016

**Programa de Pós-Graduação:** Engenharia de Alimentos

## **BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Andreas Karoly Gombert  
FEA / UNICAMP  
Orientador

Prof. Dr. Everson Alves Miranda  
FEQ / UNICAMP  
Membro titular

Prof. Dra. Marilda Keico Taciro  
ICB / USP  
Membro titular

Prof. Dra. Ângela Maria Moraes  
FEQ / UNICAMP  
Membro suplente

Dr. Bruno Vaz de Oliveira  
SENAI  
Membro suplente

A ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

## **DEDICATÓRIA**

“Porque Dele, e por Ele, e para Ele são todas as coisas.”

(Romanos 11.36a)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pois sem Ele nada disso seria possível.

Ao meu orientador, professor Andreas Karoly Gombert, pela dedicação em ensinar, pela paciência, compreensão e confiança.

Aos meus pais, Ney e Gizele, pelo amor, carinho, todo apoio e pelas orações que me sustentaram durante os momentos bons e de dificuldade. Ao meu irmão Ney Gabriel e minha cunhada Pâmela pelo apoio e disposição em sempre me receberem em sua casa. E à minha linda sobrinha Rebecca pela fonte inesgotável de sorrisos, abraços e beijos que sempre me serviram como incentivo para continuar nesta caminhada.

Aos professores Everson Alves Miranda, Marilda Keico Taciro e Ângela Maria Moraes e ao Dr. Bruno Vaz de Oliveira pelas sugestões e correções da dissertação.

Ao professor Everson Alves Miranda por ceder as linhagens de *R. toruloides* e os equipamentos do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEBp/UNICAMP). À professora Maria Alice Zarur Coelho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) por enviar as linhagens *Y. lipolytica* IMUFRJ 50678 e *Y. lipolytica* Po1g. À Fundação André Tosello pela linhagem *Y. lipolytica* CCT 5443. À Dra. Fatima Aparecida de Almeida Costa pela linhagem *Y. lipolytica* CCT 7401. E à Fernanda Bacciotti por ceder as linhagens *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 e *Y. lipolytica* W29.

À Nemailla Bonturi pelo carinho e disposição em ajudar, a qualquer hora. Pelas orientações nos cultivos para acúmulo de lipídeos e no artigo submetido, além das boas conversas. E ao Rafael Matsumoto pela grande ajuda nas extrações de lipídeos.

Ao Felipe Beato pela ajuda na identificação das espécies e em tudo o que sempre precisei durante os experimentos realizados. E à todos do LEMeB – professores, técnicas e alunos – por me socorrerem sempre que precisei de um conselho quanto aos experimentos ou mesmo pessoais.

À Priscila Hoffmann por sempre estar disposta a me ajudar no laboratório e também como uma irmã mais velha, com seus conselhos e apoio em tudo.

Aos colegas Pedro Oliveira e Fernanda Bacciotti pelas conversas ao telefone sempre que tive dúvidas quanto aos cultivos de *Y. lipolytica*, obrigada pela paciência.

Aos meus amigos de mestrado, em especial à Grazielle Nathia Neves pelo apoio, ombro amigo, comemorações, horas de estudos, tantos cafés e conversas.

Ao CNPq pelo apoio financeiro durante estes dois anos.

## RESUMO

O biodiesel é constituído de ésteres de ácidos graxos e álcoois, e pode ser obtido a partir de lipídeos provenientes de diferentes origens. Atualmente, uma das rotas estudadas para obtenção dos triacilgliceróis (TAG) necessários é por microrganismos crescendo em glicerol, um subproduto da fabricação do biodiesel. *Yarrowia lipolytica* e *Rhodospiridium toruloides* são leveduras estritamente aeróbias, capazes de assimilar glicerol, dentre outros substratos. Em função de sua capacidade de acumular lipídeos (mais de 20% da sua biomassa seca), estas leveduras são classificadas como organismos oleaginosos, apresentando grande potencial para a produção industrial de óleo microbiano (*single cell oil*). O objetivo deste trabalho foi determinar e comparar parâmetros fisiológicos e de processo, bem como a capacidade de acúmulo de lipídeos de seis linhagens de *Y. lipolytica* e duas linhagens de *R. toruloides*. Para esta finalidade, estas leveduras foram cultivadas em meios de cultura contendo glicerol, em frasco agitado. Velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ), fator de conversão de substrato em biomassa na fase exponencial ( $Y_{X/S}^{\text{exp}}$ ), velocidade específica máxima de consumo de substrato ( $r_S^{\text{máx}}$ ) e fator global de conversão de substrato em biomassa ( $Y_{X/S}^{\text{global}}$ ), foram calculados a partir de dados experimentais durante crescimento em meio definido. Fator de conversão de substrato em lipídeos ( $Y_{Lip/S}$ ) e produtividade em lipídeos ( $P_{Lip}$ ), foram calculados a partir de dados experimentais durante crescimento em meio complexo. As linhagens *Y. lipolytica* IMUFRJ 50678, *Y. lipolytica* Po1g, *Y. lipolytica* W29 e *Y. lipolytica* CCT 5443 apresentaram parâmetros fisiológicos muito similares, com valores médios de  $\mu_{\text{máx}}$ ,  $Y_{X/S}^{\text{exp}}$ ,  $r_S^{\text{máx}}$  e  $Y_{X/S}^{\text{global}}$  de  $0,31 \text{ h}^{-1}$ ,  $0,53$  gramas de massa seca por gramas de substrato (gMS/gS),  $0,60$  gramas de substrato por gramas de massa seca por hora (gS/(gMS.h)) e  $0,46$  (gMS/gS), respectivamente. As duas linhagens de *R. toruloides* apresentaram parâmetros fisiológicos e de processo sem diferença significativa, com valores médios de  $0,084 \text{ h}^{-1}$ ,  $0,53$  (gMS/gS),  $0,17$  (gS/(gMS.h)) e  $0,44$  (gMS/gS). Com relação à capacidade de acúmulo de lipídeos, dentre as linhagens de *Y. lipolytica* estudadas, a linhagem *Y. lipolytica* CCT 5443 apresentou os melhores valores de  $Y_{Lip/S}$ ,  $0,054$  gramas de lipídeos por gramas de substrato (gLip/gS), e  $P_{Lip}$  de  $0,040$  gramas de lipídeos por litro por hora (gLip/(L.h)). Dentre todas as linhagens estudadas (*Y. lipolytica* e *R. toruloides*), a levedura *R. toruloides* Rt 10 apresentou maior capacidade de acúmulo de lipídeos, com  $Y_{Lip/S}$  igual a  $0,11$  (gLip/gS) e  $P_{Lip}$  igual a  $0,10$  (gLip/(L.h)), sendo esta linhagem, portanto, a que apresentou maior potencial de aplicação em processos industriais de obtenção de óleo microbiano.

**Palavras-chave:** Leveduras oleaginosas, *Yarrowia lipolytica*, *Rhodospiridium toruloides*, Fisiologia, Óleo microbiano.

## ABSTRACT

Biodiesel consists of esters of fatty acid and alcohols, and can be obtained using lipids from different sources. Currently, one of the routes considered to obtain the necessary triacylglycerols (TAG) is from microbes growing on glycerol, a by-product of biodiesel production. *Yarrowia lipolytica* and *Rhodospiridium toruloides* are strictly aerobic yeast, able to assimilate glycerol, among other substrates. Because of their ability to accumulate lipids (over 20% of their dry biomass), these yeasts are classified as oleaginous organisms presenting high potential for the industrial production of microbial oil (single cell oil). The aim of this work was to determine and compare physiological and process parameters as well as lipid accumulation capacity of six strains of *Y. lipolytica* and two strains of *R. toruloides*. For this purpose, these yeasts were cultivated in media containing glycerol in shake-flasks. The maximum specific growth rate ( $\mu_{\max}$ ), biomass yield from substrate in the exponential phase ( $Y_{X/S}^{exp}$ ) and maximum specific substrate consumption rate ( $r_S^{max}$ ), and the process parameter global biomass yield from substrate ( $Y_{X/S}^{global}$ ) were calculated from experimental data obtained during growth in a defined medium. The lipid yield from substrate ( $Y_{Lip/S}$ ) and lipid productivity ( $P_{Lip}$ ) were calculated from experimental data obtained during growth in a complex medium. The strains *Y. lipolytica* IMUFRJ 50678, *Y. lipolytica* Po1g, *Y. lipolytica* W29 and *Y. lipolytica* CCT 5443 displayed very similar physiological parameters, with  $\mu_{\max}$ ,  $Y_{X/S}^{exp}$ ,  $r_S^{max}$  and  $Y_{X/S}^{global}$ , average values of 0.31 h<sup>-1</sup>, 0.53 grams of dry mass per grams of substrate (gDM/gS), 0.60 grams of substrate per grams of dry mass per hour (gS/(gDM.h)) and 0.46 (gDM/gS), respectively. The two strains of *R. toruloides* presented physiological and process parameters with no significant difference, with average values of 0.084 h<sup>-1</sup>, 0.53 (gDM/gS), 0.17 (gS/(gDM.h)) and 0.44 (gDM/gS). Regarding lipid accumulation capacity, among all *Y. lipolytica* strains, *Y. lipolytica* CCT 5443 strain presented the best  $Y_{Lip/S}$ , 0.054 grams of lipid per grams of substrate (gLip/gS), and  $P_{Lip}$  of 0.040 grams of lipid per liter per hour (gLip/(L.h)). Among all investigated strains (*Y. lipolytica* and *R. toruloides*), the yeast *R. toruloides* Rt 10 displayed the highest lipid accumulation capacity, with  $Y_{Lip/S}$  equal to 0.11 (gLip/gS) and  $P_{Lip}$  equal to 0.10 (gLip/(L.h)). Thus, among all strains investigated in our study, the latter presents the best characteristics for industrial single cell oil production.

**Keywords:** Oleaginous yeast, *Yarrowia lipolytica*, *Rhodospiridium toruloides*, Physiology, Single cell oil.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Típica curva de crescimento microbiano em batelada.....	26
Figura 2 - Gráficos representativos para cálculo de parâmetros fisiológicos na fase exponencial de crescimento. A) cálculo da velocidade específica máxima de crescimento; B) cálculo do rendimento ou fator de conversão na fase exponencial .....	29
Figura 3 - Cultivo em batelada de <i>E. coli</i> com medidas de Abs <sub>600</sub> mensuradas a cada 30 min, diluídas e não diluídas .....	37
Figura 4 - Imagem obtida a partir de um microscópio ótico de uma amostra contendo <i>Yarrowia lipolytica</i> IMUFRJ 50682 .....	42
Figura 5 - Árvore filogenética da levedura <i>Yarrowia lipolytica</i> e espécies adjacentes construída a partir do sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do rDNA .....	43
Figura 6 - Imagem obtida a partir de um microscópio ótico de uma amostra contendo <i>R. toruloides</i> CCT 0783 .....	50
Figura 7 - Árvore filogenética da levedura <i>Rhodospordium toruloides</i> e espécies adjacentes construída a partir do sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do rDNA .....	50
Figura 8 - Montagem da sequência consenso a partir dos primers internos e externos .....	66
Figura 9 - Etapas de preparação do cultivo para cinética de crescimento de <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	68
Figura 10 - Etapas de preparação do cultivo para cinética de crescimento de <i>Rhodospordium toruloides</i> .....	69
Figura 11 - Sistema de cultivo em frasco agitado desenvolvido para realização de cinéticas de crescimento de leveduras. A pinça de Mohr é usada para pinçar a mangueira de silicone, evitando-se assim a contaminação do meio após a esterilização e durante o cultivo ...	71
Figura 12 - Etapas de preparação do cultivo para acúmulo de lipídeos de <i>Yarrowia lipolytica</i> e <i>Rhodospordium toruloides</i> .....	72
Figura 13 - Resultado da amplificação após purificação do DNA das 9 linhagens estudadas utilizando os primers NL-1 e NL-4 .....	82
Figura 14 - Alinhamento da sequência consenso da linhagem <i>Y. lipolytica</i> W29 com a sequência referência <i>Y. lipolytica</i> ATCC 20460 (= W29).....	86
Figura 15 - Resumo gráfico obtido para o alinhamento da sequência query ( <i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682) com linhagens de <i>Y. lipolytica</i> (IMUFRJ 50678, Po1g, W29, CCT 5443 e CCT 7401), <i>R. toruloides</i> (CCT 0783 e Rt10) e <i>S. cerevisiae</i> (CEN.PK113-7D), obtido pela ferramenta BLASTN .....	87
Figura 16 - Descrição estatística obtida para o alinhamento da sequência query ( <i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682) com linhagens de <i>Y. lipolytica</i> (IMUFRJ 50678, Po1g, W29, CCT 5443 e CCT 7401), <i>R. toruloides</i> (CCT 0783 e Rt10) e <i>S. cerevisiae</i> (CEN.PK113-7D), obtida pela ferramenta BLASTN .....	88
Figura 17 - Análise da faixa de linearidade através de amostras diluídas e não diluídas (Abs <sub>600</sub> ) em função do tempo de amostragem, realizadas em frascos agitados a 200 rpm e 30 °C, em meio MDBU e 2,5 g/L de glicerol. A) <i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682. B) <i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50678. C) <i>Y. lipolytica</i> Po1g. D) <i>Y. lipolytica</i> W29. E) <i>Y. lipolytica</i> CCT 5443. F) <i>Y. lipolytica</i> CCT 7401. G) <i>R. toruloides</i> CCT 0783. H) <i>R. toruloides</i> Rt 10 .....	90
Figura 18 – Imagem demonstrando a formação de gotículas de óleo durante o cultivo da linhagem <i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682 realizado em frasco agitado a 200 rpm e 30 °C, em meio MDBU e 2,5 g/L de glicerol, representando o comportamento apresentado também pelas linhagens <i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50678, <i>Y. lipolytica</i> W29, <i>Y. lipolytica</i> CCT 5443 e <i>Y. lipolytica</i> CCT 7401 .....	92

Figura 19 - Cromatogramas obtidos em HPLC para tempos 0 h (linha rosa), 12 h (linha verde) e 14 h (linha azul) do cultivo de <i>Y. lipolytica</i> CCT 7401 em meio MDBU (2,5 g/L iniciais de glicerol), a 30 °C e 200 rpm .....	99
Figura 20 - Cinéticas de crescimento de linhagens de <i>Y. lipolytica</i> realizadas em meio MDBU (2,5 g/L iniciais de glicerol), a 30 °C e 200 rpm. A) IMUFRJ 50682. B) IMUFRJ 50678. C) Po1g. D) W29. E) CCT 5443. F) CCT 7401 .....	101
Figura 21 - Cromatogramas obtidos em HPLC para tempos 0 h (linha verde) e 14 h (linha rosa) do cultivo de <i>R. toruloides</i> CCT 0783 em meio MDBU (2,5 g/L iniciais de glicerol), a 30 °C e 200 rpm .....	113
Figura 22 - Cinéticas de crescimento de linhagens de <i>R. toruloides</i> realizadas em meio MDBU (2,5 g/L iniciais de glicerol), a 30 °C e 200 rpm. A) CCT 0783. B) Rt 10.....	114
Figura 23 - Cinética de acúmulo de lipídeos para a linhagem <i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682, cultivada em meio MCL, a 28 °C e 200 rpm .....	119
Figura 24 - Porcentagem lipídica (m/m) para linhagens de <i>Y. lipolytica</i> cultivadas em meio MCL (70 g/L iniciais de glicerol), a 28 °C e 200 rpm, por 96 h.....	120
Figura 25 – Parâmetros de processo fator global de conversão de substrato em lipídeos ( $Y_{Lip/S}$ ) e produtividade em lipídeos ( $P_{Lip}$ ) para linhagens de <i>Y. lipolytica</i> cultivadas em meio MCL (70 g/L iniciais de glicerol), a 28 °C e 200 rpm, por 96 h.....	122
Figura 26 - Cultivo para acúmulo de lipídeos em meio MCL (70 g/L iniciais de glicerol), a 28 °C e 200 rpm, após 96 h de incubação. A) <i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50678. B) <i>Y. lipolytica</i> W29.....	123
Figura 27 - Cinética de acúmulo de lipídeos para a linhagem <i>R. toruloides</i> Rt 10, cultivada em meio MCL (70 g/L iniciais de glicerol), a 28 °C e 200 rpm .....	128
Figura 28 - Porcentagem lipídica (m/m) para linhagens de <i>R. toruloides</i> cultivadas em meio MCL (70 g/L iniciais de glicerol), a 28 °C e 200 rpm, durante 72 h.....	129
Figura 29 – Parâmetros de processo fator global de conversão de substrato em lipídeos ( $P_{Lip/S}$ ) e produtividade em lipídeos ( $P_{Lip}$ ) para linhagens de <i>R. toruloides</i> cultivadas em meio MCL MCL (70 g/L iniciais de glicerol), a 28 °C e 200 rpm, durante 72 h .....	129
Figura 30 - Cultivo para acúmulo de lipídeos em meio MCL (70 g/L iniciais de glicerol), a 28 °C e 200 rpm, após 72 h de incubação. A) <i>R. toruloides</i> CCT 0783. B) <i>R. toruloides</i> Rt 10 .....	131
Figura 31 - Cromatograma-exemplo obtido por sequenciamento do DNA correspondente à região D1/D2 da subunidade 26S do RNA ribossomal da levedura <i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50678, a partir do <i>primer</i> NL-1, mostrando a perda de qualidade da leitura dos nucleotídeos nas extremidades da sequência .....	150
Figura 32 - Curvas de calibração para obtenção do fator de conversão de Abs <sub>600</sub> em massa seca (g/L), conforme detalhado no item 4.12.2 (Curva de calibração para conversão de absorvância em massa seca) de linhagens de <i>Y. lipolytica</i> cultivadas em meio MDBU (2,5 g/L iniciais de glicerol), a 30 °C e 200 rpm. A) IMUFRJ 50682. B) IMUFRJ 50678. C) Po1g. D) W29. E) CCT 5443. F) CCT 7401 .....	158
Figura 33 - Curvas de calibração para obtenção do fator de conversão de Abs <sub>600</sub> em massa seca (g/L), conforme detalhado no item 4.12.2 (Curva de calibração para conversão de absorvância em massa seca) de linhagens de <i>R. toruloides</i> cultivadas em meio MDBU (2,5 g/L iniciais de glicerol), a 30 °C e 200 rpm. G) CCT 0783. H) Rt 10.....	160
Figura 34 - Regressão linear, de uma replicata representativa, para obtenção da velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ), conforme detalhado no item 4.13.1 (Cálculo dos parâmetros fisiológicos) de linhagens de <i>Y. lipolytica</i> e <i>R. toruloides</i> cultivadas em meio MDBU (2,5 g/L iniciais de glicerol), a 30 °C e 200 rpm. A) IMUFRJ 50682. B) IMUFRJ 50678. C) Po1g. D) W29. E) CCT 5443. F) CCT 7401. G) CCT 0783. H) Rt 10 .....	161

Figura 35 - Regressão linear, de uma replicata representativa, para obtenção do fator de conversão de substrato em biomassa na fase exponencial ( $Y_{X/S}^{exp}$ ), conforme detalhado no item 4.13.1 (Cálculo dos parâmetros fisiológicos) de linhagens de <i>Y. lipolytica</i> e <i>R. toruloides</i> cultivadas em meio MDBU (2,5 g/L iniciais de glicerol), a 30 °C e 200 rpm. A) IMUFRJ 50682. B) IMUFRJ 50678. C) Po1g. D) W29. E) CCT 5443. F) CCT 7401. G) CCT 0783. H) Rt 10 .....	162
Figura 36 - Cinéticas de crescimento de linhagens de <i>Y. lipolytica</i> realizadas em meio MDBU (2,5 g/L iniciais de glicerol), a 30 °C e 200 rpm, conforme detalhado no item 4.7 (Cultivos para cinéticas de crescimento). A) IMUFRJ 50682. B) IMUFRJ 50678. C) Po1g. D) W29 E) CCT 5443. F) CCT 7401 .....	163
Figura 37 - Cinéticas de crescimento de linhagens de <i>R. toruloides</i> realizadas em meio MDBU (2,5 g/L iniciais de glicerol), a 30 °C e 200 rpm, conforme detalhado no item 4.7 (Cultivos para cinéticas de crescimento). G) CCT 0783. H) Rt 10 .....	165
Figura 38 - Desenho esquemático de um biorreator funcionando em modo batelada, equipado com amostrador automatizado e contínuo, tipo <i>loop</i> , para estimar a concentração celular <i>on line</i> .....	174
Figura 39 - Gráfico genérico mostrando o desvio da linearidade ocorrido entre absorbância medida e a concentração celular .....	174

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Teor lipídico (massa lipídica/massa celular seca), perfil de ácidos graxos (massa do ácido graxo/massa lipídica total) de alguns microrganismos oleaginosos considerados para a obtenção de óleo microbiano .....	39
Tabela 2 - Número de publicações encontradas sobre a levedura <i>Y. lipolytica</i> .....	41
Tabela 3 - Número de publicações encontradas sobre a levedura <i>R. toruloides</i> .....	41
Tabela 4 - Caracterização do crescimento de <i>Yarrowia lipolytica</i> em meio líquido contendo diferentes compostos (fontes de carbono ou nitrogênio) ou na ausência de vitaminas	44
Tabela 5 - Velocidades específicas máximas de crescimento ( $\mu_{máx}$ ) e fatores de conversão de substrato em biomassa ( $Y_{X/S}$ ) para diferentes linhagens de <i>Yarrowia lipolytica</i> e fontes de carbono.....	45
Tabela 6 - Parâmetros fisiológicos obtidos para as linhagens <i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682 e <i>Y. lipolytica</i> W29, cultivadas em meio definido, com glicerol ou glicose como fonte de carbono .....	49
Tabela 7 - Caracterização do crescimento de <i>Rhodospiridium toruloides</i> em meio líquido contendo diferentes compostos (fontes de carbono ou nitrogênio) ou na ausência de vitaminas.....	51
Tabela 8 - Resultados obtidos para acúmulo de óleo microbiano por <i>R. toruloides</i> , utilizando glicose como fonte de carbono, segundo Li, Zhao e Bai (2007) .....	58
Tabela 9 - Resultados obtidos para os custos de produção de óleo microbiano por <i>R. toruloides</i> , utilizando glicose como fonte de carbono, conforme calculado por Koutinas et al. (2014) .....	59
Tabela 10 - Composição dos meios YPD, MDBU e MCL .....	60
Tabela 11 - Composição dos suplementos (elementos-traço, vitaminas e aminoácidos).....	61
Tabela 12 - Linhagens de <i>Yarrowia lipolytica</i> e <i>Rhodospiridium toruloides</i> utilizadas neste trabalho .....	64
Tabela 13 - Sequência, região de anelamento e aplicação dos primers utilizados para identificação das espécies .....	66
Tabela 14 - Resumo dos experimentos realizados neste trabalho .....	79
Tabela 15 - Concentrações de DNA obtidas após amplificação e purificação das amostras de DNA das 9 linhagens estudadas .....	83
Tabela 16 - Tamanho da sequência consenso obtida, linhagem utilizada como referência para o alinhamento, o número de acesso com que a linhagem referência está registrada no portal do NCBI, a porcentagem de identidade e o E value obtidos após alinhamento pela ferramenta BLASTN .....	85
Tabela 17 - Limite superior de absorvância e fator de conversão de absorvância em massa seca para as 8 linhagens estudadas. Cultivos realizados em frascos agitados a 200 rpm e 30 °C, em meio MDBU e 2,5 g/L de glicerol .....	95
Tabela 18 – Parâmetros fisiológicos: velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{máx}$ ), fator de conversão de substrato em biomassa na fase exponencial ( $Y_{X/S}^{exp}$ ) e velocidade específica máxima de consumo de substrato ( $r_S^{máx}$ ); e parâmetro de processo: fator global de conversão de substrato em biomassa ( $Y_{X/S}^{global}$ ), para os cultivos realizados em MDBU e glicerol como fonte única de carbono (2,5 g/L iniciais), para as linhagens de <i>Y. lipolytica</i> estudadas .....	103
Tabela 19 - Meios de cultura definidos para o crescimento de <i>Rhodospiridium toruloides</i> .	111
Tabela 20 – Parâmetros fisiológicos velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{máx}$ ), fator de conversão de substrato em biomassa na fase exponencial ( $Y_{X/S}^{exp}$ ) e velocidade	

	específica máxima de consumo de substrato ( $r_s^{m\acute{a}x}$ ) e parâmetro de processo, fator global de conversão de substrato em biomassa ( $Y_{X/S}^{global}$ ) para os cultivos realizados em MDBU e glicerol como fonte única de carbono (2,5 g/L iniciais), para as linhagens de <i>R. toruloides</i> estudadas. As médias e desvios-padrão foram obtidos a partir das triplicatas biológicas de cinética de crescimento realizadas com cada linhagem.....	114
Tabela 21	- Biomassa, concentração de lipídeos, porcentagem de lipídeos, fator global de conversão de substrato em lipídeos ( $Y_{Lip/S}$ ) e produtividade em lipídeos ( $P_{Lip}$ ) para linhagens de <i>Y. lipolytica</i> cultivadas em meio MCL (70 g/L iniciais de glicerol), a 28 °C e 200 rpm, por 96 h.....	122
Tabela 22	- Biomassa, concentração de lipídeos, porcentagem de lipídeos, fator global de conversão de substrato em lipídeos ( $Y_{Lip/S}$ ) e produtividade em lipídeos ( $P_{Lip}$ ) para linhagens de <i>R. toruloides</i> cultivadas em meio MCL (70 g/L iniciais de glicerol), a 28 °C e 200 rpm, por 72 h.....	130
Tabela 23	- Parâmetros fisiológicos velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ), fator de conversão de substrato em biomassa na fase exponencial ( $Y_{X/S}^{exp}$ ) e velocidade específica máxima de consumo de substrato ( $r_s^{m\acute{a}x}$ ) e de processo, fator global de conversão de substrato em biomassa ( $Y_{X/S}^{global}$ ) obtidos para as linhagens de <i>Y. lipolytica</i> e <i>R. toruloides</i> cultivadas em meio MDBU (2,5 g/L iniciais de glicerol), a 30 °C e 200 rpm; e porcentagem de lipídeos (m/m) e parâmetros de processo, fator global de conversão de substrato em lipídeos ( $Y_{Lip/S}$ ) e produtividade em lipídeos ( $P_{Lip}$ ) obtidos para as linhagens de <i>Y. lipolytica</i> e <i>R. toruloides</i> cultivadas em meio MCL (70 g/L iniciais de glicerol, C/N = 100), a 28 °C e 200 rpm.....	134
Tabela 24	- Sequências consenso obtidas por sequenciamento do DNA correspondente à região D1/D2 da subunidade 26S do RNA ribossomal, a partir do alinhamento dos <i>primers</i> NL-1, NL-2A, NL-3A e NL-4, para as 6 linhagens de <i>Y. lipolytica</i> , 2 linhagens de <i>R. toruloides</i> e 1 linhagem de <i>S. cerevisiae</i> estudadas.....	151
Tabela 25	- Dados experimentais para as cinéticas de crescimento de linhagens de <i>Y. lipolytica</i> realizadas em meio MDBU (2,5 g/L iniciais de glicerol), 30 °C e 200 rpm.....	153
Tabela 26	- Dados experimentais para as cinéticas de crescimento de linhagens de <i>R. touloides</i> realizadas em meio MDBU (2,5 g/L iniciais de glicerol), 30 °C e 200 rpm.....	156
Tabela 27	- Dados experimentais para cultivos de acúmulo de lipídeos para todas as linhagens estudadas.....	166
Tabela 28	- Resultados obtidos por diversos autores em cultivos com linhagens de <i>Y. lipolytica</i> ou <i>R. toruloides</i> (já descritos no item 5 Resultados e discussões) (continuação).....	167

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Abs	Absorbância
Abs <sub>600</sub>	Absorbância a 600 nm
a <sub>w</sub>	Atividade de água
C/N	Razão carbono e nitrogênio
CFI	Capital fixo de investimento
CP	Custo de produção
CTP	Custo total de produção
FAME	<i>Fatty acid methyl ester</i>
g Lip	Gramas de lipídeos
g MS	Gramas de massa seca
g S	Gramas de substrato
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
Lip	Lipídeos
m/m	Proporção massa/massa
m/v	Proporção massa/volume
MCL	Meio complexo para lipídeos
MDBU	Meio definido Barth com ureia
OM	Óleo microbiano
PAL	<i>Phenylalanine ammonia lyase</i>
pb	Pares de base
P <sub>Lip</sub>	Produtividade em lipídeos
P <sub>X</sub>	Produtividade em biomassa
rDNA	DNA ribossomal
r <sub>S</sub> <sup>máx</sup>	Velocidade máxima específica de consumo de substrato
S	Substrato
SCO	<i>Single cell oil</i>
SCP	<i>Single cell protein</i>
TAG	Triacilglicerol
t <sub>d</sub>	Tempo de duplicação
t <sub>g</sub>	Tempo de geração
UFC	Unidades formadoras de colônias

v/v	Proporção volume/volume
VU	Valor unitário
X	Biomassa
YPD	<i>Yeast extract peptone dextrose</i>
YPDS	<i>Yeast extract peptone dextrose</i> solidificado
$Y_{X/S}^{exp}$	Fator de conversão de substrato em biomassa na fase exponencial
$Y_{X/S}^{global}$	Fator global de conversão de substrato em biomassa
$Y_{Lip/S}^{global}$	Fator global de conversão de substrato em lipídeos
$\mu$	Velocidade específica de crescimento
$\mu_{m\acute{a}x}$	Velocidade específica máxima de crescimento

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>19</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>22</b>
2.1 Etapas do trabalho.....	22
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>23</b>
3.1 Cinética do crescimento microbiano durante cultivos descontínuos .....	23
3.2 Uso da medida de absorvância para estimar a concentração celular durante o cultivo de microrganismos.....	30
3.3 Microrganismos oleaginosos .....	37
3.4 Leveduras oleaginosas .....	40
3.4.1 A levedura <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	41
3.4.2 A levedura <i>Rhodospiridium toruloides</i> .....	49
3.5 Produção industrial de óleo microbiano ( <i>single cell oil</i> ) .....	53
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>60</b>
4.1 Preparação de materiais estéreis .....	60
4.2 Fonte de carbono, meios de cultura e suplementos .....	60
4.2.1 Fonte de carbono .....	61
4.2.2 Meio <i>Yeast extract Peptone Dextrose (YPD)</i> .....	62
4.2.3 Meio definido <i>Barth com ureia (MDBU)</i> .....	62
4.2.4 Meio complexo para lipídeos ( <i>MCL</i> ) .....	62
4.3 Equipamentos.....	63
4.4 Microrganismos .....	63
4.5 Preparo das culturas estoque.....	65
4.6 Identificação das espécies .....	65
4.6.1 Extração de DNA genômico .....	65
4.6.2 Amplificação por <i>PCR</i> .....	67
4.6.3 Purificação, quantificação e confirmação .....	67
4.7 Cultivos para cinéticas de crescimento .....	68
4.7.1 Pré-inóculo.....	68
4.7.2 Inóculo .....	69
4.7.3 Cálculo do volume de inóculo.....	69
4.7.4 Centrifugação e ressuspensão do pellet celular .....	70
4.7.5 Cultivo .....	70

4.8 Espectrofotometria de varredura.....	71
4.9 Cultivos para acúmulo de lipídeos.....	72
4.9.1 Pré-inóculo.....	72
4.9.2 Inóculo .....	73
4.9.3 Centrifugação e ressuspensão do pellet celular .....	73
4.9.4 Cultivo .....	73
4.9.5 Massa seca .....	73
4.10 Cultivos para cinética de acúmulo de lipídeos.....	74
4.11 Extração de lipídeos.....	74
4.12 Métodos analíticos .....	75
4.12.1 Quantificação da concentração celular.....	75
4.12.2 Curva de calibração para conversão de absorbância em massa seca .....	75
4.12.3 Determinação da concentração de glicerol e metabólitos extracelulares.....	76
4.13 Tratamento de dados.....	76
4.13.1 Cálculo dos parâmetros fisiológicos.....	76
4.13.2 Cálculo dos parâmetros de processo .....	77
4.14 Análise estatística .....	78
4.15 Experimentos realizados durante este mestrado .....	78
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>81</b>
5.1 Identificação molecular das espécies.....	81
5.2 Relação entre medidas de absorbância e concentração celular.....	89
5.3 Cinéticas de crescimento de linhagens de <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	96
5.4 Cinéticas de crescimento de linhagens de <i>Rhodospiridium toruloides</i> .....	110
5.5 Teor de lipídeos em diferentes linhagens de <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	118
5.6 Teor de lipídeos em diferentes linhagens de <i>Rhodospiridium toruloides</i> .....	127
5.7 Potencial de <i>Yarrowia lipolytica</i> e <i>Rhodospiridium toruloides</i> para emprego em processos industriais visando à produção de óleo microbiano .....	133
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>138</b>
6.1 Sugestões para trabalhos futuros.....	139
<b>7 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>141</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>150</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>174</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Para este projeto de mestrado foi proposto um estudo sobre as leveduras oleaginosas *Yarrowia lipolytica* e *Rhodosporidium toruloides*, o qual foi realizado no Laboratório de Engenharia Metabólica e de Bioprocessos (LEMeB) da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), em colaboração com o Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEBp) da Faculdade de Engenharia Química (FEQ) da UNICAMP.

Este estudo tem relevância dentro do contexto da produção de biocombustíveis, mais especificamente do biodiesel. O biodiesel é constituído de ésteres de ácidos graxos e álcoois, sendo que tanto os ácidos graxos como os álcoois podem ter diferentes origens. Para os ácidos graxos, uma das rotas de obtenção estudadas atualmente é a conversão microbiana e uma das possibilidades mais interessantes é usar o glicerol, um abundante subproduto da própria fabricação do biodiesel, como fonte nutricional para o crescimento microbiano. Neste contexto, leveduras oleaginosas, que têm a capacidade de acumular grandes quantidades de lipídeos, principalmente na forma de triacilgliceróis, apresentam o potencial de converter o glicerol em ácidos graxos, o que contribuiria em duas frentes: aproveitamento e agregação de valor ao glicerol, resíduo da fabricação do biodiesel, e obtenção dos ácidos graxos necessários à reação de esterificação empregada na produção do biodiesel. Sendo assim, o estudo de diferentes espécies e linhagens de leveduras oleaginosas, tanto em termos da fisiologia durante o crescimento em meios contendo glicerol, como em termos de sua capacidade de acumular lipídeos, é altamente relevante.

Em 2014, foi defendida na USP, dentro do Grupo de Engenharia de Bioprocessos (GenBio), no Departamento de Engenharia Química, a seguinte dissertação de mestrado, desenvolvida por Oliveira (2014): “Análise fisiológica e cinética do crescimento da levedura oleaginosa *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 em diferentes fontes de carbono”. Neste trabalho, foram desenvolvidos protocolos básicos para o cultivo e caracterização fisiológica de linhagens selvagens de *Y. lipolytica*. Estes protocolos são diferentes daqueles empregados para estudos com a tradicional levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Mais recentemente, Bacciotti (2015) defendeu sua dissertação de mestrado no mesmo grupo de pesquisa, com o título “Fisiologia e formação de partículas lipídicas durante o crescimento da levedura *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682”. Neste trabalho, a autora explorou cultivos com restrição de nitrogênio no meio e procurou observar a formação de partículas lipídicas, que são as organelas em que a maior parte dos lipídeos é acumulada. Ambos os trabalhos acima foram orientados

pelo Prof. Andreas K. Gombert, que é também o orientador do presente trabalho, o qual buscou dar continuidade a esta linha de pesquisa.

O projeto de doutorado desenvolvido na Faculdade de Engenharia Química da Unicamp, por Bonturi (2016) e intitulado “Produção de óleo microbiano por cepas evoluídas de leveduras oleaginosas a partir de materiais hemicelulósicos visando a sua aplicação em biorrefinarias”, serviu de referência para aqueles cultivos realizados dentro do presente trabalho de mestrado, que tiveram como objetivo favorecer e quantificar o acúmulo de lipídeos nas leveduras *Y. lipolytica* e *R. toruloides*. Também veio do referido trabalho a ideia de estudarmos esta última espécie de levedura, juntamente com diferentes linhagens de *Y. lipolytica*.

*Yarrowia lipolytica* é uma levedura do grupo dos ascomicetos, estritamente aeróbia, não-fermentativa, tolerante a altas concentrações salinas, sendo um organismo dimórfico e classificado como uma levedura oleaginosa. Não assimila nitrato e é bastante conhecida por degradar óleos, gorduras e outros substratos hidrofóbicos, além de assimilar álcoois, acetato, ácidos orgânicos, hidrocarbonetos, ácidos graxos e proteínas. Possui uma gama de características de interesse industrial e biotecnológico (BANKAR; KUMAR; ZINJARDE, 2009; KURTZMAN, 2011; SUTHERLAND; CORNELISON; CROW JR., 2014).

*Rhodospiridium toruloides* é uma levedura do grupo dos basidiomicetos, também classificada como oleaginosa e considerada um organismo modelo para produção de lipídeos. Não é patogênica e pode assimilar uma variedade de resíduos industriais hidrofóbicos (óleos e gorduras) e açúcares (inclusive xilose); produz enzimas como cefalosporina esterase, fenilalanina amônia liase e epóxido hidrolase; além de ser conhecida como levedura vermelha (*red yeast*) por sua habilidade de produzir carotenóides (WIEBE et al., 2012; ZHU et al., 2012; LEE et al., 2014).

O termo “*single cell oil*” (SCO), ou óleo microbiano, é utilizado para designar óleos derivados de microrganismos oleaginosos, na forma de triacilgliceróis (TAG), a partir da conversão de dióxido de carbono, ácidos orgânicos, açúcares, hidrocarbonetos, resíduos das indústrias de alimentos ou águas contaminadas com petróleo. Este óleo é estruturalmente similar aos lipídeos de plantas e pode ser uma matéria-prima alternativa para substituir os TAGs vegetais na produção de biocombustíveis (RATLEDGE, 1993; NICOL; MARCHAND; LUBITZ, 2012; HUANG et al., 2013).

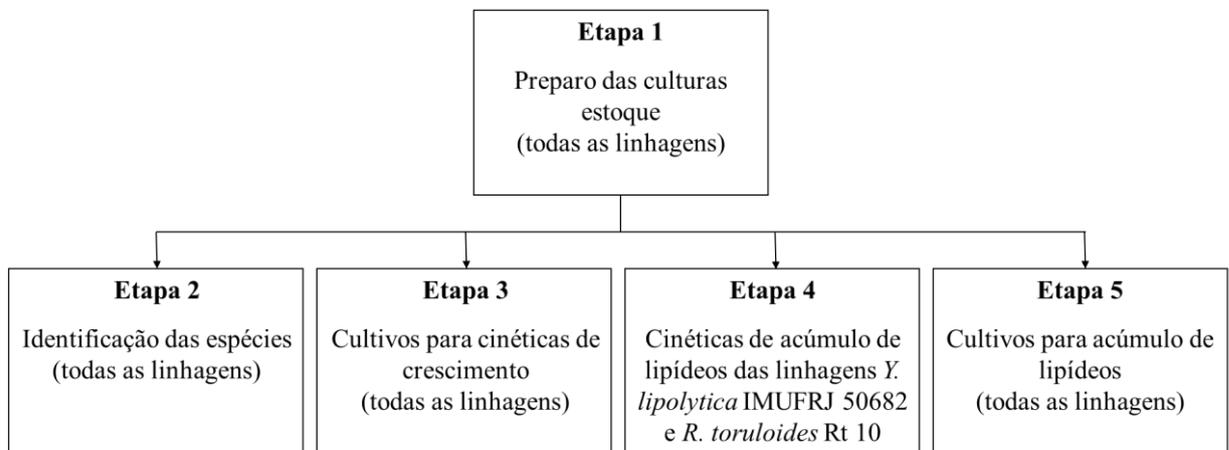
Diante do exposto acima, iniciou-se este projeto de mestrado com o cultivo de diferentes linhagens de *Y. lipolytica* num meio de cultivo totalmente definido com glicerol como única fonte de carbono e energia. Com isto, pretendeu-se realizar um estudo sobre a cinética de crescimento destas linhagens, que nos permitiria verificar quão diferentes (ou quão parecidas)

estas linhagens, todas pertencentes a mesma espécie, são em termos de parâmetros fisiológicos básicos, como velocidades específicas e fatores de conversão. Mais tarde, após o início de uma colaboração com o grupo de pesquisa do professor Everson Alves Miranda (FEQ/UNICAMP), foi incluída a espécie *R. toruloides* neste estudo, por se tratar também de uma levedura oleaginosa. Finalmente, este trabalho de mestrado foi concluído com o estudo da capacidade de acúmulo de lipídeos de todas as oito linhagens (pertencentes às espécies descritas acima), o qual foi realizado cultivando-se as mesmas num meio de cultivo propício para este acúmulo, conforme estabelecido por Bonturi (2016).

## 2 OBJETIVOS

O objetivo deste projeto de mestrado foi determinar e comparar parâmetros fisiológicos, parâmetros de processo e capacidade de acúmulo de lipídeos de seis linhagens da levedura *Yarrowia lipolytica* e de duas linhagens da levedura *Rhodospordium toruloides* cultivadas em glicerol como única fonte de carbono e energia.

### 2.1 Etapas do trabalho



### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta seção foram abordados tópicos referentes aos aspectos teóricos e práticos para a realização de cinéticas de crescimento microbiano, em cultivos descontínuos, bem como os cuidados a serem tomados quando medida de absorbância é utilizada como técnica para estimar a concentração celular durante estes cultivos. Foram levantadas informações sobre microrganismos oleaginosos, dando ênfase às leveduras oleaginosas *Y. lipolytica* e *R. toruloides*, as quais foram estudadas nesta dissertação de mestrado. Por fim, a produção industrial de óleo microbiano foi discutida em termos da possibilidade de utilização deste óleo para a produção de biodiesel, bem como os custos envolvidos para isto.

#### 3.1 Cinética do crescimento microbiano durante cultivos descontínuos

Se existisse uma primeira Lei da Biologia, seria: o propósito de um microrganismo é crescer ou se tornar outro microrganismo (RATLEDGE, 2006). Segundo Jannasch e Egli (1993), “crescimento” é a expressão que melhor descreve o comportamento dos organismos vivos e os fenômenos que envolvem sua sobrevivência, sendo o estudo dos aspectos cinéticos a melhor maneira de avaliar este crescimento. Além disso, já há muitos anos, Monod (1949) declarou que o estudo do crescimento bacteriano é o método básico da Microbiologia. Portanto, a maneira mais utilizada para entender e quantificar as características de crescimento celular dos microrganismos é a realização do estudo cinético do seu crescimento.

A descrição da cinética de crescimento microbiano pode ser utilizada para diferentes aplicações, como por exemplo: o entendimento fundamental de processos celulares; o desenvolvimento, simulação, otimização e controle de bioprocessos. Este tipo de estudo permite o cálculo de importantes parâmetros fisiológicos e de processo, a partir da medida das principais variáveis do processo: concentração celular (ou de biomassa), concentrações de substratos e concentrações de produtos (CINAR et al., 2003; NIELSEN, 2006).

Os estudos cinéticos são realizados normalmente em sistemas fechados, com o volume da reação constante, ou seja, através de processo descontínuo ou em batelada. Na prática, uma cinética microbiana (processo em batelada) se inicia com a inoculação (em tubo, frasco ou biorreator) de uma determinada população celular em meio de cultura estéril, contendo todos os nutrientes necessários para o crescimento do microrganismo (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2008). Após inoculado, o recipiente é incubado (no caso de biorreatores, há mecanismos de controle de temperatura e agitação que dispensam o uso de incubadoras) e são

realizadas amostragens periódicas, para determinação das concentrações de reagentes (substratos) e produtos (metabólitos), além da concentração celular, em função do tempo (DORAN, 1995; CINAR et al., 2003).

Para a descrição do crescimento celular, um importante parâmetro fisiológico pode ser determinado, a velocidade específica de crescimento, a qual corresponde à variação do número de células (ou massa celular) por unidade de tempo, dividida pelo número de células (ou massa celular). Esta variável é representada pela letra grega  $\mu$  e possui unidade dimensional de  $\text{massa} \cdot \text{massa}^{-1} \cdot \text{tempo}^{-1}$  ou simplesmente  $\text{tempo}^{-1}$ . Esta variação é resultado do ciclo de divisão das células, no qual todos os componentes estruturais da célula são duplicados, originando novas células. O fenômeno de uma célula originar duas novas células é denominado de geração (ou duplicação), sendo que o tempo necessário para que isso ocorra é chamado de tempo de geração ( $t_g$ ), ou tempo de duplicação ( $t_d$ ). Desta forma, o crescimento de uma população microbiana pode ser expresso tanto em termos da velocidade específica de crescimento, como em termos do tempo de duplicação, sendo que um é igual ao inverso do outro, multiplicado por  $\ln(2)$  (NIELSEN, 2006; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2008).

O aumento do número de células numa população em crescimento exponencial ocorre em progressão geométrica de razão 2. Portanto, há uma relação direta entre a concentração celular inicial do cultivo ( $X_0$ ) e a concentração celular, num momento qualquer ( $X$ ), após determinado período de crescimento exponencial, como apresentado na Equação 1, em que  $n$  é o número de gerações formadas.

$$X = X_0 \cdot 2^n \quad (1)$$

A coleta de amostras e a determinação da concentração celular em cada amostra, durante um estudo cinético, conforme descrito acima, possibilita a construção de uma curva de crescimento microbiano, a qual, em sua forma típica, pode ser dividida em quatro principais fases de crescimento da população de células, sendo elas (Figura 1):

1. Fase lag ou de adaptação: as células vindas do inóculo se adaptam ao novo ambiente em que foram inseridas; novas enzimas ou componentes estruturais são sintetizados, sendo a velocidade de crescimento celular praticamente zero. Esta fase é observada em diversas situações: 1) se as condições de cultivo como pH, temperatura, composição do meio de cultura, entre outros, forem diferentes das

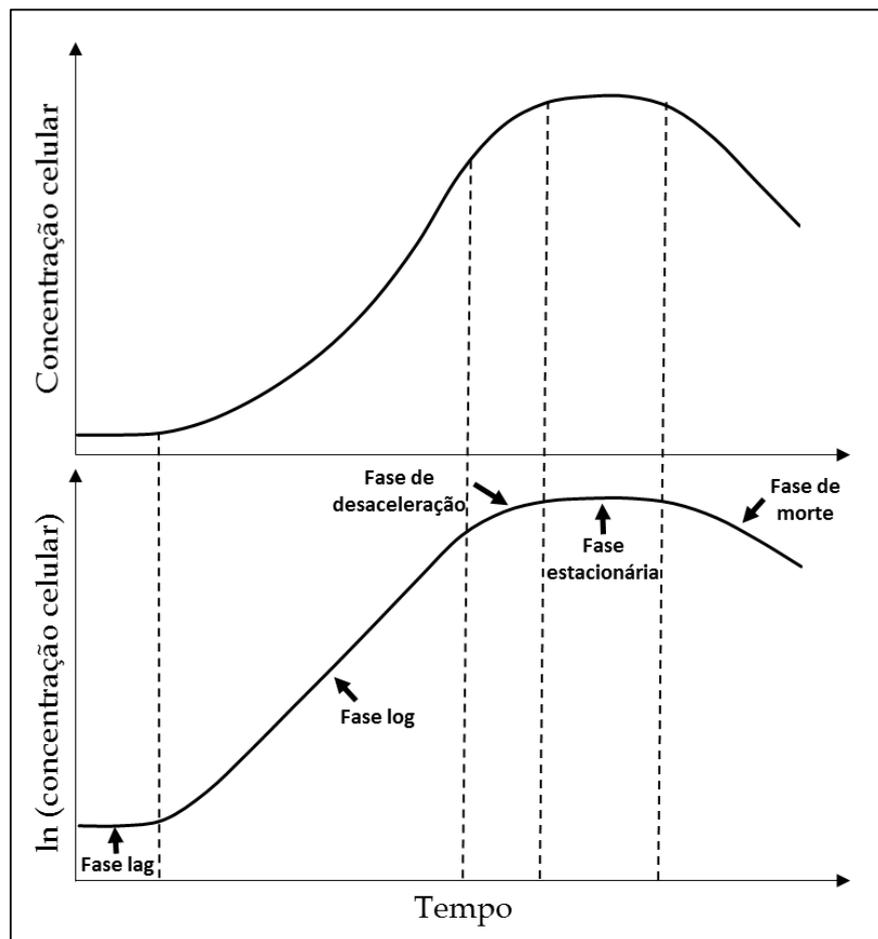
condições em que se desenvolveram as células do inóculo; 2) se as células do inóculo estiverem em fase estacionária, mesmo que as condições do novo cultivo sejam iguais àquelas em que se desenvolveram as células do inóculo; 3) se as células do inóculo sofrerem algum dano, mas continuarem viáveis; 4) quando o inóculo é proveniente de um meio de cultivo rico e transferido para um meio de cultura pobre. No entanto, se as condições do novo cultivo forem idênticas às condições em que se desenvolveram as células do inóculo e se estas forem transferidas para o novo cultivo em fase de crescimento exponencial, a fase lag não ocorrerá ou será muito curta (DORAN, 1995; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2008). Cabe ainda ressaltar que a fase lag muitas vezes não é observada pelo experimentador não porque ela não ocorra, mas porque o método analítico empregado para medida da concentração celular não a evidencia. Como exemplo, pode-se citar a medida da absorvância do meio de cultivo, que somente se torna sensível à presença de células a partir de uma quantidade mínima de células no meio, ou seja, caso a concentração celular seja menor que este valor, não se observará mudança na medida da absorvância (ver também item 3.2).

2. Fase log ou exponencial: após terem se adaptado ao meio, nesta fase, a população microbiana duplica-se em intervalos constantes de tempo. Nesta situação, ocorre o tempo de duplicação mínimo da população e também a velocidade específica máxima de crescimento. Esta é a fase em que as células estão no seu estado mais saudável e não há limitação nutricional, de maneira que se fala frequentemente em crescimento ilimitado nesta fase (DORAN, 1995; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2008).
3. Fase de desaceleração: esta fase é atingida quando passa a haver limitação de algum nutriente essencial para o crescimento celular, podendo-se definir limitação como a concentração de um determinado substrato baixa o suficiente para causar diminuição na velocidade específica de crescimento. Alternativamente, as células podem deixar a fase de crescimento exponencial (e entrar na fase de desaceleração) por algum efeito inibitório, causado pelo acúmulo de produto(s) inibidor(es) do crescimento. Nesta fase, a velocidade específica de crescimento diminui até zero, por este motivo esta fase também é denominada fase de redução de velocidade. Durante a desaceleração, o tempo de duplicação da população aumenta

gradativamente, até que a população para de se duplicar (DORAN, 1995; HISS, 2001).

4. Fase estacionária: nesta fase, não ocorre aumento ou diminuição da concentração celular, ou seja, a velocidade específica de crescimento é zero. A maioria das células não se duplica mais, mas pode acontecer de algumas células continuarem se multiplicando lentamente, enquanto outras morrem, mantendo a concentração celular praticamente constante (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2008).
5. Fase de morte ou de declínio: esta fase ocorre quando as células, mantidas nas mesmas condições, começam a morrer (ou perder sua viabilidade) a uma taxa expressiva. Em algumas culturas pode inclusive ocorrer lise celular nesta fase (DORAN, 1995; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2008).

**Figura 1 - Típica curva de crescimento microbiano em batelada**



Fonte: Adaptado de Doran (1995) e Hiss (2001)

As fases de crescimento podem ser melhor observadas e distinguidas quando os dados coletados são plotados em escala semi-log, como exemplificado na Figura 1, pois nesta situação a fase exponencial de crescimento é facilmente identificada como sendo o trecho linear da curva. Finalmente, cabe mencionar que a definição de cinco fases de crescimento (conforme acima) não é uma regra; muitos autores identificam fases intermediárias às cinco principais, como por exemplo: fase de aceleração do crescimento (entre as fases *lag* e *log*) e fase linear de crescimento (entre as fases *log* e de desaceleração) (MONOD, 1949; DORAN, 1995; HISS, 2001), mas isto depende muito da quantidade e qualidade dos pontos experimentais disponíveis e dos objetivos do estudo cinético.

Com os dados coletados num estudo cinético pode-se calcular parâmetros fisiológicos, os quais estão relacionados às características do microrganismo, e parâmetros de processo, comumente utilizados para desenvolvimento e escalonamento de bioprocessos. Além da variável concentração celular, normalmente representada pelo símbolo  $X$ , costuma-se medir também as concentrações de alguns substratos e produtos (representadas pelos símbolos  $S$  e  $P$ , respectivamente). É comum (mas não obrigatório) acompanhar-se a concentração do substrato que passará a ser limitante ao término da fase exponencial de crescimento e também a concentração de algum produto de interesse.

Em processos descontínuos (batelada), a variação da concentração celular em função do tempo depende da velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) e da concentração celular, como apresentado na Equação 2. Na fase exponencial de crescimento, a velocidade específica de crescimento é constante e máxima, sendo denominada velocidade específica máxima de crescimento e representada por  $\mu_{m\acute{a}x}$ . Esta velocidade específica máxima representa um importante parâmetro fisiológico, pois reflete o potencial máximo de crescimento de uma determinada espécie microbiana, numa dada condição ambiental. Nesta situação, a Equação 2 pode ser rearranjada e integrada, como indicado nas Equações 3, 4 e 5, onde  $X_0$  é a concentração celular no instante de início da fase exponencial de crescimento.

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (2)$$

$$\int_{X_0}^X \frac{dX}{X} = \int_{t_0}^t \mu \cdot dt \quad (3)$$

$$\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = \mu_{m\acute{a}x} \cdot t \quad (4)$$

$$\ln X = \ln X_0 + \mu_{m\acute{a}x} \cdot t \quad (5)$$

A equação 1 é também um balanço de massa de células num processo descontínuo, pois não há correntes de entrada ou saída, de maneira que a variação da concentração celular ocorre somente devido ao crescimento da população. Pela equação 5 observa-se que, quando o logaritmo neperiano da concentração celular (em vez da concentração celular em si) é plotado em função do tempo, tem-se durante a fase exponencial de crescimento um trecho linear crescente, com coeficiente angular (ou inclinação) igual a  $\mu_{m\acute{a}x}$  e coeficiente linear igual a  $\ln(X_0)$ . Este procedimento serve também para confirmar a existência de uma fase exponencial de crescimento e para se determinar os instantes de início e final desta fase (Figura 2-A) (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2008).

Durante a fase exponencial de crescimento, ou seja, quando as células se duplicam em intervalos constantes de tempo, a concentração celular no instante  $t = t_d$ , é duas vezes a concentração celular do início da fase exponencial (i.e.,  $X = 2 \cdot X_0$ ). Substituindo-se estas expressões na Equação 5 (após aplicado o exponencial ao logaritmo natural, Equação 5b) e rearranjando-se as equações (como indicado pelas Equações 6 e 7), obtém-se a expressão que relaciona o tempo de duplicação celular com  $\mu_{m\acute{a}x}$  (Equação 8).

$$X = X_0 \cdot e^{\mu_{m\acute{a}x} \cdot t} \quad (5b)$$

$$2X_0 = X_0 \cdot e^{\mu_{m\acute{a}x} \cdot t_d} \quad (6)$$

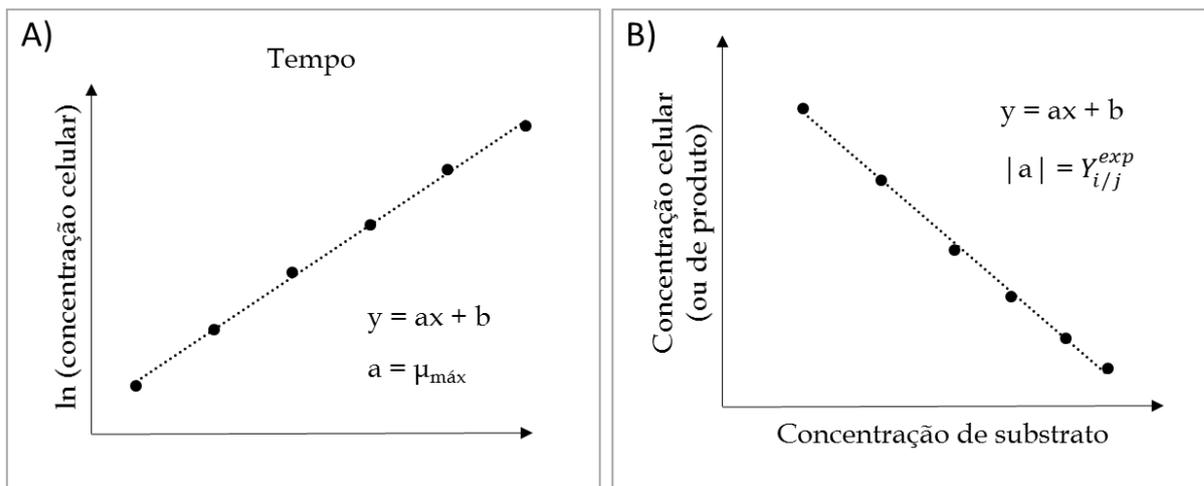
$$\ln 2 = \mu_{m\acute{a}x} \cdot t_d \quad (7)$$

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_{m\acute{a}x}} \quad (8)$$

Outra classe de parâmetros fisiológicos que podem ser calculados para células em fase exponencial de crescimento são os fatores de conversão. Pode-se definir e calcular tanto um fator de conversão de substrato em células, como fatores de conversão de substrato em produto. De maneira geral, pode-se representar estes parâmetros por  $Y_{i/j}^{exp}$ , onde o subíndice “i” indica uma variável de formação (X ou P); e o subíndice “j” uma variável de consumo (S). Para o

cálculo deste parâmetro, pode-se construir um gráfico da concentração celular (ou concentração de um determinado produto) em função da concentração de substrato, somente incluindo pontos pertencentes à fase exponencial, conforme definida acima para o cálculo de  $\mu_{\text{máx}}$  (Figura 2-B). Se a distribuição dos pontos neste gráfico apresentar a tendência de uma reta, isto significa que o fator de conversão em questão é constante durante a fase exponencial e pode portanto ser calculado como sendo o módulo do coeficiente angular (ou inclinação) da reta obtida a partir de uma regressão linear destes pontos.

**Figura 2 - Gráficos representativos para cálculo de parâmetros fisiológicos na fase exponencial de crescimento. A) cálculo da velocidade específica máxima de crescimento; B) cálculo do rendimento ou fator de conversão na fase exponencial**



Fonte: elaborada pela autora

Além da velocidade específica de crescimento, pode-se também definir e calcular outras velocidades específicas, quais sejam: de consumo de substrato e de formação de produto, sempre em relação a um determinado substrato consumido pelas células e a um produto gerado pelas mesmas, respectivamente. Parâmetros fisiológicos como as velocidades específicas indicam o fluxo de entrada e saída de moléculas nas/das células, sendo que a velocidade específica de consumo de substrato ( $r_s$ ) refere-se ao fluxo de entrada e a velocidade específica de produção de metabólitos ( $r_p$ ) representa o fluxo de saída, e podem ser obtidas pela Equação 9 para a fase exponencial de crescimento. As unidades dimensionais destes parâmetros são dadas em  $\text{massa} \cdot \text{massa}^{-1} \cdot \text{tempo}^{-1}$  (NIELSEN, 2006).

$$r_j^{\text{máx}} = \mu_{\text{máx}} / Y_{i/j}^{\text{exp}} \quad (9)$$

Dentre os parâmetros de processo, dois são considerados os mais importantes, o rendimento (ou fator de conversão) global ( $Y_{i/j}$ ), o qual representa a quantidade de produto formado – biomassa ou algum produto metabólico – por quantidade do substrato utilizado; e a produtividade ( $P_1$ ), representando a quantidade de produto formado por volume do fermentador, em determinado tempo (NIELSEN, 2006). Estes parâmetros podem ser obtidos matematicamente conforme Equações 15 a 17 apresentadas no item 4.13 (Tratamento de dados).

### **3.2 Uso da medida de absorvância para estimar a concentração celular durante o cultivo de microrganismos**

Conforme detalhado no item anterior, a concentração celular é a variável mais importante para a realização de estudos de cinética do crescimento microbiano. A determinação experimental desta concentração pode ser realizada de diferentes formas, sendo algumas delas as seguintes: 1) medida do número de células viáveis por volume, através de diluições seriadas e contagem em placas de Petri com meio de cultura apropriado (neste caso, emprega-se comumente a unidade unidades formadoras de colônia, UFC, por unidade de volume); 2) contagem direta de células por microscopia em câmara de Neubauer ou hemacitômetro, com ou sem diluição prévia (neste caso, emprega-se a unidade número de células por unidade de volume); 3) medida da massa seca de células, por filtração à vácuo ou centrifugação, seguida de secagem (neste caso, emprega-se por exemplo a unidade gramas de massa seca de células por litro, ou g MS/L); 4) contagem de células em sistemas automáticos de contagem de partículas, como por exemplo o Coulter Counter (neste caso, emprega-se a unidade número de partículas ou células por mililitro, ou células/mL) (MONOD, 1949; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2008).

O método de contagem direta por microscopia é uma maneira rápida de se estimar o número de células, no entanto, apresenta certas limitações, como: (1) não se distinguem células mortas de vivas, a não ser que sejam utilizados corantes específicos. Estes corantes têm a função de dar cor às células mortas, facilitando ao experimentador a visualização de células viáveis (vivas) e de células não viáveis (mortas); (2) células pequenas podem não ser notadas, devido à dificuldade de visualização; (3) exige uma concentração mínima de células para ser confiável (pelo menos  $10^6$  células por mL), ou seja, suspensões muito diluídas não devem ser analisadas por este método; (4) exige um certo grau de familiaridade do experimentador com a técnica, ou

seja, experimentadores inexperientes gerarão resultados não confiáveis (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2008).

O método da contagem de colônias por plaqueamento segue a premissa de que uma célula viável é aquela capaz de formar colônia em meio solidificado. Desta forma, a técnica se baseia na semeadura de volume conhecido de uma suspensão celular (normalmente em diferentes diluições) em placa contendo meio sólido, por espalhamento na superfície do meio (0,1 mL) ou por semeadura em profundidade (0,1 a 1 mL). A placa é incubada até a visualização a olho nu das colônias, e então faz-se a contagem das mesmas. É uma técnica bastante sensível, pois, em princípio, se houver apenas uma célula viável na amostra, a mesma será detectada. Porém, é um método trabalhoso e que somente gera resposta após 24 a 48 h, a partir da amostragem.

A medida da massa seca celular é realizada após secagem, em estufa ou forno de microondas, de determinado volume de uma suspensão celular. É relativamente simples, bastante precisa (os erros costumam ser menores que 2%), pode fornecer uma resposta cerca de 15 min após a amostragem (se for usado forno de microondas) e é adequada para uso com fungos filamentosos, os quais, por sua natureza, não são unicelulares e portanto não podem ser analisados pela demais técnicas aqui descritas. As limitações ocorrem quando do uso de suspensões muito diluídas ou quando há sólidos não dissolvidos no meio de cultivo (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2008).

Todos os métodos descritos acima são métodos diretos, pois de fato inferem diretamente a concentração celular. Parecem simples quando aplicados para avaliar poucas amostras ou quando o tempo necessário para se obter respostas não é um fator limitante. No entanto, durante a realização de estudos cinéticos microbianos ou mesmo em bioprocessos industriais, pode haver a necessidade de se obter respostas rápidas para a concentração celular ou de se usar métodos que sejam simples e baratos. Em alguns casos (por exemplo para efeitos de controle de processo), pode também ser necessário implementar um método de determinação da concentração celular *on line*, ou seja, que não dependa do processamento manual das amostras. Mesmo *on line*, em alguns casos, faz-se necessária a coleta e devolução da amostra, principalmente para evitar a retirada de volume do biorreator. O processo de amostragem automatizada e contínua pode ser realizado em biorreatores equipados com amostradores responsáveis por retirar, quantificar a amostra e devolver, assepticamente, o volume amostrado para o reator. Este processo de amostragem contínua é conhecido como *loop* e está apresentado na Figura 38 (ANEXOS). Um dos métodos mais empregados, que satisfaz estes critérios, é o método de medida da absorbância de uma suspensão microbiana. Trata-se de um método

indireto, ou seja, que requer calibração prévia contra um método direto, mas que é rápido, simples, barato, exigindo somente um espectrofotômetro (equipamento comumente presente nos laboratórios), ou um contador de partículas, para sua aplicação (MONOD, 1949, MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2008; MYERS et al., 2013).

Espectrofotômetros são equipamentos que promovem a transmissão de um feixe de luz através de uma amostra, sendo a luz transmitida (que atravessa toda a amostra) registrada por um detector que fica à jusante da amostra (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2008). Define-se assim os parâmetros Transmitância (T), como sendo a relação entre a intensidade da luz que passa pela amostra e é transmitida para o detector (I) e a intensidade da luz originalmente emitida ( $I_0$ ), como demonstrado pela Equação 10. Já a Absorbância (Abs), a qual está diretamente relacionada com a transmitância, é definida como a medida da perda na emissão da luz primária devido à absorção da luz pela solução ou componente presente na mesma, em determinado comprimento de onda (KOCH, 1970; MYERS et al., 2013). A aplicação da medida de absorbância é amplamente discutida em termos da Lei de Beer-Lambert. Esta lei relaciona a concentração de uma dada substância dissolvida numa amostra com a quantidade de luz absorvida por esta substância e está representada pela Equação 11 (MYERS et al., 2013).  $\varepsilon$  é o coeficiente de extinção molar (ou atenuação) da substância dissolvida na amostra e que absorve a luz (num dado comprimento de onda),  $c$  é a concentração desta mesma substância na amostra e  $l$  é o comprimento da trajetória da emissão de luz.

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (10)$$

$$Abs = -\log \left[ \frac{I}{I_0} \right] = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (11)$$

Quando a medida de absorbância é utilizada para mensurar concentração celular, o fenômeno envolvido na diminuição da intensidade da luz transmitida é diferente daquele descrito acima. Neste caso, a luz não é absorvida por uma substância dissolvida na amostra líquida, mas sim desviada pela presença de partículas sólidas (as células microbianas) suspensas na amostra líquida. Este fenômeno é denominado dispersão de luz ou turbidez. A Lei de Beer-Lambert é aplicável somente quando há absorção de luz por uma substância dissolvida na amostra, no entanto, a partir de certas hipóteses e aproximações – referentes à atenuação de luz – a Lei de Beer-Lambert pode ser aplicada para sistemas que dispersam luz. A atenuação de luz

causada pela absorbância se refere à luz que foi absorvida pela amostra, convertida em outra forma de energia e transmitida para o detector. Da mesma forma, a luz que é atenuada por causa da dispersão, deve ser primeiramente absorvida pela amostra, porém não é transmitida para o detector na mesma direção da luz inicialmente emitida. Em outras palavras, as partículas presentes na amostra absorvem a luz incidente e reemitem a luz em uma direção diferente, caracterizando o fenômeno de dispersão de luz por partículas em suspensão (KOCH, 1970; MYERS et al., 2013).

Por fim, é possível definir a técnica da medida da absorbância de suspensões celulares como um parâmetro que, na verdade, compreende dois importantes fenômenos: a absorção e a dispersão de luz, causadas pela presença de células em suspensão, e que pode ser aplicada pela Lei de Beer-Lambert (MYERS et al., 2013).

Independentemente de a Lei de Lambert-Beer se aplicar a substâncias dissolvidas ou não, o fato é que há uma relação linear entre a dispersão de luz causada por partículas numa suspensão e a quantidade de luz transmitida que atravessa a amostra num espectrofotômetro. Esta relação linear é válida num determinado intervalo de concentração das partículas em suspensão, como representado genericamente na Figura 39 (ANEXOS). Deste modo, é válido empregar a espectrofotometria como forma indireta de avaliação da concentração celular numa suspensão microbiana, desde que respeitada esta faixa de linearidade e desde que seja realizada uma correlação com alguma medida direta de concentração celular

Sabendo-se que absorbância pode ser um dos fenômenos envolvidos na medida da concentração celular, deve-se ter cuidado para que o equipamento não mensure o efeito da absorção da luz por outros componentes (diferentes das células) presentes na suspensão. Alguns componentes do próprio meio de cultura – minerais, fontes nutrientes, vitaminas, extrato de levedura, entre outros – ou produtos metabólicos podem interferir na medição da absorbância já que, em determinados comprimentos de onda, podem absorver luz. Desta forma, é necessário que o comprimento de onda escolhido para a medição da concentração celular não seja capaz de detectar os componentes do meio, ou seja, um comprimento de onda no qual a absorbância será medida em termos, apenas, da absorção e dispersão de luz causadas pelas partículas (i.e., as células) (MYERS et al., 2013). Em vista disso, os comprimentos de onda mais utilizados para medição da concentração celular, durante o cultivo de microrganismos, são 540, 600 ou 660 nm (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2008).

Por outro lado, quando se deseja quantificar a concentração de algum produto excretado pelas células para o meio, como por exemplo pigmentos, é necessário que o comprimento de onda escolhido para a medição da absorbância seja aquele capaz de detectar o

pico máximo da concentração do composto em questão (MYERS et al., 2013). Os carotenóides são um exemplo disto. Alguns microrganismos são capazes de produzir e excretar estes corantes para o meio de cultivo, os quais podem ser detectados entre 430 e 480 nm, devido à sua faixa de absorção de cor ocorrer do amarelo ao vermelho. Fora desta faixa, os carotenóides não são detectados pelo equipamentos, apesar de seu acúmulo ser visível a olho nu (SCHWARTZ et al., 2010).

Apesar de simples e rápida, a medida da absorbância gera valores que ainda não representam diretamente a variável de interesse, a concentração celular. Desta forma, para que a absorbância (uma técnica de medição indireta) possa ser utilizada para inferir a concentração celular, esta deve ser correlacionada com uma das técnicas diretas. A equação da Lei de Beer-Lambert pode ser utilizada para correlacionar concentração celular e absorbância a partir da suposição de que  $\epsilon$  e  $l$  são constantes. Sabe-se que o coeficiente de extinção molar  $\epsilon$ , também chamado de coeficiente de absorção, é um parâmetro próprio de cada substância e, para suspensões celulares, pode-se admitir que este coeficiente é constante. Além disso, o comprimento da trajetória da emissão de luz  $l$  normalmente é padronizado nos equipamentos como 1 cm e portanto, pode também ser considerado um parâmetro constante. Desta forma, a partir destas suposições, a equação da Lei de Beer-Lambert pode ser reescrita como demonstrado na Equação 12, em que  $[X]$  é a concentração celular e  $m$  é o fator de conversão de absorbância em concentração celular.

$$[X] = m \cdot Abs \quad (12)$$

Para determinar este fator de conversão de absorbância em concentração celular, é necessária a construção de uma curva de calibração que relacione a absorbância com uma das técnicas de medição direta já citadas acima, sendo que a determinação da massa seca de células por unidade de volume é a mais utilizada e mais importante medida direta de concentração celular (OLSSON; NIELSEN, 1997; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2008). A curva de calibração (que pode ser gerada a partir de dois ou mais pontos) é obtida a partir do cultivo do microrganismo de interesse até as células atingirem a fase exponencial de crescimento. Neste momento, uma alíquota do cultivo é retirada para medidas de absorbância e massa seca da suspensão celular na fase exponencial. A curva de calibração é então finalizada com a construção de um gráfico de massa seca em função da absorbância, ajustando uma linha de tendência linear passando pela origem do gráfico ( $x = y = 0$ ). O coeficiente angular, ou seja, a

inclinação da reta obtida, representa o fator de conversão de absorvância em massa seca. Portanto, após determinado o fator de conversão, basta multiplicá-lo pela absorvância medida durante a cinética de crescimento, em cada intervalo de tempo, para obter medidas da concentração celular em massa seca de células por volume, comumente em unidade de gramas de biomassa seca por litro (g/L), em função do tempo de cultivo.

Ainda sobre a curva de calibração, é importante ressaltar que a mesma deve ser construída para cada microrganismo (até mesmo diferentes linhagens de uma mesma espécie) e em condições idênticas às do cultivo para estudo cinético (i. e., meio de cultura, fontes nutrientes, complementos, temperatura e pH idênticos), pois o tamanho das células pode variar para diferentes microrganismos e para um mesmo microrganismo em diferentes condições ou estados fisiológicos (por exemplo fase exponencial ou fase estacionária). Finalmente, cabe mencionar que a medida da absorvância pode variar para diferentes espectrofotômetros, sendo primordial que a curva de calibração e as medições para monitoramento do crescimento microbiano sejam realizadas sempre no mesmo equipamento (KOCH, 1970).

Com relação ao equipamento em si, o espectrofotômetro, é importante entender que seu uso para medidas de concentração celular implica em alguns cuidados. Os espectrofotômetros possuem uma faixa de leitura confiável, denominada de faixa de linearidade. Esta faixa de linearidade se refere à relação entre a medida real da absorvância e o valor mensurado pelo equipamento. Suspensões contendo baixa concentração celular, como por exemplo na fase de adaptação (ou fase *lag*) são, as vezes, difíceis de mensurar com precisão, devido à presença de poucas partículas no meio. Por outro lado, suspensões contendo alta concentração celular, a partir da fase exponencial de crescimento, podem ter seus valores de absorvância distorcidos pela presença de muitas células. Neste segundo caso, a variação entre o real e o mensurado pode ocorrer quando uma partícula celular está posicionada “atrás” de outra célula, fazendo com que apenas a partícula da frente disperse luz e seja detectada; ou quando a luz desviada por uma célula sofra nova dispersão ao colidir em outra célula (KOCH, 1970; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2008; MYERS et al., 2013).

Portanto, para evitar distorções e poder considerar as medidas de absorvância uma boa alternativa para determinação da concentração celular em cultivos microbianos, deve-se trabalhar com o equipamento dentro dos limites de linearidade, os quais comumente vão até 0,4 ou 0,5, para culturas de leveduras (MYERS et al., 2013). Para solucionar o problema da baixa concentração celular, é comum que os cultivos celulares sejam iniciados com uma absorvância entre 0,1 e 0,2, para que a suspensão contenha células suficientes para a detecção do equipamento. Já com relação à presença de muitas células, é comum que a suspensão seja

diluída antes da leitura, quantas vezes for necessário, para que a medida esteja dentro da faixa confiável.

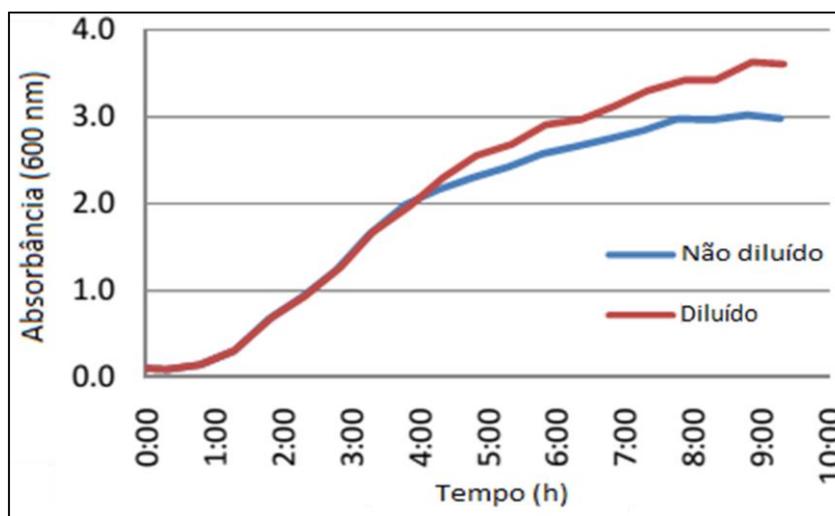
A diluição da suspensão celular deve sempre ser realizada com a mesma solução utilizada para zerar o equipamento, conhecida como “branco”. Existem diferentes soluções que podem ser utilizadas como branco: água ou solução salina, meio de cultura fresco ou sobrenadante do cultivo. Água e solução salina podem ser utilizadas quando o cultivo é realizado em meio de cultura definido e não há algum componente do meio que absorva luz e interfira na medição. Neste caso o próprio meio de cultura também pode ser utilizado como branco, porém o uso da água, por exemplo, é simples e evita gastos com os componentes do meio. Em cultivos realizados com meio complexo é recomendado que o mesmo meio, estéril, seja utilizado como branco, desta forma a contribuição que os componentes do meio possam causar na absorbância serão excluídos da medição. Além do mais, quando meio de cultura fresco é utilizado, um segundo cuidado é necessário: as análises devem ser realizadas rapidamente para que não haja flutuações na medida devido ao consumo dos nutrientes presentes no meio pelas células. Por fim, o sobrenadante do próprio cultivo pode ser utilizado como branco. Para isso, uma alíquota do cultivo deve ser centrifugada para coleta do sobrenadante que servirá como branco. Dentre as três opções, provavelmente esta última é a mais precisa, pois o equipamento irá mensurar apenas as células, uma vez que foi zerado com exatamente todos os componentes presentes no meio, no instante em que a amostragem foi realizada. Por outro lado, a centrifugação deve ser realizada a cada ponto de amostragem, tornando este método mais trabalhoso e demorado (MYERS et al., 2013). Além disso, este método implica no cultivo das células em maiores quantidades de meio, para que haja excedente para o uso na análise.

No boletim técnico T041 (2011) publicado pela empresa *Thermo Fisher Scientific* relata-se como a faixa de linearidade de um espectrofotômetro para medidas de concentração celular é identificada. Para isso, foram utilizadas como exemplo medidas de absorbância a 600 nm ( $Abs_{600}$ ) de uma cultura em batelada de *Escherichia coli* a cada 30 min, durante 9,5 h. As medidas foram realizadas através da leitura, em espectrofotômetro, de amostras diluídas e não diluídas do cultivo celular e os valores obtidos foram plotados em função do tempo de amostragem, conforme apresentado na Figura 3.

Através deste cultivo de *E. coli*, observaram que a divergência entre as duas curvas (diluída e não diluída) ocorre quando o limite superior da faixa de linearidade é excedido pelas amostras não diluídas. Ou seja, para o cultivo deste microrganismo, a melhor forma de realizar

medidas de  $Abs_{600}$  é através de diluição das amostras a partir do ponto em que as curvas se separam uma da outra ( $Abs_{600}$  igual a 2,0).

**Figura 3 - Cultivo em batelada de *E. coli* com medidas de  $Abs_{600}$  mensuradas a cada 30 min, diluídas e não diluídas**



Fonte: adaptado de boletim técnico T041 (2011) disponível em [www.nanodrop.com](http://www.nanodrop.com)

Por fim, vale ressaltar novamente que, por se tratar de organismos vivos, que se comportam de diferentes maneiras, o ideal é que a faixa de linearidade do equipamento seja testada, assim como a construção das curvas de calibração, para cada microrganismo e em cada condição de cultivo estudados, a fim de que as medidas registradas sejam as mais precisas possível.

### 3.3 Microrganismos oleaginosos

Muitos microrganismos como microalgas, fungos, leveduras e algumas bactérias, produzem lipídeos, porém poucos armazenam estes compostos em grandes quantidades (MENG et al., 2009). Desta forma, são considerados microrganismos oleaginosos aqueles que possuem a capacidade de armazenar lipídeos em mais que 20% de sua biomassa seca (RATLEDGE; WYNN, 2002; LIU et al., 2009; AGEITOS et al., 2011). Os lipídeos são classificados em três principais famílias: os glicolipídeos, os fosfolipídeos e os triglicerídeos ou triacilgliceróis (TAGs). Por serem os principais constituintes dos óleos vegetais, os TAGs são os lipídeos de maior interesse pelos setores de produção de biocombustíveis (DONOT et al., 2014).

A biossíntese de TAGs tem sido relatada com mais frequência em organismos eucarióticos. Esta habilidade de acumular lipídeos na forma de TAGs é restrita apenas a poucos grupos de microrganismos procarióticos. Em geral, as bactérias produzem compostos similares aos TAGs, chamados de lipídeos (p. e., polihidroxicanoatos). O acúmulo intracelular de TAGs tem sido reportado apenas em bactérias heterotróficas aeróbias (como por exemplo *Pseudomonas*) e em cianobactérias (como *Dietzia*, *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces* e *Acinetobacter*) (ALVAREZ; STEINBÜCHEL, 2002; MENG et al., 2009; DONOT et al., 2014). Por outro lado, microalgas, fungos e leveduras são capazes de acumular lipídeo na forma de TAGs de extração relativamente simples (MENG et al., 2009; AZÓCAR et al., 2010; DONOT et al., 2014).

As microalgas são organismos considerados capazes de realizar muito eficientemente a fotossíntese. Durante o processo fotossintético, as microalgas têm habilidade para converter a luz solar em energia química na forma de síntese de triglicerídeos. Isto é um indicativo de que estes organismos podem ser utilizados para a produção de biodiesel, o que ainda não é uma realidade comercial. No entanto, muitos pesquisadores acreditam no potencial deste tipo de processo para futuras aplicações comerciais (DEMIRBAS A.; DEMIRBAS M. F., 2011; SOARES et al., 2014).

A Tabela 1 apresenta alguns exemplos de bolores, microalgas e leveduras (dentre eles as leveduras *Yarrowia lipolytica* e *Rhodospiridium toruloides*), capazes de produzir e armazenar TAGs. Estas leveduras citadas podem utilizar, por exemplo, as seguintes fontes de carbono para produção de lipídeos: óleo (*Cryptococcus curvatus*); xilose, etanol e L-arabinose (*Lipomyces starkeyi*); glicose, glicerol e xilose (*Rhodospiridium toruloides*); glicose (*Rhodotorula glutinis*); hexoses, pentoses e glicerol (*Rhodotorula graminis*); e gordura animal e glicerol (*Yarrowia lipolytica*) (AGEITOS et al., 2011; POLI et al., 2014).

Bolores e leveduras oleaginosos são considerados os microrganismos mais favoráveis para a biossíntese de TAGs uma vez que são capazes de sintetizar lipídeos similares aos encontrados em plantas. Além do mais, alguns autores relataram que estes microrganismos possuem a habilidade de produzir lipídeos raramente encontrados em plantas ou animais, os quais possivelmente, após estudos específicos, também podem ser utilizados para produção de biocombustíveis (MENG et al., 2009; DONOT et al., 2014).

**Tabela 1 - Teor lipídico (massa lipídica/massa celular seca), perfil de ácidos graxos (massa do ácido graxo/massa lipídica total) de alguns microrganismos oleaginosos considerados para a obtenção de óleo microbiano**

	Teor lipídico (% m/m)	Principais resíduos de ácidos graxos (relação % m/m)											
		14:00	16:00	16:01	18:00	18:01	18:02	18:3 (n-3)	18:3 (n-6)	20:4 (n-6)	20:5 (n-3)	22:6 (n-3)	Outros
<b>Leveduras</b>													
<i>Cryptococcus curvatus</i>	58	—	32	—	15	44	8	—	—	—	—	—	
<i>Lipomyces starkeyi</i>	63	—	34	6	5	51	3	—	—	—	—	—	23:0 (3%)
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	66	—	18	3	3	66	—	—	—	—	—	—	24:0 (6%)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	72	—	37	1	3	47	8	—	—	—	—	—	
<i>Rhodotorula graminis</i>	36	—	30	2	12	36	15	4	—	—	—	—	
<i>Yarrowia lipolytica</i>	36	—	11	6	1	28	51	1	—	—	—	—	
<b>Bolores</b>													
<i>Entomophthora coronata</i>	43	31	9	—	2	14	2	—	4	4	—	—	20:1 (13%)
<i>Cunninghamella japonica</i>	60	—	16	—	14	48	14	—	8	—	—	—	
<i>Mortierella alpina</i>	50	—	19	—	8	28	9	—	8	21	—	—	20:3 (7%)
<i>Mucor circinelloides</i>	25	—	22	1	5	38	10	—	15	—	—	—	
<i>Pythium ultimum</i>	48	7	15	—	2	20	16	1	—	11	14	—	20:1 (5%)
<b>Algas (crescimento heterotrófico)</b>													
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	40	16	16	1	—	21	1	—	—	—	—	40	
<i>Schizochytrium limacinum</i>	50	4	56	—	1	—	—	—	—	—	—	30	15:0 (2%)
<i>Thraustochytrium aureum</i>	15	3	8	—	—	16	—	—	—	3	—	52	

Fonte: Adaptado de Ratledge e Wynn (2002)

### 3.4 Leveduras oleaginosas

Nas últimas décadas, a capacidade de acúmulo lipídico de leveduras tem sido alvo de muitos estudos, apesar desta capacidade já ter sido descrita muito tempo atrás. Estes estudos surgem com o intuito de entender os mecanismos envolvidos nesta habilidade a fim de melhorar e intensificar a produção de óleo microbiano, o qual pode ter várias aplicações de interesse para o homem (BEOPOULOS et al., 2009). As leveduras possuem grande vantagem em relação às microalgas, principalmente por crescerem com velocidades específicas muito maiores (KOUTINAS et al., 2014).

Contudo, as leveduras oleaginosas representam apenas uma pequena fração (em torno de 5%) de todas as leveduras conhecidas. Alguns exemplos de gêneros contendo espécies oleaginosas são: *Yarrowia*, *Rhodospiridium*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* e *Lipomyces*. As espécies mais conhecidas e estudadas são *Yarrowia lipolytica*, *Rhodospiridium toruloides*, *Rhodotorula glutinis* e *Lipomyces starkeyi* (AGEITOS et al., 2011).

Com o intuito de verificar o número de publicações científicas envolvendo as duas leveduras estudadas neste trabalho (*Y. lipolytica* e *R. toruloides*), buscas foram realizadas no portal eletrônico do banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>). A estratégia de busca foi usar termos específicos (*Yarrowia lipolytica* AND *lipids* OR *Yarrowia lipolytica* AND *single cell oil*) nos campos TITLE ou ABSTRACT, de forma a excluir trabalhos que somente citassem esta levedura. Procedimento de busca análogo foi realizado para a espécie *Rhodospiridium toruloides*. Os resultados das buscas estão detalhados nas Tabelas 2 e 3, para *Y. lipolytica* e *R. toruloides*, respectivamente.

Observa-se um número muito maior de publicações sobre *Yarrowia lipolytica*, se comparado à *R. toruloides*. A fim de se ter uma base de comparação, uma nova pesquisa foi realizada, utilizando-se o nome da levedura “*Saccharomyces cerevisiae*” nos campos TITLE ou ABSTRACT. A busca retornou 59111 publicações científicas, o que indica que a quantidade de estudos com leveduras oleaginosas ainda é muito inferior à quantidade de estudos com a levedura *S. cerevisiae*, que é um microrganismo modelo, amplamente empregado em bioprocessos, mas que não é oleaginoso.

Em seguida, serão fornecidas mais informações sobre as duas espécies de levedura estudadas neste trabalho: *Y. lipolytica* e *R. toruloides*.

**Tabela 2 - Número de publicações encontradas sobre a levedura *Y. lipolytica***

Search	Add to builder	Query	Items found
#3	<a href="#">Add</a>	Search (Yarrowia lipolytica[Title/Abstract]) AND single cell oil[Title/Abstract]	<a href="#">21</a>
#2	<a href="#">Add</a>	Search (Yarrowia lipolytica[Title/Abstract]) AND lipid[Title/Abstract]	<a href="#">124</a>
#1	<a href="#">Add</a>	Search Yarrowia lipolytica[Title/Abstract]	<a href="#">1122</a>

Fonte: National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), acesso em dezembro de 2015

**Tabela 3 - Número de publicações encontradas sobre a levedura *R. touloides***

Search	Add to builder	Query	Items found
#3	<a href="#">Add</a>	Search (Rhodosporidium toruloides[Title/Abstract]) AND single cell oil[Title/Abstract]	<a href="#">6</a>
#2	<a href="#">Add</a>	Search (Rhodosporidium toruloides[Title/Abstract]) AND lipid[Title/Abstract]	<a href="#">53</a>
#1	<a href="#">Add</a>	Search Rhodosporidium toruloides[Title/Abstract]	<a href="#">137</a>

Fonte: National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), acesso em dezembro de 2015

### 3.4.1 A levedura *Yarrowia lipolytica*

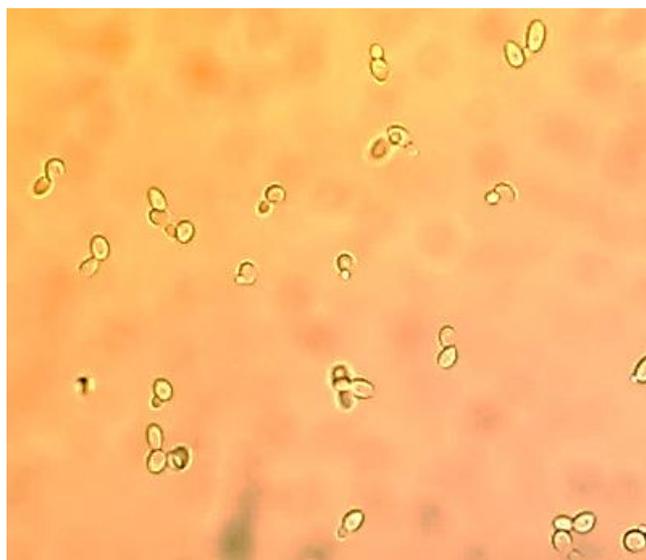
*Yarrowia lipolytica* van der Walt & von Arx (KURTZMAN, 2011) pertence ao grupo dos Ascomicetos (filo *Ascomycota*) e primeiramente foi classificada como pertencente ao gênero *Candida* (BARTH; GAILLARDIN, 1997; NICAUD, 2012), pois os pesquisadores não conseguiram identificar sua fase sexuada. Mais tarde, na década de 1960, esta levedura foi chamada de *Endomycopsis lipolytica* quando foi descoberta a formação de ascósporos (HEARD; FLEET, 1999; BANKAR; KUMAR; ZINJARDE, 2009).

Na década de 1970, van der Walt e Scott (1971) e von Arx (1972) fizeram estudos detalhados sobre as características das leveduras classificadas dentro dos gêneros *Endomycopsis* e *Saccharomycopsis* e apontaram que várias espécies foram classificadas erroneamente como pertencentes ao gênero *Endomycopsis* e que deveriam ser reclassificadas em outros gêneros. Além disso, afirmaram que *Saccharomycopsis* era um sinônimo obrigatório para *Endomycopsis*. Com base nestes estudos, foi proposto por Yarrow (1972) que a levedura *Endomycopsis lipolytica* fosse renomeada como *Saccharomycopsis lipolytica*.

Entretanto, esta classificação ainda causava confusão entre as informações obtidas para esta levedura, pois a mesma apresentava significativas diferenças em relação a outras espécies deste gênero, principalmente na morfologia dos ascósporos (i. e., diferem na estrutura dos ascósporos que são variáveis em tamanho e forma) e na sua habilidade em produzir a coenzima Q-9 (HEARD; FLEET, 1999), característica essa não encontrada em indivíduos do

gênero *Endomycopsis* ou *Saccharomycopsis*, os quais apresentam sistema de produção de coenzima Q-6, 7 ou 8 (VAN DER WALT; VON ARX, 1980). Consequentemente, van der Walt e von Arx (1980) criaram um novo gênero chamado de *Yarrowia* (em homenagem a David Yarrow) que, por mais de três décadas, compreendeu apenas uma espécie, a *Candida lipolytica*, então renomeada como *Yarrowia lipolytica* (Figura 4).

**Figura 4 - Imagem obtida a partir de um microscópio ótico de uma amostra contendo *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682**

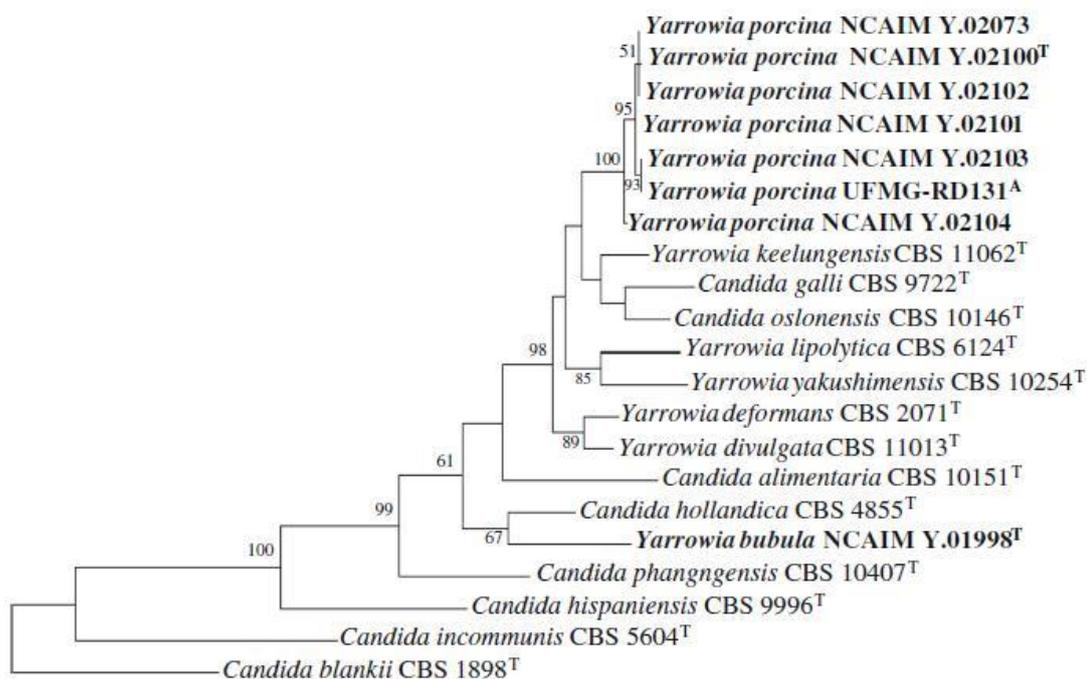


Fonte: arquivo da autora

A confirmação da existência de um novo grupo taxonômico para esta espécie resultou da construção de uma árvore filogenética envolvendo *Yarrowia* e espécies adjacentes (Figura 5), a partir do sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior (26S) do rDNA (HEARD; FLEET, 1999).

No ano de 2013, quatro novas espécies para o gênero *Yarrowia* foram propostas: *Y. divulgata* (NAGY et al., 2013), *Y. keelungensis* (CHANG et al., 2013), *Y. yakushimensis* e *Y. deformans* (GROENEWALD; SMITH, 2013). Esta última linhagem, desde a década de 70, era considerada e confirmada por vários autores como um sinônimo de *Yarrowia lipolytica*, porém em 2013 este estudo confirmou que se tratava de uma espécie diferente e foi reclassificada como uma nova espécie do gênero *Yarrowia* (GROENEWALD et al., 2014). No ano seguinte, mais duas novas espécies foram propostas por Nagy et al. (2014), sendo elas *Y. porcina* e *Y. bubula*.

**Figura 5 - Árvore filogenética da levedura *Yarrowia lipolytica* e espécies adjacentes construída a partir do sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do rDNA**



Onde: números nas barras representam a distância entre as espécies, sendo proporcionais ao número de substituições de bases na sequência. A espécie *Candida blankii* foi utilizada como *outgroup*

Fonte: Nagy et al. (2014)

*Yarrowia lipolytica* é uma levedura não-fermentativa e estritamente aeróbia (HEARD; FLEET, 1999; SUTHERLAND; CORNELISON; CROW JR., 2014). É conhecida pela capacidade de degradar óleos, gorduras e outros substratos hidrofóbicos com muita eficiência, pois possui vários genes codificadores de enzimas que os degradam. Além disso, pode metabolizar uma gama de álcoois, ácidos orgânicos, hidrocarbonetos, ácidos graxos e proteínas. Ela não assimila nitrato e a maioria das pentoses e hexoses, sendo a glicose uma exceção, pois pode ser metabolizada por esta levedura (Tabela 4) (BARTH; GAILLARDIN, 1997; HEARD; FLEET, 1999; FICKERS et al., 2005; BANKAR; KUMAR; ZINJARDE, 2009; KURTZMAN, 2011; SUTHERLAND; CORNELISON; CROW JR., 2014).

Kohlwein e Paltauf (1983) estudaram os mecanismos de transporte dos ácidos graxos para as células de duas leveduras e detectaram pelo menos dois sistemas de transporte para *Y. lipolytica*, sendo um específico para ácidos graxos de cadeia média (C<sub>12</sub> e C<sub>14</sub>) e outro para ácidos graxos de cadeia longa (C<sub>16</sub> e C<sub>18</sub>), saturados ou insaturados.

Apenas para citar um exemplo de trabalho de engenharia metabólica realizado com *Y. lipolytica*, Lazar et al. (2013) inseriram um gene da levedura *Saccharomyces cerevisiae* que

expressa a enzima invertase em quatro linhagens de *Y. lipolytica* com o objetivo de que as mesmas passassem a produzir ácido cítrico a partir de sacarose. Ao serem cultivadas, as linhagens apresentaram velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ) entre 0,096 e 0,161 h<sup>-1</sup> e fator de conversão de substrato em biomassa ( $Y_{X/S}$ ) entre 0,50 e 0,65 g.g<sup>-1</sup>. Na Tabela 5 são apresentados valores de  $\mu_{m\acute{a}x}$  e  $Y_{X/S}$  obtidos em alguns dos estudos já realizados com diferentes linhagens de *Y. lipolytica*.

**Tabela 4 - Caracterização do crescimento de *Yarrowia lipolytica* em meio líquido contendo diferentes compostos (fontes de carbono ou nitrogênio) ou na ausência de vitaminas**

Composto	Crescimento	Composto	Crescimento
Glicose	+	D-Ribose	v
Inulina	-	Metanol	-
Sacarose	-	Etanol	+
Rafinose	-	Glicerol	+
Melibiose	-	Eritritol	+
Galactose	v	Ribitol	v
Lactose	-	Galactiol	-
Trealose	-	D-Manitol	+
Maltose	-	D-Glucitol	+
Melezitose	-	<i>myo</i> -Inositol	-
Metil- $\alpha$ -D-Glicosídeo	-	DL-Lactato	+
Amido solúvel	-	Succinato	+
Celobiose	f/-	Citrato	+
Salicina	f/-	D-Gluconato	v
L-Sorbose	v	D-Glucosamina	-
L-Raminose	-	<i>N</i> -Acetil-D-Glucosamina	+
D-Xilose	-	Hexadecano	+
L-Arabinose	-	Nitrato	-
D-Arabinose	-	Ausência de Vitaminas	-

Onde: (+) apresenta crescimento; (-) não apresenta crescimento; (v) crescimento variável; (f/-) crescimento fraco ou ausente

Fonte: Adaptado de Kurtzman (2011)

O habitat primário da *Yarrowia lipolytica* ainda é desconhecido, porém sabe-se que esta levedura é tolerante a altas concentrações salinas (SUTHERLAND; CORNELISON;

CROW JR., 2014), como aquelas presentes no Mar Morto e no “*Great Salt Lake of Utah*”<sup>1</sup>. Já foi encontrada por Hagler e Mendonça-Hagler (1979) em ambiente marinho. Butinar et al. (2005), ao procurarem por várias espécies de leveduras em ambientes salinos e hipersalinos encontraram *Yarrowia lipolytica* em ambiente com 25% (m/v) de salinidade, nas salinas de Eilat na costa do Mar Vermelho em Israel. Estes pesquisadores inocularam as células coletadas em meio seletivo contendo 18% de glicerol e obtiveram contagem de 23 UFC.L<sup>-1</sup>.

**Tabela 5 - Velocidades específicas máximas de crescimento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ) e fatores de conversão de substrato em biomassa ( $Y_{X/S}$ ) para diferentes linhagens de *Yarrowia lipolytica* e fontes de carbono**

Linhagem de <i>Y. lipolytica</i>	Fonte de Carbono	Especificações do cultivo	$\mu_{m\acute{a}x}$ (h <sup>-1</sup> )	$Y_{X/S}$ (g.g <sup>-1</sup> )	Referência
Y 1095	Glicose	800 rpm / 27 °C / BR*	0,38	0,68	Rane e Sims (1993)
LGAM S(7)1	Glicerol	185 rpm / 28 °C / F**	0,21	0,27	Papanikolaou e Aggelis (2002)
LGAM S(7)1	Glicose	185 rpm / 28 °C / F**	0,25	0,19	Papanikolaou et al. (2002)
704	Óleo de colza	220 rpm / 28 °C / F**	0,28	0,64	Kamzolova et al. (2005)

Onde: (BR\*) biorreator; (F\*\*) frasco

Fonte: elaborada pela autora

Sabe-se ainda que *Y. lipolytica* é capaz de crescer em uma ampla faixa de pH (entre 2,0 e 8,0), suco gástrico e sais biliares (SUTHERLAND; CORNELISON; CROW JR., 2014), podendo ser encontrada em produtos cárneos (FICKERS et al., 2005; SUTHERLAND; CORNELISON; CROW JR., 2014); produtos lácteos (MCKAY, 1992; BARTH; GAILLARDIN, 1997), sobretudo em queijos (SUZZI et al., 2001; SUTHERLAND; CORNELISON; CROW JR., 2014); produtos derivados do petróleo; no armazenamento e processamento de produtos agrícolas; entre outros.

Heard e Fleet (1999) reportaram crescimento de *Y. lipolytica* em iogurte, leite e queijo estocados de 4 a 10 °C, apresentando forte crescimento com pH na faixa de 3,0 a 8,0, crescimento fraco em pH 2,0 e ausência de crescimento em pH 9,0. Também observaram fase *lag* de normalmente 1 dia e temperatura limite de crescimento de 37 °C. Crescimento de vários isolados na presença de 12,5% (m/v) de NaCl ( $a_w$  de 0,92) e de um isolado em 15% (m/v) de NaCl ( $a_w$  de 0,90), sendo que este fator explica a ocorrência frequente desta levedura em

<sup>1</sup> Grande Lago Salgado, Utah, Estados Unidos da América.

queijos. Segundo os pesquisadores, *Y. lipolytica* é também tolerante a altas concentrações de sacarose, podendo crescer na presença de até 50% (m/v) deste açúcar.

*Yarrowia lipolytica* está associada ao ser humano por causar infecção nos olhos (VAN UDEN E FELL, 1968<sup>2</sup> apud BUTINAR et al., 2005), na boca e na corrente sanguínea e pode causar infecção em pessoas que utilizam cateter ou outros dispositivos similares, sendo considerada, por um pequeno número de estudos clínicos, um microrganismo patogênico, porém de baixa virulência e inofensivo a pessoas com sistema imune saudável (SUTHERLAND; CORNELISON; CROW JR., 2014).

*Y. lipolytica* possui múltiplas características de interesse industrial e biotecnológico, que têm encorajado muitos pesquisadores a estudar detalhadamente suas aplicações (BANKAR; KUMAR; ZINJARDE, 2009; GONÇALVES; COLEN; TAKAHASHI, 2014). Produz lipases (possui 16 genes codificadores), proteases, urease, ácido cítrico (FICKERS et al, 2005; SUTHERLAND; CORNELISON; CROW JR., 2014) e desempenha função de degradar hidrocarbonetos para a produção de bioemulsificantes e biosurfactantes (SUTHERLAND; CORNELISON; CROW JR., 2014).

Já foram identificadas três proteases ácidas (com pH ótimo na faixa de 3,1 a 4,2), uma protease alcalina (pH ótimo 9,0), uma protease neutra, uma ribonuclease, pelo menos uma lipase e uma fosfatase ácida produzidas por *Y. lipolytica* crescendo em queijo (HEARD; FLEET, 1999; SUTHERLAND; CORNELISON; CROW JR., 2014). Além disso, produz enzimas como RNase e  $\alpha$ -manosidase, extra ou intracelularmente (HEARD; FLEET, 1999).

Em meados dos anos 60, com o surgimento do chamado “*single cell protein*” (SCP) – proteínas derivadas de fonte microbiana – o interesse pela *Y. lipolytica* cresceu devido ao conhecimento de que cepas desta levedura são capazes de utilizar *n*-parafinas como única fonte de carbono. Neste período, este substrato era abundante e de baixo custo, além disso, esta levedura é capaz de utilizá-lo para a produção de quantidades elevadas de ácido  $\alpha$ -cetoglutárico (TSUGAWA et al., 1969; BARTH; GAILLARDIN, 1997; FICKERS et al., 2005). Tsugawa et al. (1969), ao estudarem a produtividade de ácido  $\alpha$ -cetoglutárico a partir de *n*-parafinas, constataram que, dentre 141 cepas de leveduras estudadas, apenas cepas de *Yarrowia lipolytica* (ainda chamada de *Candida lipolytica*) possuíam alta habilidade de produzir este ácido orgânico. O ácido  $\alpha$ -cetoglutárico é um dos principais contribuintes para o metabolismo de

---

<sup>2</sup> van Uden, N. and Fell, J.W. (1968) Marine yeasts. *Adv. Microbiol. Sea* 1, 167–201.

proteínas e aminoácidos e um intermediário chave no ciclo do ácido cítrico (tricarboxílico ou ciclo de Krebs) (YIN et al., 2012).

Esta levedura pode ser utilizada para metabolizar resíduos das indústrias de alimentos, tendo como principal atividade a conversão de resíduos de óleos e gorduras em ácido cítrico e outros produtos de valor comercial. Células de *Y. lipolytica*, na forma livre ou imobilizadas em alginato de cálcio, fazem a biorremediação de efluentes da produção de óleo de oliva e palma, onde primeiramente convertem os óleos em glicerol e ácidos graxos e então a ácido cítrico. Na indústria de processamento de peixe, esta levedura pode também metabolizar os resíduos gerados e produzir lipídeos para serem utilizados na produção de farinha de peixe de alta qualidade. Quando cultivadas em queijo ou salsicha como substrato, células de *Yarrowia lipolytica* são capazes de produzir, primeiramente, ácidos graxos de cadeia curta e depois de cadeia longa, como ácidos palmítico, palmitoléico, esteárico, oleico e linoleico (SUTHERLAND; CORNELISON; CROW JR., 2014).

Alkasrawi et al. (1999) desenvolveram um biossensor com células imobilizadas de uma cepa psicotrófica de *Y. lipolytica*, isolada de solo contaminado por óleo, em esferas de vidro, para monitorar continuamente alcanos de cadeia média e Żogała et al. (2005) introduziram cepas de *Y. lipolytica* (A-101) em orifícios perfurados em solo contaminado com petróleo, realizando o monitoramento da biorremediação por métodos geoeletricos (eletromagnética e resistividade) e contagem microbiana.

Nas últimas décadas, com o desenvolvimento de ferramentas genéticas e moleculares, vários pesquisadores têm proposto o uso da *Yarrowia lipolytica* como modelo para entender mecanismos metabólicos (FICKERS et al., 2005). Beopoulos, Chardot e Nicaud (2009) realizaram um levantamento de informações, elencando as vantagens da utilização desta levedura oleaginosa para compreensão dos mecanismos envolvidos no metabolismo lipídico, envolvendo consumo, armazenamento, transporte e regulação, que desempenham papel importante na obesidade. Kerscher et al. (2004) descreveram a utilização da *Y. lipolytica* como um modelo para estudar e entender as mutações patogênicas no complexo I (NADH:ubiquinona oxirredutase) que, eventualmente, resultam em síndromes clínicas em seres humanos.

*Y. lipolytica* também pode produzir compostos para serem usados como aditivos em alimentos ou em medicamentos. Alguns exemplos são o eritritol (substituto do açúcar), o manitol (agente diurético), ésteres para conferir sabor e fragrância, como as lactonas (WACHÉ et al., 2003), monoacilgliceróis (ingrediente alimentício), cerebrosídeos (para pesquisas biomédicas), *L*-Dopa (droga utilizada para tratamento da Síndrome de Parkinson), entre outros (SUTHERLAND; CORNELISON; CROW JR., 2014).

Tsigie et al. (2012) cultivaram células de *Yarrowia lipolytica* Po1g em meio de cultura composto por hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar detoxificado (concentração total de açúcar de 20 g/L), peptona e extrato de levedura contendo leucina. O cultivo foi realizado em frasco a 160 rpm e 26 °C. A biomassa obtida do cultivo foi submetida a um pré-tratamento com água subcrítica, seguida da extração dos lipídeos por uma mistura de hexano:metanol (2:1, v/v). O óleo microbiano bruto foi tratado com etanol e hidróxido de potássio (KOH) a 60 °C. Os ácidos graxos foram separados e convertidos em seus respectivos ésteres metílicos de ácidos graxos (conhecidos como FAMES, do inglês “*Fatty Acid Methyl Ester*” – as moléculas que compõem o biodiesel). O rendimento de biodiesel obtido a partir do pré-tratamento da biomassa foi comparado ao obtido da biomassa sem pré-tratamento. Os resultados demonstraram que o pré-tratamento acarretou o aumento do rendimento de biodiesel em 2 vezes, sendo de 21,9 % (m/m) para a amostra sem pré-tratamento e 40,2 % (m/m) para a amostra pré-tratada.

Mais recentemente, Tsigie et al. (2013) realizaram um novo estudo propondo a obtenção de biodiesel a partir da biomassa de *Y. lipolytica* Po1g (nas mesmas condições do estudo anterior), porém sem o uso de catalisadores ácidos ou básicos. Os pesquisadores observaram que este é um processo possível, ambientalmente amigável e eficiente, mas que ainda necessita de mais estudos para minimizar a quantidade de metanol utilizada e o tempo de reação, para obter maior rendimento.

Oliveira (2014) realizou estudos fisiológicos com as leveduras *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 e W29, em diferentes fontes de carbono, com o objetivo de desenvolver um protocolo específico de cultivo para esta linhagem, em meio de cultivo totalmente definido. Neste trabalho, determinou ainda a melhor temperatura de incubação, capacidade biossintética, assimilação de diversas fontes de carbono e tolerância ao estresse salino. Desta forma, este estudo definiu um meio de cultivo adequado para crescimento de *Y. lipolytica* e comprovou que esta levedura utiliza um metabolismo energético puramente respiratório, que assimila glicose ou glicerol como única fonte de carbono e que a presença de tiamina é indispensável ao seu crescimento.

Após definido o meio de cultivo (denominado meio definido Barth com ureia ou MDBU), a temperatura do cultivo (28 °C) e a fonte de carbono (glicose ou glicerol), Oliveira (2014) realizou cinéticas de crescimento com as linhagens, a fim de comparar seus parâmetros fisiológicos. Com isto, concluiu que, em meio de cultura totalmente definido, a linhagem *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 apresentou maiores velocidades específicas máximas de crescimento e de consumo de substrato, nas duas fontes de carbono, porém menores fatores de conversão de

substrato em biomassa, em relação à linhagem *Y. lipolytica* W29, conforme valores apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6 - Parâmetros fisiológicos obtidos para as linhagens *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 e *Y. lipolytica* W29, cultivadas em meio definido, com glicerol ou glicose como fonte de carbono**

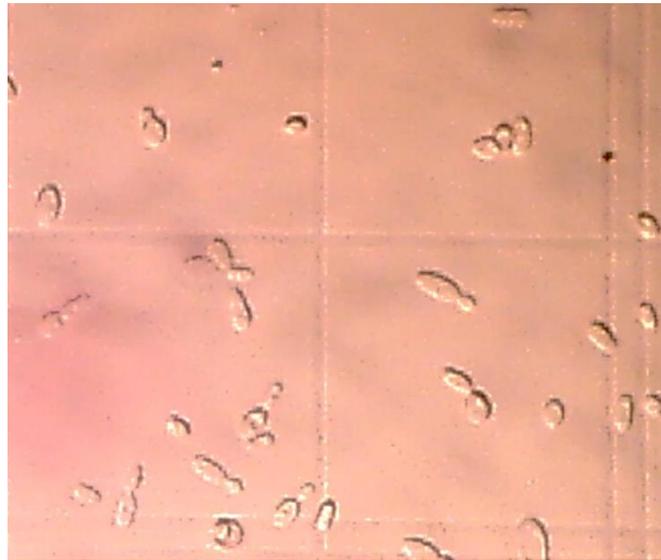
Parâmetros Cinéticos	W29	IMUFRJ 50682
$\mu_{máx}$ em Glicose [ $h^{-1}$ ]	$0,27 \pm 0,01$	$0,35 \pm 0,01$
$\mu_{máx}$ em Glicerol [ $h^{-1}$ ]	$0,36 \pm 0,01$	$0,46 \pm 0,02$
$Y_{X/S}^{exp}$ para Glicose [(g MS).(g S) $^{-1}$ ]	$0,35 \pm 0,01$	$0,32 \pm 0,01$
$Y_{X/S}^{exp}$ para Glicerol [(g MS).(g S) $^{-1}$ ]	$0,51 \pm 0,00$	$0,48 \pm 0,02$
$r_S^{máx}$ para Glicose [(g S).(g MS.h) $^{-1}$ ]	$0,76 \pm 0,03$	$1,10 \pm 0,02$
$r_S^{máx}$ para Glicerol [(g S).(g MS.h) $^{-1}$ ]	$0,71 \pm 0,00$	$0,96 \pm 0,04$

Fonte: Adaptado de Oliveira (2014)

### 3.4.2 A levedura *Rhodospordium toruloides*

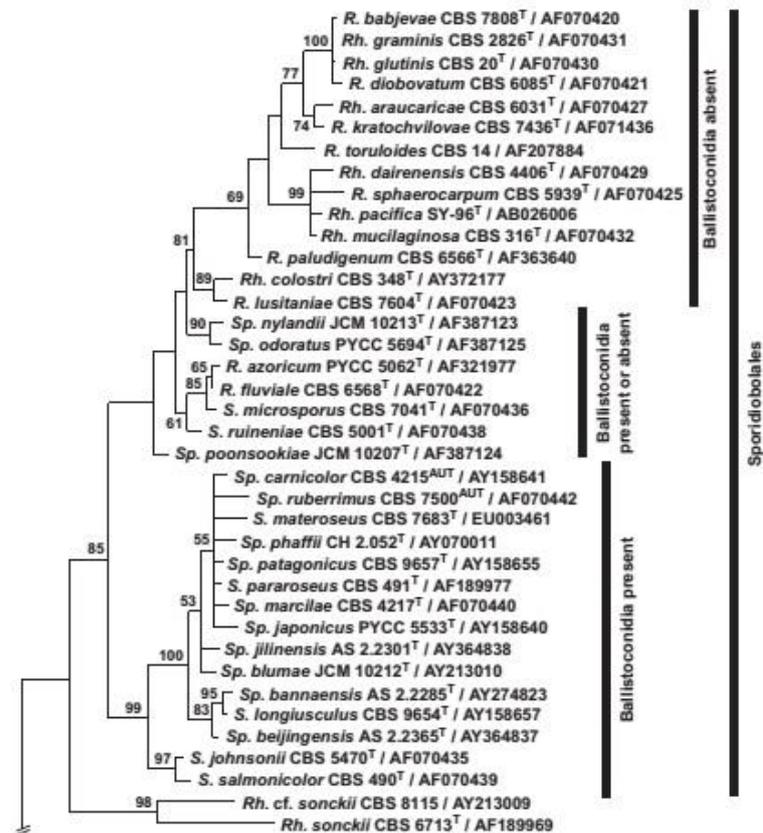
*Rhodospordium toruloides* Banno (SAMPAIO, 2011), apresentada na Figura 6, é uma levedura pertencente ao grupo dos Basidomicetos (filo *Basidiomycota*). A princípio, devido à falta de informações, esta levedura foi considerada como pertencente à espécie de *Rhodotorula glutinis*, por apresentar similaridades fisiológicas. Entretanto, em 1967, o pesquisador I. Banno comprovou as diferenças entre estas espécies através de métodos moleculares e, a partir disto, esta levedura passou a ser chamada de *R. toruloides* (ABE; KUSAKA; FUKUI, 1975). Dentro do gênero *Rhodospordium* (Figura 7), a espécie *R. toruloides* é a única incapaz de assimilar *L*-sorbose e uma, dentre apenas duas, capaz de crescer a 37° C. Além disso, *R. toruloides* apresenta sistema de produção de coenzima Q-9, sendo que as outras espécies apresentam sistema para a coenzima Q-10 (SAMPAIO, 2011). Apesar de ter sido comprovada a diferença entre estas espécies, alguns estudos ainda citam que *R. toruloides* também é conhecida como *Rh. glutinis*.

Figura 6 - Imagem obtida a partir de um microscópio ótico de uma amostra contendo *R. toruloides* CCT 0783



Fonte: arquivo da autora

Figura 7 - Árvore filogenética da levedura *Rhodosporidium toruloides* e espécies adjacentes construída a partir do sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do rDNA



Onde: números nas barras representam a distância entre as espécies, sendo proporcionais ao número de substituições de bases na sequência

Fonte: Sampaio (2011)

*R. toruloides* é uma levedura não fermentativa, não patogênica, estritamente aeróbica, pode assimilar uma gama de compostos, inclusive xilose (Tabela 7), (SAMPAIO, 2011; LEE et al., 2014) pode produzir importantes enzimas como cefalosporina esterase, fenilalanina amônia liase e epóxido hidrolase (ZHU et al., 2012), possui tolerância a compostos inibidores presentes em hidrolisados de biomassa lignocelulósica e alguns líquidos iônicos utilizados em pré-tratamentos de biomassa. E também considerada um potencial microrganismo que pode ser melhorado geneticamente para a produção de vários metabólitos (LIN et al., 2014).

**Tabela 7 - Caracterização do crescimento de *Rhodosporidium toruloides* em meio líquido contendo diferentes compostos (fontes de carbono ou nitrogênio) ou na ausência de vitaminas**

Composto	Crescimento	Composto	Crescimento
Glicose	+	D-Ribose	+
Inulina	–	Metanol	–
Sacarose	+	Etanol	+
Rafinose	+	Glicerol	+
Melibiose	–	Eritritol	–
Galactose	+/s	Ribitol	+
Lactose	–	Galactiol	–
Trealose	+	D-Manitol	+
Maltose	+	D-Glucitol	+/s
Melezitose	+	myo-Inositol	–
Metil- $\alpha$ -D-Glicosídeo	+	DL-Lactato	v
Amido solúvel	–	Succinato	+
Celobiose	+	Citrato	+/s
Salicina	+	D-Gluconato	s
L-Sorbose	–	D-Glucosamina	–
L-Raminose	–	N-Acetil-D-Glucosamina	n
D-Xilose	+	Hexadecano	n
L-Arabinose	+	Nitrato	+
D-Arabinose	+	Livre de Vitaminas	+

Onde: (+) apresenta crescimento; (–) não apresenta crescimento; (v) crescimento variável; (s) apresenta crescimento porém lento; (n) sem dados

Fonte: Adaptado de Sampaio (2011)

Estudos reportaram que *R. toruloides* pode acumular em mais de 50% de sua massa seca na forma de lipídeos, capacidade pela qual chama a atenção de muitos estudiosos, sendo

este o tema da maior parte das pesquisas realizadas com esta levedura (WIEBE et al., 2012). Além disso, dedica-se atenção para sua capacidade de produzir carotenóides, sendo esta produção visível ao olho humano, pois os cultivos realizados com esta levedura apresentam coloração de rosa a laranja (SAMPAIO, 2011; LEE et al., 2014). Por possuir esta característica, é também conhecida como “*red yeast*” (levedura vermelha) (ZHU et al., 2012) ou “*pink yeast*” (levedura rosa) (DIAS et al., 2015).

*Rhodospiridium toruloides* pode ser encontrada em diferentes habitats, desde ambientes marinhos até solos e plantas. Algumas linhagens foram isoladas em águas ácidas de minas, por isto alguns autores sugerem que elas estão adaptadas para crescer a baixo pH e altas concentrações de metais tóxicos (SAMPAIO, 2011). Além disso, esta levedura também foi isolada do ar no Japão, como é o caso da linhagem *R. toruloides* CCT 0783.

Em estudo realizado por Baldi, Pepi e Fava (2003), foi comprovado que *R. toruloides* é capaz de crescer em enxofre orgânico do dibenzotiofeno, um composto derivado do petróleo, quando há glicose no meio de cultura. Desta maneira, *R. toruloides* pode ser utilizada para remoção biológica de enxofre em combustíveis fósseis, com o objetivo de diminuir óxidos de enxofre produzidos durante sua combustão.

Adachi et al. (1990), utilizaram *R. toruloides* para produzir a enzima fenilalanina amônia-liase (PAL, do inglês “*phenylalanine ammonia-lyase*”), a qual foi purificada e cristalizada a fim de se obter o maior grau de pureza possível. A PAL foi produzida a partir do cultivo da *R. toruloides* IFO 0559 em meio de cultura contendo minerais, extrato de levedura, sacarose e *L*-fenilalanina como indutor da produção da enzima. O cultivo foi realizado a 30 °C, por 24 h e com vigorosa agitação, a suspensão celular foi submetida a um tratamento térmico a 50 °C por 5 min, para uma primeira purificação, seguida de uma segunda purificação em coluna cromatográfica. As enzimas purificadas foram então cristalizadas com sulfato de amônio e analisadas quanto às características físico-químicas. Esta enzima é comum em muitas plantas e fungos e cataliza a reação de eliminação de amônia da *L*-fenilalanina. Por esta razão, a PAL é amplamente indicada para a eliminação de *L*-fenilalanina da dieta de recém-nascidos portadores da doença fenilcetonúria.

Dias et al. (2015) realizaram experimentos em batelada alimentada (ou cultivo descontínuo alimentado, “*fed-batch*”) utilizando a estratégia de controle de pH em dois estágios, com o objetivo de melhorar a produção de lipídeos e carotenóides por *R. toruloides*. Para isso, a primeira etapa consistiu em incubação de um volume fixo de 2850 mL de meio de cultivo contendo minerais, elementos-traço, glicose (fonte de carbono) e sulfato de amônio e extrato de levedura (fontes de nitrogênio), em reator de 7,0 L, com o pH do meio ajustado para 5,5, por

24 h, a 30 °C e oxigênio dissolvido em 40 a 50%. Ao fim desta etapa, o reator começou a ser alimentado com meio de cultura estéril contendo sulfato de magnésio, glicose e extrato de levedura, para aumentar a fase exponencial e induzir o crescimento celular. Quando as células atingiram fase estacionária, o reator passou a ser alimentado com uma solução de glicose 60%, a fim de induzir a fase de acúmulo. Foram realizados experimentos com quatro diferentes condições de cultivo, sendo eles: (1) pH do meio ajustado para 5,5; (2) pH 4,0 para aumentar a concentração celular e produtividade em biomassa; (3) pH 4,0 durante a fase de crescimento e ajuste para pH 5,0 durante a fase estacionária, para aumentar o acúmulo de carotenóides e a produtividade em carotenóides; e (4) cultivo idêntico ao experimento 3, porém com uma turbina adicional para evitar limitação de oxigênio. Com isso, concluíram que a mudança de pH de 4 para 5 na fase de acúmulo, aumentou as produtividades em biomassa, lipídeos e carotenóides. Além disso, concluíram que a adição de outra turbina contribuiu grandemente para o aumento da produção destes produtos, confirmando que o oxigênio desempenha importante papel na produção de carotenóides por esta levedura.

Bonturi et al. (2015) estudaram quatro métodos para extração de lipídeos produzidos por linhagens de *R. toruloides* e *Lipomyces starkeyi*, combinados com dois pré-tratamentos (ácido ou enzimático) das células e sem pré-tratamento. As linhagens foram cultivadas, separadamente, em biorreator de 3 L, operando em cultivo descontínuo (batelada) e utilizando uma mistura de glicose e xilose, como fontes de carbono, e extrato de levedura e sulfato de amônia, como fontes de nitrogênio, resultando em uma razão C/N de 116. Após cultivadas, as células foram submetidas aos diferentes métodos de extração, os quais foram avaliados quanto à porcentagem de lipídeos extraídos. Os autores concluíram que o melhor método para extração dos lipídeos acumulados por estas leveduras é o método de Folch et al. (1957) sem pré-tratamento – ou seja, com as células intactas. Através deste método, as leveduras atingiram porcentagens de acúmulo lipídico de 42 e 47% para *R. toruloides* e *L. starkeyi*, respectivamente.

### **3.5 Produção industrial de óleo microbiano (*single cell oil*)**

Diversos setores industriais, como por exemplo de alimentos, químicos e energia, têm grande interesse por lipídeos, principalmente na forma de TAGs. Estes compostos podem ser produzidos por microrganismos e extraídos por tratamento químico ou mecânico (DONOT et al., 2014). A produção desses compostos por leveduras desempenha também um papel importante na manutenção da saúde humana, uma vez que os ácidos graxos poli-insaturados essenciais produzidos por estes microrganismos podem ser incorporados na dieta humana

(PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2011; HUANG et al., 2013). TAGs podem também ser utilizados para produção de cosméticos, produtos farmacêuticos, tintas e lubrificantes, dentre outros. A produção microbiana de TAGs apresenta a vantagem, em relação à produção a partir da extração vegetal, de não ser sazonal, não dependendo das condições ambientais ou geográficas (KOUTINAS et al., 2014).

A diminuição e a insegurança da oferta de petróleo, bem como as consequências ambientais de sua exploração e da utilização de seus derivados, têm sido os principais motivos que impulsionam e atraem a atenção de pesquisadores para os biocombustíveis, como alternativas aos combustíveis fósseis (MENG et al., 2009; PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2011; POLI et al., 2014). Uma opção já utilizada atualmente é a produção do biodiesel, composto por ésteres de ácidos graxos e álcoois, a partir de espécies de plantas oleaginosas, como por exemplo o óleo de colza e canola na Europa (POLI et al., 2014) e a partir de mamona, dendê, canola, girassol, amendoim, soja e algodão, no Brasil. Além disso, sebo bovino e gordura suína também podem servir como matéria-prima (PETROBRÁS, 2014). Mais de 95% do biodiesel produzido no mundo é proveniente de óleos vegetais (AZÓCAR et al., 2010). Entretanto, a crescente demanda por áreas destinadas à produção destas oleaginosas, visando à produção de biocombustíveis, tem concorrido com as plantações de alimentos e acarretado o aumento de seus preços, além de intensificar o debate existente sobre a competição entre cultivares destinados à produção de alimentos e cultivares destinados à produção de biocombustíveis, por áreas agriculturáveis (KOUTINAS et al., 2014; POLI et al., 2014).

Neste contexto, os ácidos graxos de origem microbiana podem ser uma matéria-prima alternativa para a produção de biocombustíveis, tornando-se evidente que a produção destes lipídeos exercerá forte influência no futuro, principalmente pelo seu potencial para resolver a atual crise energética (LI; DU; LIU, 2008; HUANG et al., 2013).

A produção de *single cell oil* (SCO), ou óleo microbiano, obtido a partir de microrganismos oleaginosos, está entre as opções para a produção de biodiesel de segunda geração (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2011; POLI et al., 2014; SITEPU et al., 2014). Biocombustíveis de primeira geração (1G) são obtidos a partir de matérias-primas alimentícias (p. e., açúcares, óleos vegetais, entre outros). Em contrapartida, os biocombustíveis de segunda geração (2G) podem ser obtidos a partir de matérias-primas não alimentícias e mostram-se vantajosos em relação aos de 1G por não concorrem com a produção de alimentos (NAIK et al., 2010). O termo *single cell oil* é utilizado para designar óleos de fonte microbiana, que podem ser obtidos a partir da conversão de substratos como dióxido de carbono, ácidos orgânicos, açúcares, hidrocarbonetos, resíduos das indústrias de alimentos, águas contaminadas

com petróleo ou outros resíduos industriais, como o glicerol, subproduto da produção do próprio biodiesel (LIU et al., 2009; SITEPU et al., 2014). O termo *single cell oil* faz analogia ao termo “*single cell protein*”, cunhado na década de 1960, quando se pretendia substituir uma parte da proteína animal consumida por humanos por proteína microbiana (RATLEDGE, 1993).

Em seu trabalho sobre o uso de fungos para bioconversão de glicerol bruto, Nicol, Marchand e Lubitz (2012, p. 1868) descreveram que:

The term single cell oil (SCO) refers to the ability of some microbes, typically described as oleaginous, to produce relatively large amounts of lipid. This term also implies that the microbial lipids are structurally similar to the plant-based lipids conventionally used in industrial applications and could therefore be used to replace these plant triacylglycerols.

O estudo e a consideração do uso de microrganismos para produção de óleos através da conversão de carboidratos alcançou grande proporção na Alemanha durante a Primeira Guerra Mundial. Porém, sua produção obteve certo grau de sucesso apenas na Segunda Guerra Mundial (HESSE, 1949; RATLEDGE; WYNN, 2002)

Segundo Meng et al. (2009), para que o biodiesel obtido a partir de ácidos graxos de origem microbiana, seja considerado um substituto viável dos combustíveis fósseis, não basta que sua produção e obtenção propicie somente benefícios ambientais, este biodiesel deve ser economicamente competitivo, o processo de obtenção deve ser capaz de produzir quantidades suficientes para suprir a demanda e proporcionar um ganho líquido de energia sobre as fontes de energia utilizadas para sua produção. Para aumentar a eficiência econômica do biodiesel obtido por via microbiana, alguns fatores devem ser levados em consideração para a obtenção do óleo microbiano, sendo eles:

1. Substrato: a escolha de substratos de baixo custo pode reduzir os custos de produção do óleo microbiano, fazendo com que seja economicamente viável para produção de biodiesel (MENG et al., 2009; HUANG et al., 2013). Uma variedade de substratos de baixo custo podem ser utilizados, como materiais hidrofílicos (p. e., melão, N-acetilglucosamina, extrato de sorgo, águas residuais, soro de leite, glicerol, entre outros) ou materiais hidrofóbicos (p. e., óleos vegetais, resíduos de indústrias de alimentos, entre outros) (HUANG et al., 2013).

2. *Screening* para microrganismos oleaginosos: esta etapa se refere à escolha de microrganismos que possuam potencial para produção de lipídeos. Esta etapa é essencial, pois é muito importante limitar o número de microrganismos a serem estudados, a fim de que sejam verificados à fundo quanto às melhores condições de cultivo (MENG et al., 2009; HUANG et al., 2013).
3. Engenharia genética e metabólica: embora muitas linhagens selvagens sejam capazes de produzir lipídeos, muitas delas tem capacidade limitada para produzir biomassa. Portanto, modificações genéticas têm sido vistas como uma alternativa para aumentar a produção de biomassa e conseqüentemente impactar a economia envolvida sobre a produção de biodiesel microbiano. Além disso, o uso de biologia molecular pode modificar linhagens para que sejam capazes de melhorar a qualidade dos ácidos graxos sintetizados, ou seja, modificar o grau de insaturação e aumentar o comprimento da cadeia dos ácidos graxos (MENG et al., 2009; HUANG et al., 2013).
4. Modo de operação: muitos estudos têm demonstrado que o modo de operação do processo de obtenção do óleo microbiano é de grande importância para aumentar o rendimento de lipídeos. O processo de obtenção pode ser realizado em batelada, batelada-alimentada ou processo contínuo (HUANG et al., 2013).
5. Aproveitamento de subprodutos: além de produzirem lipídeos, as células microbianas possuem proteínas, carboidratos e outros nutrientes de interesse industrial. O aproveitamento destes subprodutos da produção de óleo microbiano é um caminho para reduzir os custos de produção do biodiesel. A biomassa residual pode, por exemplo, ser utilizada para alimentação animal ou produção de metano por digestão anaeróbia. Produção de carotenóides, como no caso da levedura *R. toruloides*, em paralelo com lipídeos também se mostra uma excelente opção. O glicerol proveniente da transesterificação dos ácidos graxos também pode ser aproveitado por indústrias químicas, por exemplo, ou utilizado como substrato (fonte de carbono e energia) para a produção do óleo microbiano (MENG et al., 2009; HUANG et al., 2013).

O custo total do biodiesel a partir de óleo microbiano, inclui os processos de obtenção do óleo e transesterificação do mesmo. O processo de transesterificação é relativamente bem definido e estável, desta forma o custo de obtenção do óleo é o processo que define o custo total de produção do biodiesel. Os cinco fatores anteriormente citados são referentes ao processo de obtenção do óleo microbiano e o custo da matéria-prima (substrato) utilizada para obtenção do óleo microbiano representa, aproximadamente, 75% do custo total de produção; sendo este custo representado pelo rendimento, ou fator de conversão de substrato em lipídeos (HUANG et al., 2013).

No caso da produção do biodiesel, para recuperação dos lipídeos acumulados por microrganismos, as células podem ser lisadas por ação mecânica, enzimática ou por solvente, para extrair os lipídeos que serão submetidos ao processo de transesterificação para a liberação de glicerol e FAMES, sendo este processo denominado transesterificação indireta (KOUTINAS et al., 2014; SITEPU et al., 2014). Existe ainda outro processo denominado transesterificação direta, em que a reação de transesterificação ocorre diretamente na biomassa microbiana, sem a prévia extração dos lipídeos (KOUTINAS et al., 2014). Apesar de existirem metodologias estabelecidas, a produção de biodiesel a partir de SCO ainda precisa ter um custo competitivo frente aos combustíveis à base de petróleo. Para isso, a produção de óleo microbiano tem sido alvo de estudos que visam à otimização do processo e ao desenvolvimento de organismos capazes de converter substratos de baixo custo em altas quantidades de ácidos graxos (SESTRIC et al., 2014; SITEPU et al., 2014).

Para acumular lipídeos, as leveduras precisam ser cultivadas em meio contendo excesso de carbono e limitação de algum outro nutriente, sendo o nitrogênio o mais comumente empregado. No início do cultivo, o microrganismo utiliza C e N para crescimento celular, porém quando a fonte de N se esgota, as células continuam assimilando a fonte de C, que é diretamente direcionada para a síntese de lipídeos. Desta forma, a célula começa a acumular TAGs intracelularmente na forma de gotículas de óleo (RATLEDGE, 2004; KOUTINAS et al., 2014) e este fenômeno é chamado de acúmulo “*de novo*” de lipídeos (KOUTINAS et al., 2014).

Li, Zhao e Bai (2007) estudaram o acúmulo de óleo microbiano por *R. toruloides*, utilizando glicose como fonte de carbono e uma mistura de peptona e extrato de levedura como fontes de nitrogênio. O processo foi conduzido em batelada alimentada, em frasco agitado a 200 rpm e 30 °C, durante 134 horas, obtendo-se ao final os resultados apresentados na Tabela 8.

A partir destes resultados, Koutinas et al. (2014) realizaram uma avaliação técnico-econômica da produção de óleo microbiano (OM), a partir de cálculos estequiométricos para

cada etapa e com o auxílio de ferramentas computacionais. Nesta avaliação, consideraram uma planta operando 8300 h/a e produzindo 10000 t/a de biodiesel. Ao final avaliaram o valor final do custo de produção (CP), calculado a partir dos custos de trabalho operacional, matéria-prima, utilitários, tratamento de resíduos e o investimento de capital fixo.

**Tabela 8 - Resultados obtidos para acúmulo de óleo microbiano por *R. toruloides*, utilizando glicose como fonte de carbono, segundo Li, Zhao e Bai (2007)**

Parâmetro	Valor obtido
$[X]_{\text{final}}$	106,5 g/L
$[OM]_{\text{final}}$	71,9 g/L
% OM	67,5% (m/m)
$P_{OM}$	0,54 g/L.h
$Y_{X/S}$	0,35 g/g
$Y_{OM/S}$	0,23 g/g

Onde: [X] concentração de células; [OM] concentração de óleo microbiano; P produtividade; Y fator de conversão

Fonte: Adaptado de Li, Zhao e Bai (2007)

Os custos foram calculados a partir de quatro processos, separadamente e em conjunto: (1) produção do óleo microbiano; (2) extração do óleo utilizando hexano; (3) transesterificação direta da biomassa, com metanol e ácido sulfúrico; e (4) transesterificação indireta do óleo microbiano purificado, com metanol e hidróxido de sódio. O resultado final para capital fixo de investimento (CFI) – referente ao custo de compra e montagem dos equipamentos necessários – custo total de produção (CTP) e o valor unitário (VU) do óleo microbiano, desconsiderando o custo da glicose, produzido estão apresentados na Tabela 9.

Analisando os dois processos de transesterificação, direta (processo 3) ou indireta (processo 4), Koutinas et al. (2014) demonstraram que o uso da transesterificação indireta é mais vantajoso economicamente. Além disso, os autores concluíram que grande parte do capital fixo de investimento é devido ao custo dos fermentadores e que, quando o custo da glicose é levado em consideração, ele representa 35% do custo total de produção, sendo o custo unitário acrescido de US\$2,07/kg de biodiesel produzido, totalizando em torno de US\$5,89/kg de biodiesel. Finalmente, os autores sugeriram que, se não houver necessidade de compra da glicose e se os fermentadores atingirem uma produtividade cinco vezes maior que a teórica, o custo unitário pode alcançar o menor valor possível, US\$1,76/kg de biodiesel produzido. Com

este custo unitário, o óleo microbiano poderá competir com os óleos vegetais, os quais têm seu custo médio previsto em mais de US\$2/kg de óleo, até o ano de 2020.

**Tabela 9 - Resultados obtidos para os custos de produção de óleo microbiano por *R. toruloides*, utilizando glicose como fonte de carbono, conforme calculado por Koutinas et al. (2014)**

<b>Processo</b>	<b>CFI (US\$ milhões)</b>	<b>CTP (US\$ milhões/ano)</b>	<b>VU (US\$ /kg de OM)</b>
1	70,2	34,1	3,41
1 + 2	71,5	35,4	*
1 + 3	103,3	56,3	5,60
1 + 2 + 4	73,7	38,2	3,82

Os cálculos foram realizados desconsiderando o custo da matéria-prima, ou seja, a glicose

Onde: (\*) valor não especificado; (1) produção do óleo microbiano; (2) extração do óleo utilizando hexano; (3) transesterificação direta da biomassa, com metanol e ácido sulfúrico; (4) transesterificação indireta do óleo microbiano purificado, com metanol e hidróxido de sódio

Fonte: Adaptado de Koutinas et al. (2014)

Portanto, este estudo conseguiu comprovar, através de cálculos e simulações, o que outros autores relatam ser os dois mais importantes parâmetros de processo para desenvolvimento de plantas para produção de SCO, o fator de conversão e a produtividade, os quais estão relacionados com os custos do substrato e dos fermentadores (NIELSEN, 2006). A parcela de contribuição do custo do substrato ao custo total de produção depende, além do valor do mesmo, do fator de conversão de substrato em lipídeos, ou seja, da quantidade de lipídeo produzida por quantidade de fonte de carbono utilizada ( $Y_{Lip/S}$ ). A parcela de contribuição do custo do fermentador ao custo total de produção depende da produtividade em lipídeos, ou seja, da quantidade de lipídeos produzida por volume do fermentador, por unidade de tempo ( $P_{Lip}$ ) (YKEMA et al., 1988; AGEITOS et al., 2011).

Conhecendo os principais parâmetros que definem o custo de produção do óleo microbiano, além dos estudos referentes ao melhor e mais produtivo tipo de processo para produção de lipídeos, faz-se necessário encontrar e estudar o uso de substratos de baixo custo como fontes de carbono assimiláveis por microrganismos oleaginosos, a fim de diminuir os custos de produção referentes à matéria-prima (MATSAKAS et al., 2015). O glicerol está entre este tipo de substrato e é um produto amplamente disponível atualmente, pois é gerado na produção do biodiesel na proporção de 10%, em relação a este último (LEE et al., 2014).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Preparação de materiais estéreis

Materiais, reagentes e meios de cultura foram esterilizados em autoclave por vapor úmido (121 °C por 20 min), com exceção dos reagentes termicamente instáveis (tiamina, ureia, leucina e uracila), os quais foram esterilizados por filtração em membrana hidrofílica-PES estéril Millex-GP® de 0,22 µm (Millipore, Massachusetts, EUA).

### 4.2 Fonte de carbono, meios de cultura e suplementos

Todos os meios de cultura, vitaminas, soluções de elementos-traço e aminoácidos empregados neste trabalho estão detalhados nas Tabelas 10 e 11. Informações sobre o preparo dos mesmos encontram-se nos subitens 4.2.1 a 4.2.4.

**Tabela 10 - Composição dos meios YPD, MDBU e MCL**

<b>Componente*</b>	<b>Concentração final (g.L<sup>-1</sup>)</b>
<b>Meio YPD</b>	
Extrato de levedura	10,0
Peptona bacteriológica	20,0
D-(+)-Glicose	20,0
<b>Meio MDBU (Oliveira, 2014)</b>	
Ureia	3,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5
<b>Meio MCL (Bonturi, 2015)</b>	
Glicerol	70,0
Extrato de levedura (Himedia, Índia)	2,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,6
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,4
Solução de elementos-traço B	1%

Fonte: elaborada pela autora

Onde: (\*) Componentes de qualidade Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA), com exceção do extrato de levedura do meio MCL

**Tabela 11 - Composição dos suplementos (elementos-traço, vitaminas e aminoácidos)**

<b>Componente</b>	<b>Fornecedor</b>	<b>Concentração (g.L<sup>-1</sup>)</b>
<b>Elementos-traço A (Barth; Kunkel, 1979)</b>		
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Qeel, Brasil	0,40
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	Synth, Brasil	0,31
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	Synth, Brasil	0,18
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	Synth, Brasil	0,24
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	Synth, Brasil	12, 45
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	Merck-Schuchardt, Alemanha	2,00
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Synth, Brasil	0,50
KI	Nuclear, Brasil	0,10
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	Ecibra, Brasil	0,10
<b>Elementos-traço B (Meesters et al., 1996)</b>		
CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	Synth, Brasil	4,00
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Synth, Brasil	0,55
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Synth, Brasil	0,10
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	Synth, Brasil	0,076
Ácido cítrico	Vetec, Brasil	0,50
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 18 mol/L	Panreac, Espanha	100 µL
<b>Solução de tiamina (Barth; Kunkel, 1979)</b>		
Cloreto de tiamina	Sigma-Aldrich, EUA	0,30
<b>Solução de vitaminas (Verduyn et al., 1992)</b>		
D-(+)-Biotina	Sigma-Aldrich, EUA	0,05
D-ácido pantotênico	Sigma-Aldrich, EUA	1,00
Ácido nicotínico	Sigma-Aldrich, EUA	1,00
Mio-inositol	Sigma-Aldrich, EUA	25,00
Cloreto de tiamina	Sigma-Aldrich, EUA	1,00
Piridoxol hidrocloreídrico	Sigma-Aldrich, EUA	1,00
Ácido-4-aminobenzoico	Sigma-Aldrich, EUA	0,20
<b>Aminoácidos</b>		
Leucina	Sigma-Aldrich, EUA	10,0
Uracila	Sigma-Aldrich, EUA	2,0

Fonte: elaborada pela autora

#### **4.2.1 Fonte de carbono**

Glicerol foi utilizado como única fonte de carbono para todos os cultivos realizados. A solução de fonte de carbono foi preparada e autoclavada (121 °C por 20 min), separadamente,

utilizando Glicerol *for molecular biology*  $\geq 99\%$  (COD. G5516-1L, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA).

#### **4.2.2 Meio Yeast extract Peptone Dextrose (YPD)**

O meio YPD (*Yeast extract Peptone Dextrose*) (Tabela 10) empregado nesse estudo foi preparado a partir da pesagem e dissolução dos componentes nas devidas proporções. Para o meio YPD sólido (YPDS), foram adicionados 20 g.L<sup>-1</sup> de ágar (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) no preparo do mesmo.

#### **4.2.3 Meio definido Barth com ureia (MDBU)**

Para o preparo deste meio (Tabela 10), os minerais foram pesados e dissolvidos em água destilada. O pH do meio foi ajustado para 6,0 utilizando solução de KOH 1 mol.L<sup>-1</sup> e então autoclavado a 121 °C por 20 min. Após atingir temperatura ambiente, a ureia (previamente esterilizada por filtração), as soluções de tiamina e de vitaminas, para *Y. lipolytica* e *R. toruloides*, respectivamente, foram adicionadas ao meio.

Para a linhagem *Y. lipolytica* Po1g, foram adicionados neste meio os aminoácidos leucina e uracila na concentração de 0,1 g/L (LAZAR et al., 2014), previamente esterilizados por filtração.

#### **4.2.4 Meio complexo para lipídeos (MCL)**

O meio complexo para lipídeos (MCL) (Tabela 10), foi o mesmo utilizado por Bonturi (2016). Foi utilizado extrato de levedura (*Yeast Extract*, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) contendo 11,9% de nitrogênio total para, juntamente com o sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e o glicerol, compor um meio de cultura com razão carbono/nitrogênio (C/N) de 100 mol/mol.

Para o preparo deste meio, os minerais e extrato de levedura foram pesados e dissolvidos em água destilada. O pH do meio foi ajustado para 6,0 utilizando solução de KOH 1 mol.L<sup>-1</sup> e então autoclavado a 121 °C por 20 min. Após atingir temperatura ambiente, o glicerol e a solução de elementos-traço B (previamente autoclavados) foram adicionados ao meio.

Para a linhagem *Y. lipolytica* Po1g, foram adicionados neste meio os aminoácidos leucina e uracila na concentração de 0,1 g/L (LAZAR et al., 2014), previamente esterilizados por filtração.

### 4.3 Equipamentos

- Incubador rotativo (INNOVA 4430, New Brunswick, EUA) para cinéticas de crescimento;
- Incubador rotativo (PsycoTherm G27, New Brunswick, EUA) para cultivos para acúmulo de lipídeos;
- Espectrofotômetro (Beckman 640, Beckman Coulter, EUA);
- Espectrofotômetro (Genesys 20, modelo 4001/4, Thermo Fisher Scientific, EUA) para espectrofotometria de varredura;
- pHmetro (DM21, Digimed, Brasil);
- Balança analítica (GR-202, AND, Japão);
- Centrífuga (NT 810, Novatecnica, Brasil);
- Ultrafreezer (85-1.7A, Scientemp Corp., EUA);
- HPLC (Varian, Inc., EUA);
- Evaporador rotativo (TE-211, Tecnal, Brasil);
- Banho termostaticado (TE-2000, Tecnal, Brasil);
- Estufa com circulação de ar (320-SE, Fanem LTDA, Brasil);

### 4.4 Microrganismos

Os microrganismos investigados neste trabalho foram linhagens das leveduras *Yarrowia lipolytica* e *Rhodospiridium toruloides*. Informações sobre a obtenção destas linhagens encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12 - Linhagens de *Yarrowia lipolytica* e *Rhodospiridium toruloides* utilizadas neste trabalho

Linhagem	Local de obtenção	Código na coleção de origem	Local de isolamento	Histórico	Referência mais antiga
<i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682	GEnBio	IMUFRJ 50682	Estuário da Baía do Guanabara (Rio de Janeiro, Brasil)	LEMeB ← GEnBio ← EQ-UFRJ	Hagler e Mendonça-Hagler (1979)
<i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50678	EQ-UFRJ	IMUFRJ 50678	Estuário da Ilha do Fundão (Rio de Janeiro, Brasil)	LEMeB ← EQ-UFRJ	de Lima <i>et al.</i> (2013)
<i>Y. lipolytica</i> Po1g	EQ-UFRJ	Po1g	Linhagem derivada da linhagem selvagem W29 por uma série de modificações genéticas	LEMeB ← EQ-UFRJ ← Yeastern Biotech Co., Ltd ← INRA	Madzak <i>et al.</i> (2000)
<i>Y. lipolytica</i> W29	GEnBio	W29	Solo	LEMeB ← GEnBio ← EQ-UFRJ ← ATCC 20460	Gaillardin <i>et al.</i> (1973)
<i>Y. lipolytica</i> CCT 5443	CCT	CCT 5443	Universidade de Illinois (Illinois, EUA)	LEMeB ← CCT ← Costa, F. A. A. ← NRRL Y-1095	Ishikura e Foster (1961)
<i>Y. lipolytica</i> CCT 7401	LEMeB	CCT 7401	Milho moído (Illinois, EUA)	LEMeB ← Costa, F. A. A. ← NRRL YB-423	von Arx (1972)
<i>R. toruloides</i> CCT 0783	LEBp	CCT 0783	Ar (Japão)	LEMeB ← LEBp ← CCT ← NCYC 1576 = IFO 10076 = NBRC 10076 = R-5-33	Banno e Mikata (1969)
<i>R. toruloides</i> Rt10	LEBp	Rt 10	Linhagem adaptada da linhagem CCT 0783 em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar	LEMeB ← LEBp	Bonturi, Miranda e Berglund (2013)

Fonte: elaborada pela autora

Onde: LEMeB – Laboratório de Engenharia Metabólica e de Bioprocessos (Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP, Campinas, SP);

GenBio – Grupo de Engenharia de Bioprocessos (Departamento de Engenharia Química/USP, São Paulo, SP);

EQ-UFRJ – Escola de Química (Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ);

CCT – Coleção de Culturas Tropical (Fundação André Tosello, Campinas, SP);

LEBp – Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (Faculdade de Engenharia Química/UNICAMP, Campinas, SP).

#### 4.5 Preparo das culturas estoque

Todas as linhagens foram inoculadas, separadamente (por técnica de esgotamento), em placas de Petri contendo meio YPDS e incubadas a 30 °C. Linhagens de *Y. lipolytica* foram incubadas por 48 h e as linhagens de *R. toruloides* por 72 h. Após o tempo de incubação, células de uma colônia isolada de cada linhagem foram transferidas, com o auxílio de uma alça de plástico estéril, para frasco Erlenmeyer de 500 mL com deflectores, contendo 100 mL de meio YPD e incubadas a 30 °C e 200 rpm por 24 h, em *shaker* rotativo.

Em seguida, toda a suspensão celular foi centrifugada a 2500 g durante 10 min e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* celular obtido foi então ressuspensão em uma solução de glicerol 20% (v/v), dividido em alíquotas de 1 mL diretamente em tubos criogênicos de 1,5 mL, identificados e armazenados em ultrafreezer a – 80 °C.

#### 4.6 Identificação das espécies

Com o intuito de confirmar a identidade das espécies estudadas, foi realizada a amplificação e sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA 26S, conforme descrito por Kurtzman e Robnett (1998). Os DNAs correspondentes das seis linhagens de *Y. lipolytica* e duas de *R. toruloides* foram extraídos e enviados, separadamente, para sequenciamento, conforme detalhado a seguir. Uma linhagem laboratorial de *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-7D foi utilizada como espécie *outgroup*, isto é, uma linhagem de espécie conhecida e diferente das estudadas, para validar a metodologia. Os *primers* utilizados estão descritos na Tabela 13 e a região de anelamento exemplificada na Figura 8.

##### 4.6.1 Extração de DNA genômico

A primeira etapa consistiu na extração do DNA genômico das linhagens conforme descrito por Løoke, Kristjuhan e Kristjuhan (2011). Para isso, todo o conteúdo de um tubo de estoque (1 mL) foi transferido para um tubo Falcon de 50 mL contendo 5 mL de meio YPD, o qual foi incubado a 30 °C e 200 rpm por 12 h.

Passado o tempo de incubação, 1 mL da suspensão celular foi transferido para um microtubo Eppendorf e centrifugado a 12000 g por 3 min. Após descartar o sobrenadante, o *pellet* obtido foi ressuspensão em 100 µL de uma solução de acetato de lítio 0,2 mol.L<sup>-1</sup> e solução

de SDS 1%. A suspensão foi agitada em *vortex* e em seguida incubada a 70 °C por 5 min. Foram adicionados 300 µL de etanol 100% e a suspensão novamente agitada. Após centrifugação a 15000 g por 3 min, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 400 µL de etanol 70%, seguido de nova centrifugação a 15000 g por 3 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* suspenso em 100 µL de água Milli-Q, seguido de centrifugação a 15000 g por 15 s. Nesta etapa o DNA extraído encontra-se no sobrenadante, o qual foi transferido para um novo microtubo Eppendorf.

Acetato de lítio comumente é utilizado em protocolos de transformação em leveduras pois “enfraquece” a parede celular e aumenta a eficiência da transformação. No caso da extração, os autores deste protocolo adaptaram esta propriedade do acetato de lítio para romper as células e liberar o DNA, desenvolvendo desta forma um método rápido, eficiente e robusto para extração de DNA genômico.

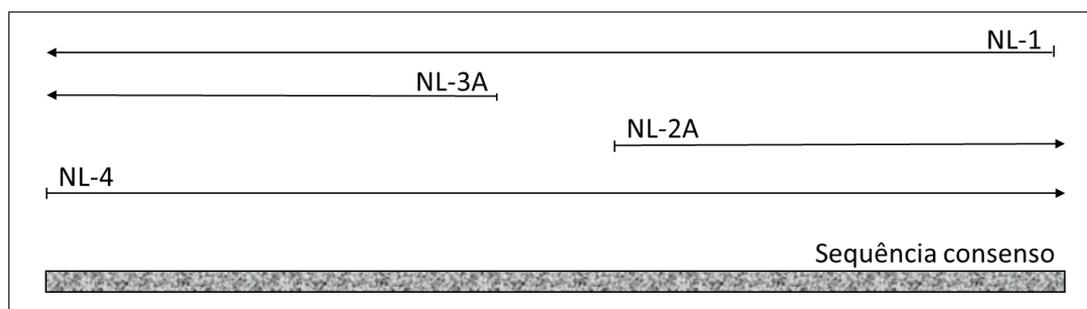
**Tabela 13 - Sequência, região de anelamento e aplicação dos primers utilizados para identificação das espécies**

<i>Primer</i>	Sequência	Região de anelamento*	Aplicação
NL-1	5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	Externo	Amplificação e Sequenciamento
NL-2A	5'-CTTGTTTCGCTATCGGTCTC	Interno	Sequenciamento
NL-3A	5'-GAGACCGATAGCGAACAAG	Interno	Sequenciamento
NL-4	5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG	Externo	Amplificação e Sequenciamento

Fonte: elaborada pelo autor

Onde: \* - refere-se à posição de anelamento do *primer* na sequência alvo

**Figura 8 - Montagem da sequência consenso a partir dos primers internos e externos**



Fonte: elaborada pela autora

#### 4.6.2 Amplificação por PCR

A mistura reacional para a reação em cadeia da polimerase (PCR) foi composta por: 10 µL de tampão (GoTaq Flexi Buffer, ThermoScientific - 5x), 3 µL de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 7,5 µL dNTP (2mM), 3 µL de iniciador NL-1 (5mM), 3 µL de iniciador NL-4 (5mM), 2 µL de DNA, 0,5 µL de polimerase (GoTaq polymerase) e 21 µL de água milli-Q, totalizando 50 µL.

A etapa de amplificação foi realizada utilizando o termociclador Veriti Thermal Cycler (9600, Applied Biosystems, EUA) e dividida em 35 ciclos de desnaturação por 15 s a 95 °C, anelamento por 25 s a 54 °C e extensão por 20 s a 72 °C. Para desnaturação inicial utilizou-se 2 min a 95 °C e para extensão final 10 min a 72 °C.

#### 4.6.3 Purificação, quantificação e confirmação

Após amplificação, o DNA foi purificado utilizando o kit GenElute™ PCR Clean-Up (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). A concentração de DNA obtida foi quantificada em NanoDrop (2000, Thermo Fisher Scientific, US) a 260 nm, a fim de verificar se a concentração de DNA exigida para o sequenciamento foi obtida. Por fim, realizou-se uma eletroforese para confirmar se o tamanho da sequência esperada, em torno de 600 pb, foi amplificado.

Para a eletroforese, adicionou-se 5 µL de tampão de corrida (DNA Loading Buffer 6x, Cold Spring Harbor Protocols) às amostras dos DNA's extraídos de cada linhagem, as quais foram carregadas, em diferentes poços, em gel de agarose 1% (60 mL) em tampão TAE-1x e 1 µL de SYBR *safe Gel Stain* (Life Technologies). Como marcador padrão, utilizou-se 5 µL de *GeneRuler DNA Ladder Mix* e a eletroforese foi realizada a 120 V por 30 min.

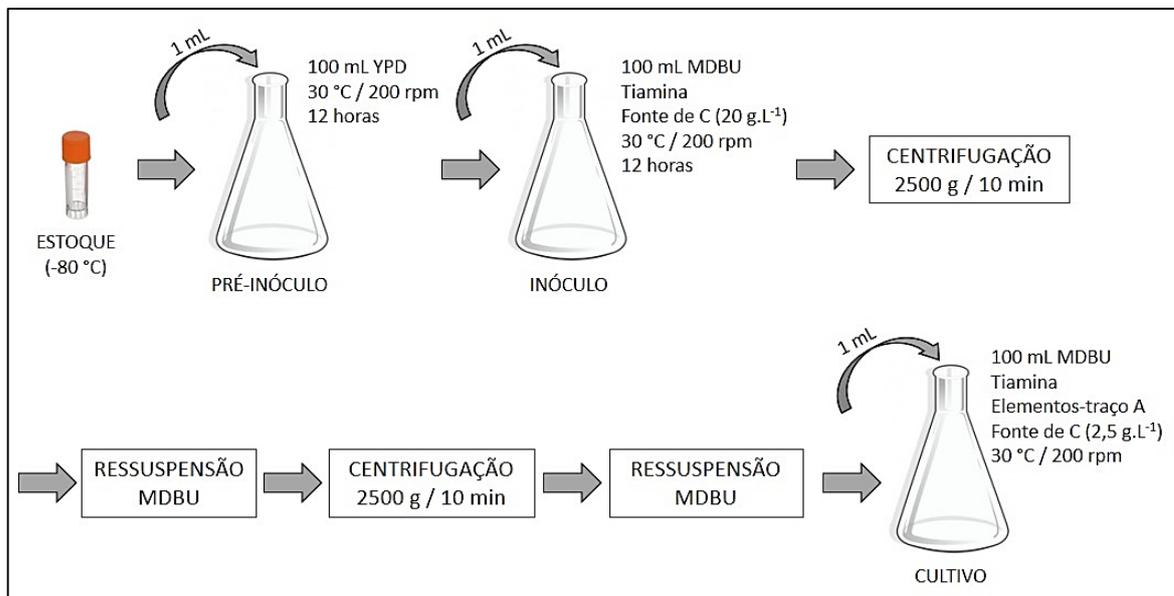
Para cada linhagem, a amostra foi dividida em quatro alíquotas, distribuídas em diferentes poços de uma placa de 96 poços. Em cada alíquota adicionou-se um *primer* específico (Tabela 13), sendo dois *primers* externos e dois internos, com o intuito de garantir um bom alinhamento da sequência consenso, como exemplificado na Figura 7. A placa contendo as nove linhagens (em quadruplicata) foi enviada para sequenciamento no Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD) da Unicamp.

A montagem da sequência consenso, a partir dos quatro *primers*, foi realizada com auxílio do *software* SEQUENCHER® 5.3 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, EUA) e o alinhamento da sequência consenso com outras linhagens foi realizado utilizando a ferramenta *Align* do portal eletrônico NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

## 4.7 Cultivos para cinéticas de crescimento

Os cultivos para obtenção das cinéticas de crescimento das leveduras foram realizados em triplicata biológica, ou seja, para cada linhagem os cultivos partiram de 3 tubos criogênicos (estoque). Devido às diferenças fisiológicas observadas no início do trabalho, os cultivos para as duas espécies estudadas foram realizados com o mesmo meio de cultura (MDBU), porém com tempos de incubação e suplementos distintos. As Figuras 9 e 10 mostram as etapas de preparação do cultivo para a cinética de crescimento, desde as células-estoque, até o cultivo principal, passando pelas etapas de pré-inóculo e inóculo, para as linhagens de *Y. lipolytica* e *R. toruloides*, respectivamente.

**Figura 9 - Etapas de preparação do cultivo para cinética de crescimento de *Yarrowia lipolytica***



Fonte: elaborada pela autora

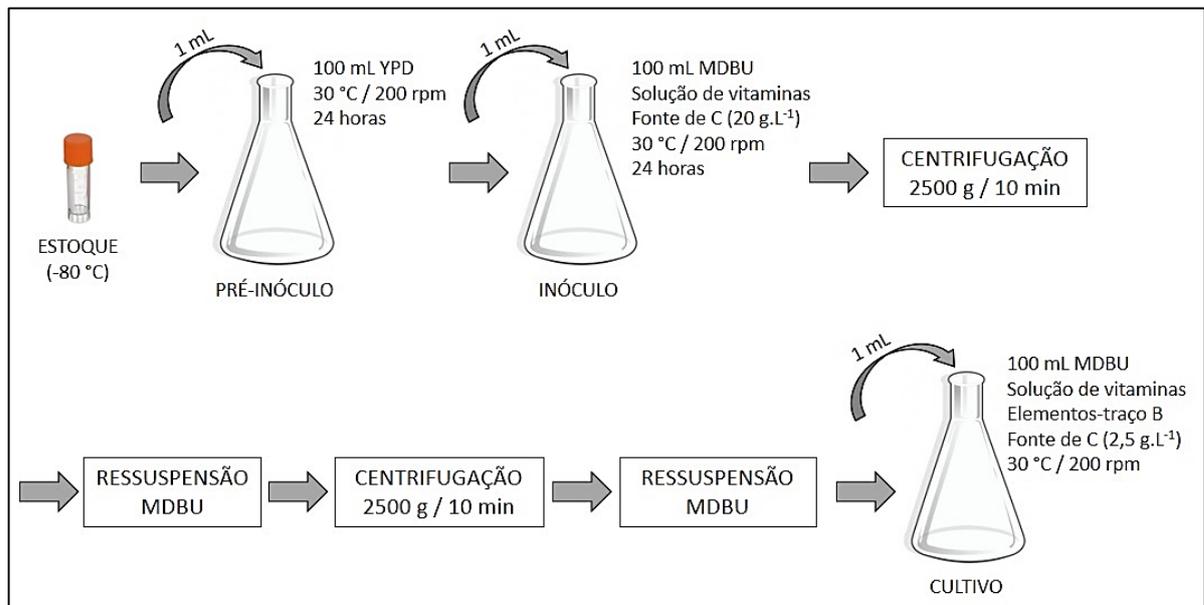
### 4.7.1 Pré-inóculo

Um tubo criogênico do estoque, contendo 1 mL de suspensão de células, foi descongelado à temperatura ambiente e posteriormente todo seu conteúdo vertido em frasco Erlenmeyer de 500 mL com deflectores, contendo 100 mL de meio YPD e incubado em *shaker* rotativo a 30 °C e 200 rpm por 12 h para *Y. lipolytica* e 24 h para *R. toruloides*.

#### 4.7.2 Inóculo

Para o preparo do inóculo, 1 mL de pré-inóculo foi transferido para frasco Erlenmeyer de 500 mL com defletores, contendo 100 mL de MDBU e os suplementos previamente esterilizados (i. e., 0,1 mL de solução de tiamina para *Y. lipolytica* e 0,1 mL de solução de vitaminas para *R. toruloides*). A fonte de carbono usada no inóculo foi sempre a mesma do cultivo principal, a fim de evitar/diminuir a formação de fase lag de crescimento. A concentração inicial de glicerol nesta etapa foi de 20 g.L<sup>-1</sup>. O inóculo foi incubado em *shaker* rotativo a 30 °C e 200 rpm por 12 h para *Y. lipolytica* e 24 h para *R. toruloides*.

**Figura 10 - Etapas de preparação do cultivo para cinética de crescimento de *Rhodosporidium toruloides***



Fonte: elaborada pela autora

#### 4.7.3 Cálculo do volume de inóculo

Uma alíquota do inóculo foi retirada assepticamente para realização da medida de absorbância ( $Abs_{inóculo}$ ). Utilizando-se a Equação 13, foi calculado o volume de inóculo necessário para obtenção de absorbância inicial nos cultivos entre 0,1 e 0,2 para *Y. lipolytica* e 0,5 e 0,6 para *R. toruloides*:

$$V_{inóculo} = \frac{Abs_{cultivo} \times V_{cultivo}}{Abs_{inóculo}} \quad (13)$$

onde:

$Ab_{\text{inóculo}}$  = Medida de absorvância do inóculo a 600 nm;

$V_{\text{inóculo}}$  = Volume de inóculo para se obter absorvância inicial nos cultivos;

$Ab_{\text{cultivo}}$  = Valor de absorvância inicial desejada para os cultivos a 600 nm;

$V_{\text{cultivo}}$  = Volume dos cultivos a serem inoculados.

#### 4.7.4 Centrifugação e ressuspensão do pellet celular

O volume de inóculo calculado foi então centrifugado em tubo Falcon de 50 mL estéril a 2500 g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular ressuspenso em 10 mL de meio MDBU estéril, sem fonte de carbono. A suspensão foi novamente centrifugada, nas mesmas condições, e ressuspensa em 1 mL de meio MDBU estéril.

#### 4.7.5 Cultivo

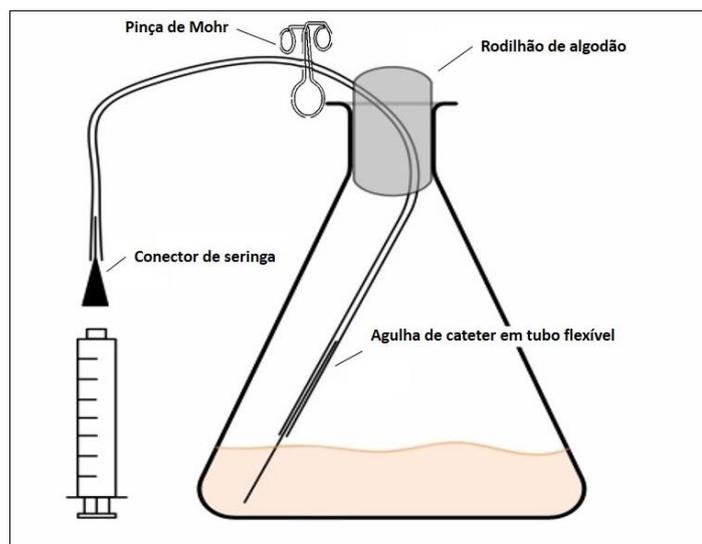
O cultivo principal (em modo descontínuo ou batelada) foi realizado em um aparato desenvolvido dentro do Grupo de Engenharia de Bioprocessos (GenBio), no Departamento de Engenharia Química, da USP, conforme ilustrado na Figura 11. O aparato consiste de um frasco Erlenmeyer de 500 mL, com deflectores para aumentar a transferência de oxigênio para o meio líquido, rodilhão de algodão, tubo flexível de silicone (*Masterflex* 96410-13), agulha de cateter (periférico IV 14G, *Solidor*), agulha de seringa (hipodérmica de 1,20x25 18G1, *BD*) e pinça de Mohr.

Todo o aparato de cultivo, contendo 100 mL de meio MDBU, foi autoclavado com o tubo de silicone pinçado. Após atingir temperatura ambiente, a ureia e os suplementos, previamente esterilizados, foram adicionados ao meio (i. e., 0,1 mL de solução de tiamina e 0,1 mL de elementos-traço A para *Y. lipolytica*; e 0,1 mL de solução de vitaminas e 1 mL de elementos-traço B para *R. toruloides*). A concentração inicial de glicerol nesta etapa foi de 2,5 g.L<sup>-1</sup>. Em seguida, a suspensão celular (1 mL) obtida na etapa de inóculo foi então transferida para o frasco, o qual foi incubado em *shaker* rotativo a 30 °C e 200 rpm.

As amostragens foram realizadas em intervalos de 1 h, com o auxílio de uma seringa pelo tubo flexível de silicone, não havendo necessidade de abrir o frasco. O volume morto do tubo flexível, aproximadamente 1 mL, foi primeiramente descartado para então serem retirados 2 a 3 mL de amostra para a realização de medidas de absorvância e pH. Após as medições, a amostra foi filtrada em membrana Millex® GV Membrana Durapore® em PVDF, 0,22 µm, não-

estéril (Millipore, Massachusetts, EUA), diretamente em *vial* de amostra para HPLC, o qual foi identificado e congelado a  $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para posterior análise de concentração de metabólitos extracelulares.

**Figura 11 - Sistema de cultivo em frasco agitado desenvolvido para realização de cinéticas de crescimento de leveduras. A pinça de Mohr é usada para pinçar a mangueira de silicone, evitando-se assim a contaminação do meio após a esterilização e durante o cultivo**



Fonte: Adaptado de Oliveira (2014)

#### 4.8 Espectrofotometria de varredura

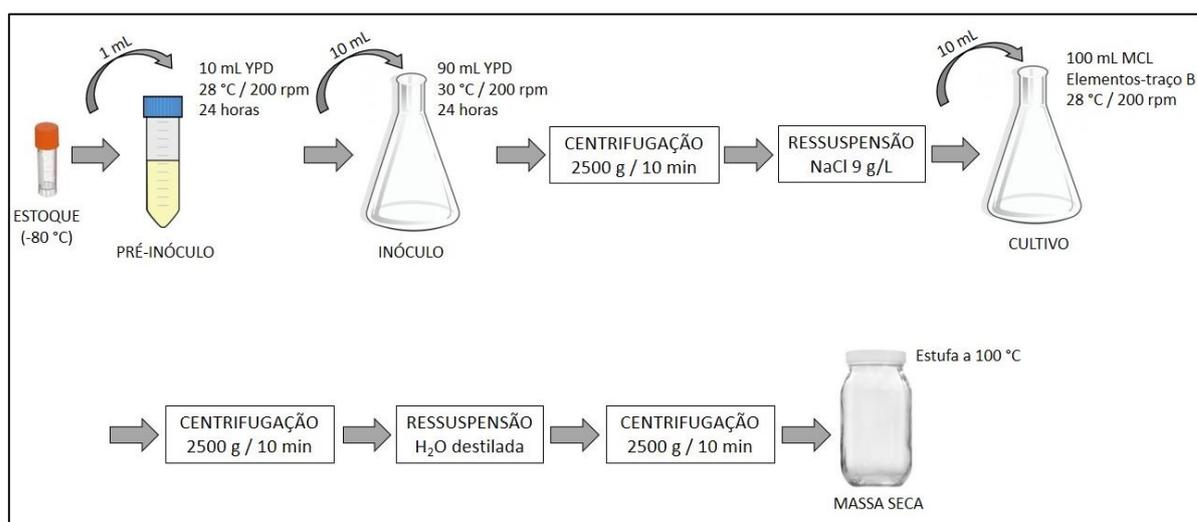
Meios de cultura estéreis (YPD e MDBU), glicerol estéril e algumas amostras dos cultivos para cinéticas foram submetidos a uma análise de varredura de espectro na faixa dos comprimentos de onda para a luz visível, ou seja entre 350 e 700 nm. Esta análise foi realizada a fim de observar se algum outro composto ou metabólito seria detectado no comprimento de onda fixado (600 nm) ou fora deste comprimento. Para amostras contendo células (i.e., durante a cinética de crescimento), 1 mL a mais de amostra era retirado e analisado em espectrofotômetro (Beckman 640, Beckman Coulter, EUA). Foram realizadas varreduras em três tempos diferentes de cultivo, durante as fases *lag* (ou de adaptação), exponencial e estacionária. Algumas amostras durante a cinética também foram analisadas sem a presença das células. Para isso, 1 mL de amostra foi centrifugado em tubo Eppendorf, por 5 min a 16000 g, para a sedimentação das células e o sobrenadante foi analisado em espectrofotômetro.

## 4.9 Cultivos para acúmulo de lipídeos

Os cultivos para acúmulo de lipídeos foram realizados em triplicata biológica, ou seja, para cada linhagem os cultivos partiram de três tubos criogênicos (estoque). A Figura 12 mostra as etapas de preparação do cultivo para acúmulo lipídico, desde as células-estoque, até o cultivo principal, seguido da obtenção da massa seca.

Nesta etapa do trabalho, ambas as leveduras (*Y. lipolytica* e *R. toruloides*) foram cultivadas da mesma maneira, variando apenas o tempo de incubação, o qual foi estabelecido após cinética de acúmulo de lipídeos, conforme detalhado mais adiante no item 4.10 (Cultivos para cinética de acúmulo de lipídeos).

**Figura 12 - Etapas de preparação do cultivo para acúmulo de lipídeos de *Yarrowia lipolytica* e *Rhodospiridium toruloides***



Fonte: elaborada pela autora

### 4.9.1 Pré-inóculo

Um tubo criogênico do estoque, contendo 1 mL de suspensão de células em glicerol, foi descongelado à temperatura ambiente e posteriormente todo seu conteúdo vertido em tubo Falcon estéril de 50 mL, contendo 10 mL de meio YPD e incubado em *shaker* rotativo a 28 °C e 200 rpm por 24 h.

#### **4.9.2 Inóculo**

Para o preparo do inóculo, 10 mL de pré-inóculo foram transferidos para frasco Erlenmeyer de 500 mL com deflectores, contendo 90 mL de meio YPD. O inóculo foi incubado em *shaker* rotativo a 28 °C e 200 rpm por 24 h.

#### **4.9.3 Centrifugação e ressuspensão do pellet celular**

A suspensão celular obtida no inóculo foi centrifugada em tubos Falcon de 50 mL estéreis a 2500 g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular ressuspensão em 10 mL de solução de cloreto de sódio (NaCl) na concentração de 9 g/L. Uma pequena alíquota desta suspensão foi retirada para medida de absorvância (600 nm) e o restante foi ajustado com NaCl 9 g/L, quando necessário, para se obter uma suspensão com absorvância igual a 20, utilizando a Equação 6.

#### **4.9.4 Cultivo**

O cultivo principal (em modo descontínuo ou batelada) foi realizado em frasco Erlenmeyer de 500 mL, com deflectores, contendo um volume final de 100 mL de meio MCL. Após o meio de cultivo atingir temperatura ambiente, foram adicionados a fonte de carbono (glicerol) e 1% de elementos-traço B, previamente esterilizados, e 10 mL da suspensão obtida no inóculo ( $Abs_{600} = 20$ ), atingindo, desta forma, uma absorvância final (600 nm) de 2,0. O frasco Erlenmeyer foi incubado em *shaker* rotativo a 28 °C e 200 rpm por 96 h para *Y. lipolytica* e 72 h para *R. toruloides*.

#### **4.9.5 Massa seca**

Uma alíquota de 10 mL do cultivo foi centrifugada a 2500 g por 10 min, o sobrenadante foi guardado para análise em HPLC da concentração residual de glicerol e o *pellet* celular ressuspensão em 20 mL de água destilada. Realizou-se uma segunda centrifugação, nas mesmas condições, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensão em 2 mL de água destilada e transferido para um frasco previamente seco e pesado em balança analítica. O frasco (aberto) contendo a suspensão foi mantido em estufa com circulação de ar a 100 °C, até completa

evaporação da água, e posteriormente pesado ao atingir temperatura ambiente. A massa seca foi obtida pela diferença entre a massa do frasco com a biomassa seca e o frasco vazio.

#### **4.10 Cultivos para cinética de acúmulo de lipídeos**

Para avaliar o tempo de cultivo que proporcionou o maior acúmulo de lipídeos (96 h para *Y. lipolytica* e 72 h para *R. toruloides*), realizou-se uma cinética de acúmulo de lipídeos com uma linhagem de cada espécie estudada (*Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 e *R. toruloides* Rt 10). O pré-inóculo e inóculo foram realizados como já descritos (itens 4.9.1 e 4.9.2), havendo pequena modificação apenas no cultivo principal. Sabendo da necessidade de retirar um volume maior de amostra para a realização deste experimento, optou-se por utilizar frasco Erlenmeyer de 1 L, com defletores, contendo 200 mL de meio MCL, desta forma, a proporção de meio no Erlenmeyer (20% do volume do frasco) foi mantida, assim como para os cultivos do item 4.9.

Durante a etapa de cultivo, foram realizadas amostragens de 10 mL, conforme item 4.9.5, para posterior extração dos lipídeos. Para a linhagem de *Y. lipolytica* os tempos de amostragem foram: 24, 48, 60, 72, 84, 96, 108 e 120 h. Já para a linhagem de *R. toruloides*, as amostras foram retiradas em 24, 48, 72, 96 e 120 h. As amostras foram submetidas ao processo de extração, assim como descrito no item 4.11.

#### **4.11 Extração de lipídeos**

A etapa de extração dos lipídeos obtidos nos cultivos descritos em 4.9 e 4.10 foi realizada no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEBp), na Faculdade de Engenharia Química da Unicamp, cujo responsável é o Prof. Dr. Everson Alves Miranda.

Inicialmente, foram adicionados 80 mL da solução Folch no frasco contendo a biomassa seca, obtida conforme descrito no item 4.9.5. A solução Folch foi preparada a partir de clorofórmio e metanol na proporção 2:1, segundo Folch et al. (1957). Com o auxílio de uma espátula de aço inoxidável, a biomassa foi solta cuidadosamente das laterais e do fundo do frasco. A solução Folch permaneceu no frasco fechado durante 24 h, sendo agitada algumas vezes durante este período, para que os lipídeos fossem extraídos para a fase líquida.

Todo o conteúdo do frasco foi filtrado em papel filtro quantitativo (C42 – Faixa azul, filtração lenta para precipitados finos, Unifil, Brasil), a fim de separar a fase líquida (solventes e lipídeo) da fase sólida (biomassa). Em seguida, a fase líquida foi transferida para um balão de fundo redondo (125 mL, Tecnal, Brasil), previamente seco e pesado em balança analítica, e

levado ao evaporador rotativo a 70 °C e 4 rpm até evaporação da solução Folch. Os solventes, na forma de vapor, foram então condensados por uma serpentina acoplada a um banho termostaticado funcionando a 10 °C, e recuperadas em um segundo balão.

O balão contendo os lipídeos foi mantido em estufa a 100 °C até completa evaporação dos solventes restantes na amostra para, após atingir temperatura ambiente, ser novamente pesado. A massa de lipídeo foi obtida pela diferença entre a massa do balão com os lipídeos e o balão vazio.

## **4.12 Métodos analíticos**

### ***4.12.1 Quantificação da concentração celular***

O crescimento celular foi acompanhado indiretamente, através de medidas de absorvância ao longo do tempo da suspensão celular. O comprimento de onda empregado no espectrofotômetro foi de 600 nm. Esses valores foram convertidos para gramas de massa seca de células por litro [g MS.L<sup>-1</sup>], utilizando-se uma curva de calibração obtida para cada linhagem estudada. Após a realização da cinética de crescimento, foi possível identificar a duração da fase exponencial de cada linhagem. Desta maneira, foi realizado um cultivo idêntico ao da cinética de crescimento, em que três amostras de 25 mL foram retiradas do frasco durante a fase exponencial (o mais próximo do final da fase, porém antes de atingir a fase estacionária), a fim de se obter uma suspensão com alta concentração celular. Realizou-se a medida de absorvância (600 nm) de cada alíquota, seguida de filtração em membrana MF-Millipore®, hidrofílica, 0,45 µm, não-estéril (Millipore, Massachusetts, EUA), previamente seca em micro-ondas por 15 minutos em 450 W de potência e pesada em balança analítica. As membranas com a massa celular foram secas também em micro-ondas, nas mesmas condições. A massa de células secas (em gramas) foi obtida pela diferença entre a massa da membrana com a biomassa seca e a membrana seca. Para obtenção do valor de concentração celular em massa seca [g MS.L<sup>-1</sup>], os valores obtidos foram divididos pelos respectivos volumes utilizados na filtração.

### ***4.12.2 Curva de calibração para conversão de absorvância em massa seca***

A curva de calibração, para todas as linhagens, foi realizada em duplicata biológica (i. e., partindo-se de dois tubos de estoque). Os cultivos foram realizados de forma idêntica aos cultivos detalhados no item 4.7 (Cultivos para cinéticas de crescimento). Para cada replicata

biológica foram retiradas três amostras para medidas de absorvância e massa seca, ou seja, uma triplicata analítica, das células durante a fase exponencial de crescimento. Desta maneira, a correlação entre absorvância e massa seca foi obtida plotando-se os valores médios de absorvância ( $Abs_{600}$ ) versus concentração celular [ $g\ MS.L^{-1}$ ], das triplicatas analíticas. Uma linha de tendência tipo reta foi ajustada, forçando a mesma a passar pela origem (0;0). O fator de conversão foi obtido pela média entre os coeficientes angulares das duplicatas biológicas.

#### ***4.12.3 Determinação da concentração de glicerol e metabólitos extracelulares***

Para quantificar a concentração de glicerol durante as cinéticas de crescimento e para verificar se houve a formação de metabólitos extracelulares (pelo aparecimento de eventuais picos nos cromatogramas), as alíquotas obtidas a cada tempo de cultivo para cinética de crescimento (item 4.7.5) e ao final do cultivo para acúmulo de lipídeos (item 4.9.4) foram analisadas em cromatógrafo Varian (Varian, Inc., EUA) equipado com bomba de gradiente (Varian 9010, Inc., EUA) e detector de índice de refração (RI 2000, Chrom Tech Inc., Alemanha). A separação dos compostos foi obtida em coluna analítica Aminex HPX-87H a 30 °C e solução de  $H_2SO_4$  a pH 2,6 como fase móvel, com vazão de 0,6 mL/min e tempo de corrida individual de 25 min. O glicerol foi analisado através do tempo de retenção, por comparação com padrão de glicerol qualidade Sigma (St. Louis, EUA).

### **4.13 Tratamento de dados**

#### ***4.13.1 Cálculo dos parâmetros fisiológicos***

Para o cálculo da velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{m\acute{a}x}$  [ $h^{-1}$ ]), foram primeiramente plotados os dados do logaritmo neperiano ( $\ln$ ) dos valores de concentração celular em massa seca [ $g\ MS.L^{-1}$ ] versus o tempo [h]. A duração da fase exponencial de crescimento foi determinada como o intervalo de tempo correspondente ao trecho linear desta curva. Em seguida, aplicando-se regressão linear aos dados deste trecho, foi possível obter o valor do coeficiente angular desta reta, que representa o valor de  $\mu_{m\acute{a}x}$  [ $h^{-1}$ ].

Para obtenção do fator de conversão de substrato em biomassa na fase exponencial ( $Y_{X/S}^{exp}$ ), um gráfico foi gerado com os valores, na fase exponencial, da concentração celular em massa seca [ $g\ MS.L^{-1}$ ] em função dos valores de concentração de glicerol [ $g\ S.L^{-1}$ ]. O valor do

módulo do coeficiente angular, obtido pela regressão linear destes dados, equivaleu ao parâmetro  $Y_{X/S}^{exp}$  [(g MS).(g S)<sup>-1</sup>].

A velocidade específica máxima de consumo de substrato ( $r_S^{máx}$ ) foi obtida pela Equação 14 e expressa em unidade de g S.(g MS<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>).

$$r_S^{máx} = \mu^{máx} / Y_{X/S}^{exp} \quad (14)$$

#### 4.13.2 Cálculo dos parâmetros de processo

Os parâmetros de processo, fator global de conversão de substrato em biomassa  $Y_{X/S}^{global}$  [(g MS).(g S<sup>-1</sup>)], fator de conversão de substrato em lipídeos  $Y_{Lip/S}^{global}$  [(g Lip).(g S<sup>-1</sup>)] e produtividade em lipídeos  $P_{Lip}$  [(g Lip).(L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>)], foram obtidos pelas Equações 15 a 17, respectivamente.

$$Y_{X/S}^{global} = \frac{X_{final} - X_{inicial}}{S_{inicial} - S_{final}} \quad (15)$$

$$Y_{Lip/S} = \frac{Lip_{final}}{S_{inicial} - S_{final}} \quad (16)$$

$$P_{Lip} = \frac{Lip_{final}}{t_{cultivo}} \quad (17)$$

onde:

$X_{final}$  = concentração celular ao final do cultivo;

$X_{inicial}$  = concentração celular inicial;

$S_{final}$  = concentração de glicerol ao final do cultivo;

$S_{inicial}$  = concentração de glicerol inicial

$Lip_{final}$  = concentração de lipídeos ao final do cultivo;

$t_{cultivo}$  = tempo total do cultivo.

#### **4.14 Análise estatística**

Os parâmetros fisiológicos obtidos (velocidades específicas e fatores de conversão), bem como parâmetros de processo e acúmulo lipídico, foram submetidos à análise de variância (ANOVA), a fim de verificar diferenças significativas ( $p < 0,1$ ) entre as diferentes linhagens e condições, pelo teste de Tukey com o auxílio do software STATISTICA® (StatSoft Inc.). Inicialmente utilizou-se um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) para verificar estas diferenças, no entanto observamos que, a este nível, o teste reportava semelhança entre quase todas as linhagens, uma vez que os valores obtidos para os parâmetros fisiológicos – principalmente  $\mu_{máx}$  – são muito próximos entre si. Desta forma, foi estabelecido o nível de significância de 10 % ( $p < 0,1$ ) para refinar o teste e conseguir detectar diferenças mesmo entre valores muito próximos.

#### **4.15 Experimentos realizados durante este mestrado**

A Tabela 14 apresenta um resumo de todos os experimentos realizados neste trabalho de mestrado e os objetivos propostos para cada etapa.

Tabela 14 - Resumo dos experimentos realizados neste trabalho

Experimento	Linhagem	Nº de replicatas biológicas	Objetivos
Identificação das espécies	<i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682	4	<p>Confirmar se as linhagens estudadas são de fato pertencentes às espécies designadas e que não sofreram contaminação.</p> <p>Experimento realizado em quadruplicata analítica, ou seja, foi utilizado um tubo de estoque para extração de DNA, o qual posteriormente foi dividido em quatro alíquotas para sequenciamento.</p>
	<i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50678		
	<i>Y. lipolytica</i> Po1g		
	<i>Y. lipolytica</i> W29		
	<i>Y. lipolytica</i> CCT 5443		
	<i>Y. lipolytica</i> CCT 7401		
	<i>R. toruloides</i> CCT 0783		
	<i>R. toruloides</i> Rt 10		
	<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK113-7D		
Cinética de crescimento	<i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682	3	<p>Determinar os parâmetros fisiológicos, velocidade específica máxima de crescimento (<math>\mu_{m\acute{a}x}</math>), fator de conversão de substrato em biomassa na fase exponencial (<math>Y_{X/S}^{exp}</math>) e velocidade específica máxima de consumo de substrato (<math>r_S^{m\acute{a}x}</math>) e o parâmetro de processo, fator global de conversão de substrato em biomassa (<math>Y_{X/S}^{global}</math>), em meio de cultura definido.</p>
	<i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50678		
	<i>Y. lipolytica</i> Po1g		
	<i>Y. lipolytica</i> Po1g + LEU + URA		
	<i>Y. lipolytica</i> W29		
	<i>Y. lipolytica</i> CCT 5443		
	<i>Y. lipolytica</i> CCT 7401		
	<i>R. toruloides</i> CCT 0783 (protocolo <i>Y. lipolytica</i> )		
	<i>R. toruloides</i> Rt 10 (protocolo <i>Y. lipolytica</i> )		
	<i>R. toruloides</i> CCT 0783		
	<i>R. toruloides</i> Rt 10		
	<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK113-7D (tiamina)		
	<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK113-7D (solução de vitaminas)		

Tabela 14 – Resumo dos experimentos realizados neste trabalho (continuação)

Curva de calibração para Massa Seca	<i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682	2	Determinar o fator de conversão de Abs <sub>600</sub> em massa seca (g/L) para cada linhagem.
	<i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50678		
	<i>Y. lipolytica</i> Po1g		
	<i>Y. lipolytica</i> W29		
	<i>Y. lipolytica</i> CCT 5443		
	<i>Y. lipolytica</i> CCT 7401		
	<i>R. toruloides</i> CCT 0783		
	<i>R. toruloides</i> Rt 10		
Cinética de acúmulo de lipídeos	<i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682	1	Verificar o instante de cultivo em que estas linhagens apresentam o maior teor de lipídeos.
	<i>R. toruloides</i> Rt 10		
Cultivo para acúmulo de lipídeos	<i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682	3	Determinar os parâmetros de processo fator de conversão de substrato em lipídeos ( $Y_{Lip/S}$ ) e produtividade em lipídeos ( $P_{Lip}$ ), em meio de cultura complexo.
	<i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50678		
	<i>Y. lipolytica</i> Po1g		
	<i>Y. lipolytica</i> W29		
	<i>Y. lipolytica</i> CCT 5443		
	<i>Y. lipolytica</i> CCT 7401		
	<i>R. toruloides</i> CCT 0783		
	<i>R. toruloides</i> Rt 10		

Fonte: elaborada pela autora

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Identificação molecular das espécies

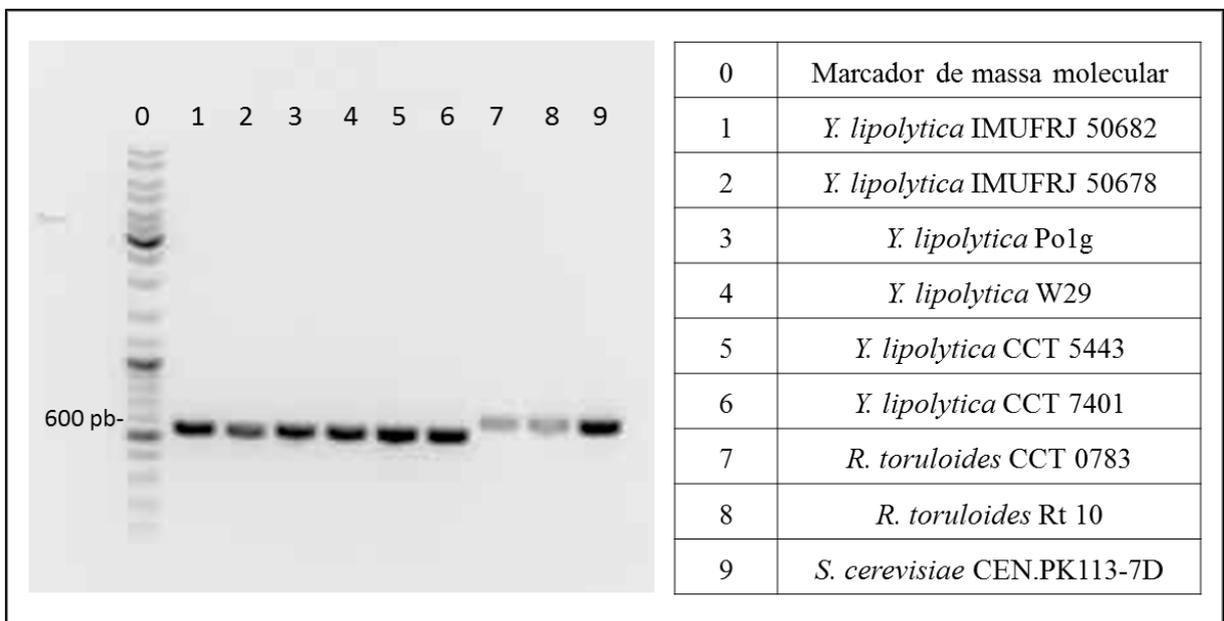
Dentre as 8 linhagens de leveduras estudadas, apenas uma delas foi obtida diretamente de uma coleção de culturas, a linhagem *Y. lipolytica* CCT 5443, conforme já apresentado na Tabela 12 (item 4.4 Microrganismos). Esta linhagem foi obtida da Coleção de Culturas Tropical (CCT), pertencente à Fundação André Tosello, em Campinas, São Paulo. As outras 7 linhagens, inclusive a linhagem comercial *Y. lipolytica* Po1g, foram cedidas por professores da Unicamp e de outras universidades. O incorreto armazenamento ou a maneira como estas linhagens são transportadas de um local para outro, podem ocasionar contaminação, causando dúvida quanto à identidade e pureza de cada cultura. Esta preocupação surgiu no presente trabalho principalmente a partir da oportunidade de se utilizar uma linhagem que há alguns anos estava estocada em geladeira convencional (entre 4 e 10 °C), em tubos de ensaio com meio sólido inclinado, a linhagem *Y. lipolytica* CCT 7401. Diante disto, decidiu-se realizar uma análise molecular de identificação das espécies, conforme proposto por Kurtzman e Robnett (1998), para garantir que as linhagens estudadas são de fato pertencentes às espécies designadas e que não sofreram contaminação.

A identificação de espécies de leveduras, tanto pertencentes ao grupo dos Ascomicetos quanto Basidiomicetos (filo *Ascomycota* e *Basidiomycota*), tem sido realizada, cada vez mais, a partir do sequenciamento do gene correspondente ao domínio D1/D2 da subunidade maior 26S do RNA ribossomal, já que diferentes espécies apresentam variação significativa nesta região (AKPINAR; UÇAR, 2013). Kurtzman e Robnett (1998) analisaram as diferenças entre aproximadamente 500 espécies de leveduras pertencentes à classe dos Ascomicetos, incluindo linhagens de *Y. lipolytica* e *S. cerevisiae*, a partir do sequenciamento desta região. Fell et al. (2000) também utilizaram a mesma metodologia em um estudo sobre a biodiversidade das leveduras pertencentes à classe dos Basidiomicetos, incluindo uma linhagem de *R. toruloides*. Esta metodologia propõe o uso de dois *primers* externos (NL-1 e NL-4) para amplificar da região desejada, em torno de 600 pb.

Após aplicação do protocolo para extração do DNA genômico, amostras de DNA extraídas das 6 linhagens de *Y. lipolytica*, 2 linhagens de *R. toruloides* e 1 linhagem de *S. cerevisiae*, foram submetidas à PCR com os *primers* acima e analisadas por corrida em gel de eletroforese, para verificar as ampliações obtidas. O resultado observado após revelação das

bandas de DNA no gel comprovou que para todas as linhagens foi amplificada a região desejada (em torno de 600 pb), como indicado na Figura 13. É possível observar que, para as linhagens de *Y. lipolytica*, os tamanhos das sequências obtidas foram menores em relação às sequências obtidas para *R. toruloides* e *S. cerevisiae*. Isto também foi observado para as sequências de diversas linhagens publicadas no banco de dados do NCBI, no qual, para a mesma região de amplificação, encontram-se tamanhos em torno de 430 e 500 pb para *Y. lipolytica* e entre 550 e 600 pb para *R. toruloides* e *S. cerevisiae*.

**Figura 13 - Resultado da amplificação após purificação do DNA das 9 linhagens estudadas utilizando os primers NL-1 e NL-4**



Fonte: elaborada pela autora

Outro detalhe interessante sobre o resultado da amplificação está na diferença de tonalidade das bandas de *R. toruloides*, causada pela baixa concentração de DNA obtido após purificação. Após amplificação e purificação do DNA, a concentração de DNA de cada linhagem foi quantificada em NanoDrop (2000, Thermo Fisher Scientific, US) a 260 nm. A Tabela 15 apresenta os resultados obtidos para as concentrações de DNA purificado, para as 9 linhagens estudadas.

Após purificação, as concentrações de DNA obtidas para as duas linhagens de *R. toruloides* foram 2,5 vezes menor que as concentrações para as outras linhagens. Como será discutido posteriormente (item 5.3 Cinéticas de crescimento de linhagens de *Rhodospiridium toruloides*), as duas linhagens de *R. toruloides* apresentam velocidades máxima de consumo de

substrato muito baixas e, portanto, como todas as linhagens foram cultivadas por um mesmo período de tempo (12 h) para extração de DNA, o crescimento celular destas linhagens foi menor, se comparado às linhagens de *Y. lipolytica* e *S. cerevisiae*. Todavia, mesmo tendo sido obtidas estas baixas concentrações de DNA para as linhagens *R. toruloides* CCT 0783 e *R. toruloides* Rt 10, estes valores foram suficientes para a realização do sequenciamento, segundo as exigências do laboratório responsável.

**Tabela 15 - Concentrações de DNA obtidas após amplificação e purificação das amostras de DNA das 9 linhagens estudadas**

<b>Código</b>	<b>Linhagem</b>	<b>DNA (ng/μL)</b>
1	<i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682	72,0
2	<i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50678	65,7
3	<i>Y. lipolytica</i> Po1g	59,1
4	<i>Y. lipolytica</i> W29	60,3
5	<i>Y. lipolytica</i> CCT 5443	64,9
6	<i>Y. lipolytica</i> CCT 7401	64,0
7	<i>R. toruloides</i> CCT 0783	23,1
8	<i>R. toruloides</i> Rt 10	29,5
9	<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK113-7D	61,8

Fonte: elaborada pela autora

Para cada linhagem, foram obtidos quatro cromatogramas, um referente a cada um dos 4 *primers* utilizados no sequenciamento. A partir destes cromatogramas, foi possível montar uma sequência consenso para cada linhagem. A utilização de quatro diferentes *primers* funciona como uma quadruplicata analítica, pois, se algum nucleotídeo resultante da amplificação de um determinado *primer* perder qualidade, ou não for detectado por alguma falha, pelo menos um dos outros *primers* pode confirmar a leitura. Toda a montagem da sequência consenso foi realizada pelo *software* SEQUENCHER® 5.3 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, EUA), o qual alinhou automaticamente as sequências obtidas a partir de cada *primer*. Este *software* consegue detectar e sinalizar possíveis falhas de leitura ou má qualidade nos cromatogramas, que devem ser então analisadas manualmente. As sequências consenso totalizaram um número menor de nucleotídeos do que a quantidade amplificada e purificada; isto é devido à perda de qualidade existente nas extremidades das sequências obtidas com cada *primer*, como é possível observar no cromatograma-exemplo apresentado na Figura 31 (APÊNDICE). Desta maneira, no momento da montagem da sequência consenso, foi necessário descartar manualmente as extremidades das sequências obtidas, pois os resultados não são confiáveis. A Tabela 16 indica

o tamanho da sequência consenso obtida, a linhagem utilizada como referência para o alinhamento, o número de acesso com que a linhagem referência está registrada no portal do NCBI, a porcentagem de identidade e o *E value*. Na Tabela 24 (APÊNDICE) estão apresentadas as sequências consenso obtidas para as 9 linhagens sequenciadas.

Após obtidas as sequências consenso para cada linhagem, as mesmas foram analisadas através do programa *online* Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Este programa compreende uma variedade de ferramentas desenvolvidas para comparar sequências de DNA, RNA ou proteína e interpretar estatisticamente os alinhamentos. A ferramenta utilizada foi a “BLASTN” que compara uma determinada sequência de nucleotídeos (entrada ou *query*) com: todo o banco de dados do NCBI, uma sequência referência ou várias sequências entre si. Primeiramente, foram realizadas comparações das sequências consenso com linhagens referência.

Algumas linhagens de *Y. lipolytica* estudadas neste projeto de mestrado já tiveram o DNA da região correspondente ao domínio D1/D2 do RNA ribossomal sequenciado por outros pesquisadores e depositadas no banco de dados do NCBI, como é o caso das linhagens *Y. lipolytica* W29, *Y. lipolytica* CCT 5443 e *Y. lipolytica* CCT 7401. Portanto, estas linhagens foram escolhidas como linhagens referência para o alinhamento com a respectiva linhagem, usada neste trabalho. Além disso, dentre as três linhagens de *Y. lipolytica* avaliadas por Kurtzman e Robnett (1998), duas delas são as linhagens CCT 5443 e CCT 7401, também denominadas NRRL Y-1095 e NRRL YB-423, respectivamente.

Para as outras três linhagens de *Y. lipolytica* (IMUFRJ 50682, IMUFRJ 50678 e Po1g) não foram encontradas sequências destas mesmas linhagens no NCBI, depositadas por outros autores, portanto foram comparadas com a linhagem *Y. lipolytica* W29. A escolha da *Y. lipolytica* W29 como referência para a linhagem *Y. lipolytica* Po1g deve-se ao fato de que, como já citado na Tabela 13 (item 4.4 Microrganismos), *Y. lipolytica* Po1g é uma linhagem derivada da linhagem selvagem *Y. lipolytica* W29 por uma série de modificações genéticas (Tsigie et al., 2012b). Por ser uma sequência de fácil acesso, a sequência referente à linhagem *Y. lipolytica* W29 também foi escolhida para ser referência de alinhamento com as linhagens *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 e *Y. lipolytica* IMUFRJ 50678.

**Tabela 16 - Tamanho da sequência consenso obtida, linhagem utilizada como referência para o alinhamento, o número de acesso com que a linhagem referência está registrada no portal do NCBI, a porcentagem de identidade e o E value obtidos após alinhamento pela ferramenta BLASTN**

<b>Linhagem</b>	<b>Tamanho da sequência consenso obtida (pb)</b>	<b>Linhagem referência utilizada para alinhamento</b>	<b>Número de Acesso da linhagem referência / N° de nucleotídeos (NCBI)</b>	<b>Identidade</b>	<b>E value</b>
<i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682	510	ATCC 20460 = W29	KC585416 / 432 pb	100%	0,0
<i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50678	433	ATCC 20460 = W29	KC585416 / 432 pb	100%	0,0
<i>Y. lipolytica</i> Po1g	497	ATCC 20460 = W29	KC585416 / 432 pb	100%	0,0
<i>Y. lipolytica</i> W29	436	ATCC 20460 = W29	KC585416 / 432 pb	100%	0,0
<i>Y. lipolytica</i> CCT 5443	438	NRRL Y-1095 = CCT 5443	AM268455 / 497 pb	100%	0,0
<i>Y. lipolytica</i> CCT 7401	482	NRRL YB-423 = CCT 7401	AM268450 / 496 pb	100%	0,0
<i>R. toruloides</i> CCT 0783	600	CBS 349	AF070426 / 603 pb	99%	0,0
<i>R. toruloides</i> Rt 10	595	CBS 349	AF070426 / 603 pb	99%	0,0
CEN.PK113-7D	594	NRRL Y-12632	U44806 / 572 pb	100%	0,0

Identidade corresponde ao tamanho da sequência da linhagem referência que é idêntica à sequência da linhagem alvo (*query*)

Fonte: elaborado pela autora

A linhagem referência para *S. cerevisiae* também foi uma escolha baseada no trabalho de Kurtzman e Robnett (1998), os quais amplificaram e analisaram DNA da linhagem *S. cerevisiae* NRRL Y-12632. Para as linhagens de *R. toruloides*, a escolha da linhagem referência foi baseada nos estudos de Fell et al (2000), a linhagem CBS 349.

Quando alinhadas, as linhagens devem apresentar entre 99 e 100% de identidade para serem consideradas da mesma espécie (AKPINAR; UÇAR, 2013). A Figura 14 apresenta, como exemplo, o alinhamento da linhagem *Y. lipolytica* W29. Deste modo, de acordo com as porcentagens de identidade apresentadas na Tabela 16, pode-se afirmar que todas as linhagens utilizadas neste projeto de mestrado são, de fato, pertencentes à espécie à qual estão designadas. Outro dado estatístico importante é o “*E value*” que, segundo informações disponíveis no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), representa as chances de o alinhamento ocorrer ao acaso. De acordo com os resultados obtidos, todos os alinhamentos foram realizados sem nenhuma chance de que fossem ao acaso.

**Figura 14 - Alinhamento da sequência consenso da linhagem *Y. lipolytica* W29 com a sequência referência *Y. lipolytica* ATCC 20460 (= W29)**

Sequence ID: lcl Query_160055 Length: 432 Number of Matches: 1				
Range 1: 2 to 432 <a href="#">Graphics</a> <span style="float: right;">▼ Next Match ▲ Previous Match</span>				
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
797 bits(431)	0.0	431/431(100%)	0/431(0%)	Plus/Plus
Query 1	GCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAACCCCTCGGGATTGTAAT			60
Sbjct 2	GCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAACCCCTCGGGATTGTAAT			61
Query 61	TTGAAGATTGGCATTGGAGAAAAGCTAACCCCAAGTTGCTTGGAAATAGTACGTCATAGAGG			120
Sbjct 62	TTGAAGATTGGCATTGGAGAAAAGCTAACCCCAAGTTGCTTGGAAATAGTACGTCATAGAGG			121
Query 121	GTGACAACCCCGTCTGGCTAACCGTTCTCCATGTATTGCCTTATCAAAGAGTCGAGTTGT			180
Sbjct 122	GTGACAACCCCGTCTGGCTAACCGTTCTCCATGTATTGCCTTATCAAAGAGTCGAGTTGT			181
Query 181	TTGGGAATGCAGCTCAAAGTGGGTGGTAAACTCCATCTAAAGCTAAATACTGGTGAGAGA			240
Sbjct 182	TTGGGAATGCAGCTCAAAGTGGGTGGTAAACTCCATCTAAAGCTAAATACTGGTGAGAGA			241
Query 241	CCGATAGCGAACCAAGTACTGTGAAGGAAAGGTGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAT			300
Sbjct 242	CCGATAGCGAACCAAGTACTGTGAAGGAAAGGTGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAT			301
Query 301	AGTATGTGAAATTGTTGATAGGGAAGGAAATGAGTGGAGAGTGGCCGAGGTTTCAGCCGC			360
Sbjct 302	AGTATGTGAAATTGTTGATAGGGAAGGAAATGAGTGGAGAGTGGCCGAGGTTTCAGCCGC			361
Query 361	CCCICGTGGGCGGTGTACTGCCGACGCCGAGTCATCGATAGCGAGACGAGGGTTACAAAT			420
Sbjct 362	CCCICGTGGGCGGTGTACTGCCGACGCCGAGTCATCGATAGCGAGACGAGGGTTACAAAT			421
Query 421	GGGAGCGCCTT			431
Sbjct 422	GGGAGCGCCTT			432

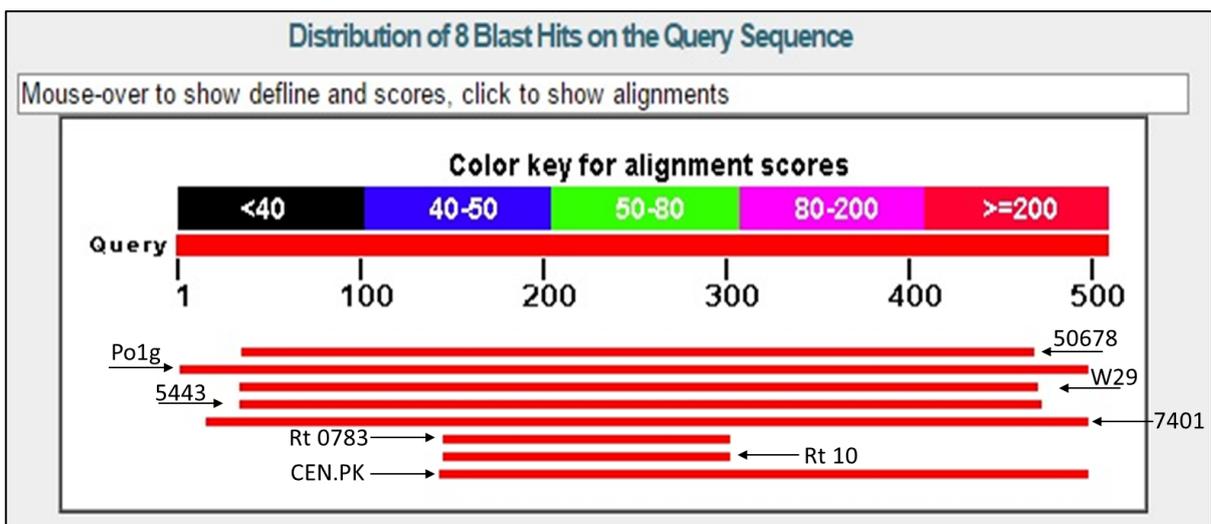
Fonte: obtida através da ferramenta BLASTN, no portal NCBI, com número de identificação do alinhamento

6C7J274D114

Quando duas sequências são comparadas, a ferramenta BLASTN verifica quantos nucleotídeos, em sequência, são idênticos entre as duas sequências a serem comparadas e se, ao longo desta sequência, existe alguma lacuna entre os nucleotídeos, chamada de *gap*. O parâmetro identidade corresponde então ao tamanho da sequência referência que é idêntico à sequência da linhagem alvo (*query*), avaliado como uma porcentagem. Por exemplo, a sequência consenso obtida para a linhagem *Y. lipolytica* W29 possui 436 nucleotídeos, a qual foi comparada com a linhagem referência que possui 432 nucleotídeos (Figura 14). Dentre os 432 nucleotídeos da linhagem referência, 431 foram perfeitamente alinhados e possuem 100% de identidade com a linhagem *query*. Em outras palavras, a sequência referência e a sequência consenso da linhagem *Y. lipolytica* W29 possuem 431 nucleotídeos sequencialmente idênticos, sem que houvesse alguma lacuna entre eles.

Depois de confirmadas as espécies, realizou-se um novo alinhamento entre as 9 sequências consenso obtidas, a fim de verificar o quão diferentes são entre si. Para isso, a ferramenta “BLASTN” requer uma sequência alvo para comparação, chamada “*query*”, e as sequências a serem comparadas com a *query*. As Figura 15 e 16 apresentam, respectivamente, o resumo gráfico e a descrição estatística do alinhamento da linhagem *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 (*query*) com as outras 8 linhagens sequenciadas.

**Figura 15 - Resumo gráfico obtido para o alinhamento da sequência query (*Y. lipolytica* IMUFRJ 50682) com linhagens de *Y. lipolytica* (IMUFRJ 50678, Po1g, W29, CCT 5443 e CCT 7401), *R. toruloides* (CCT 0783 e Rt10) e *S. cerevisiae* (CEN.PK113-7D), obtido pela ferramenta BLASTN**



Fonte: obtida através da ferramenta BLASTN, no portal NCBI, com número de identificação do alinhamento 6CD0ZCYF114

**Figura 16 - Descrição estatística obtida para o alinhamento da sequência query (*Y. lipolytica* IMUFRJ 50682) com linhagens de *Y. lipolytica* (IMUFRJ 50678, Po1g, W29, CCT 5443 e CCT 7401), *R. toruloides* (CCT 0783 e Rt10) e *S. cerevisiae* (CEN.PK113-7D), obtida pela ferramenta BLASTN**

Select: All None Selected:0							
Alignments Download Graphics Distance tree of results							
		Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">50678</a>	800	800	84%	0.0	100%	Query_37198
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Po1g</a>	918	918	97%	0.0	100%	Query_37199
<input type="checkbox"/>	<a href="#">W29</a>	806	806	85%	0.0	100%	Query_37200
<input type="checkbox"/>	<a href="#">5443</a>	809	809	85%	0.0	100%	Query_37201
<input type="checkbox"/>	<a href="#">7401</a>	885	885	94%	0.0	99%	Query_37202
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Rt0783</a>	211	211	30%	4e-59	91%	Query_37203
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Rt10</a>	211	211	30%	4e-59	91%	Query_37204
<input type="checkbox"/>	<a href="#">CEN.PK113-7D</a>	307	307	69%	5e-88	83%	Query_37205

Fonte: obtida através da ferramenta BLASTN, no portal NCBI, com número de identificação do alinhamento 6CD0ZCYF114

Os resultados demonstraram que as 5 linhagens de *Yarrowia lipolytica* apresentam porcentagem de identidade de 99 a 100%, em relação à sequência *query*. No momento em que as sequências das 5 linhagens de *Y. lipolytica* (IMUFRJ 50678, Po1g, W29, CCT 5443 e CCT 7401) foram consideradas, separadamente, como sequência *query*, as porcentagens de identidade são as mesmas, confirmando, mais uma vez, que são da mesma espécie. Quando a *query Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 foi alinhada com linhagens de outra espécie, *R. toruloides* e *S. cerevisiae*, a porcentagem de identidade foi de 91 e 83%, respectivamente. Além da identidade, o parâmetro *E value* também confirmou que estas linhagens são diferentes da sequência alvo, como era o esperado, pois apresentou chance do alinhamento ocorrer ao acaso, uma vez que este valor foi maior que zero. Quando a sequência *query* foi trocada por uma sequência de *R. toruloides*, os resultados são equivalentes, ou seja, 100 % de identidade com a outra linhagem de *R. toruloides* e identidade menor que 99% com as linhagens de *Y. lipolytica* e *S. cerevisiae*. Por fim, utilizando a linhagem *S. cerevisiae* CEN.PK113-7D como *query*, a mesma não apresenta identidade maior ou igual a, pelo menos, 99% com nenhuma outra linhagem alinhada, reafirmando que são espécies diferentes. Logo, os resultados do alinhamento BLASTN comprovaram que a sequência de DNA que codifica o gene correspondente ao domínio D1/D2 da subunidade maior 26S do RNA ribossomal é diferente

entre as espécies de *Yarrowia*, *Rhodospiridium* e *Saccharomyces*. Além disto, a partir destes resultados, pode-se dizer com segurança que as linhagens estudadas nesta dissertação de mestrado são realmente pertencentes às espécies a que foram designadas.

## 5.2 Relação entre medidas de absorvância e concentração celular

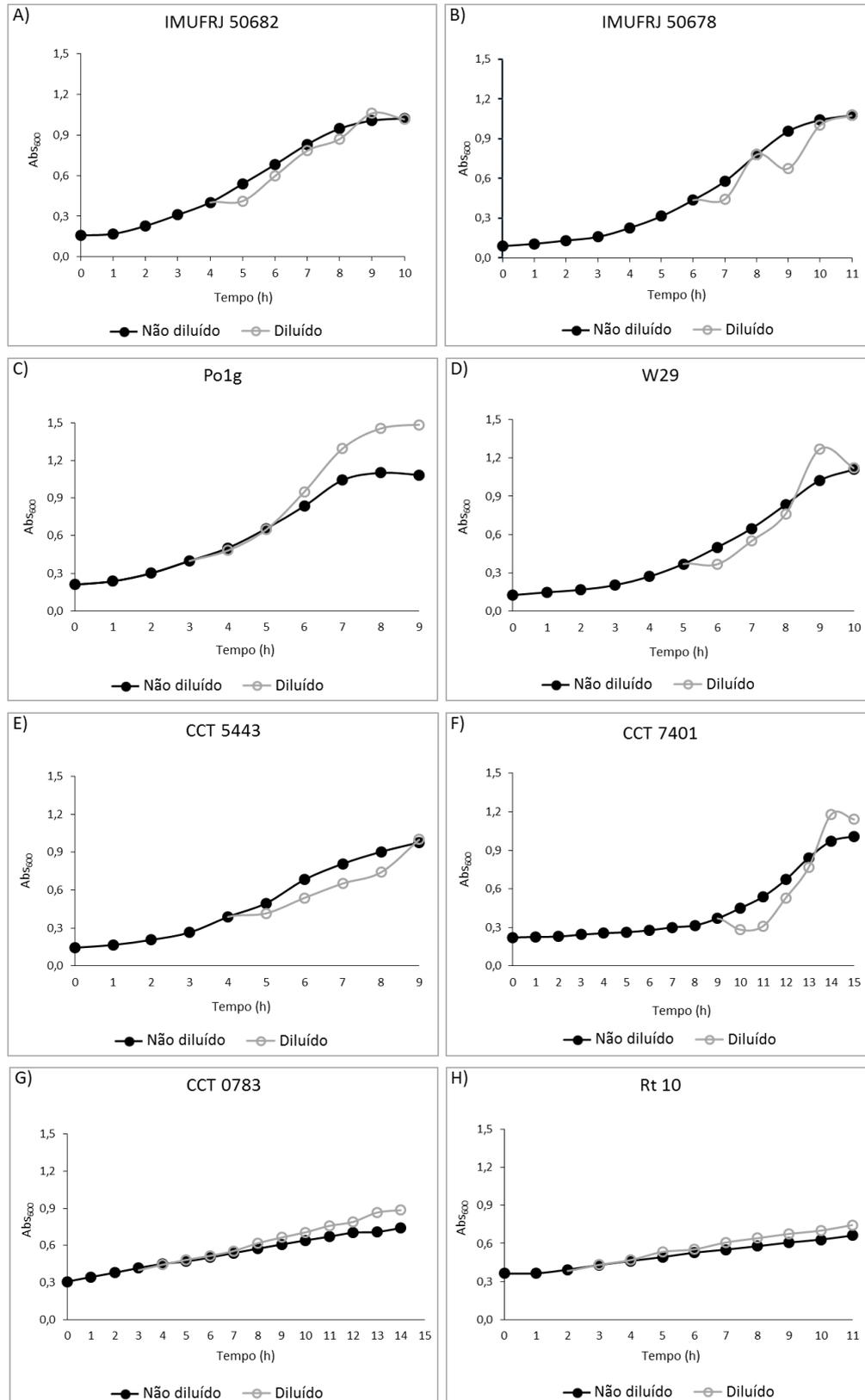
Conforme discutido no item 3.2 da Revisão Bibliográfica (Uso da medida de absorvância para estimar a concentração celular durante o cultivo de microrganismos), um dos cuidados necessários para a utilização de espectrofotômetros como maneira de mensurar a concentração celular é com relação à faixa de linearidade existente entre a leitura realizada pelo equipamento e a concentração celular real, para cada tipo de microrganismo.

Tendo isto em mente, e sabendo que cada microrganismo se comporta de maneira diferente, as 6 linhagens de *Y. lipolytica* e 2 linhagens de *R. toruloides* foram analisadas, separadamente, quanto à faixa de linearidade. Vale ressaltar que, neste trabalho, todas as medidas de Abs<sub>600</sub> para cinéticas de crescimento das linhagens, bem como as curvas de calibração, foram realizadas no mesmo espectrofotômetro (Genesys 20, modelo 4001/4, Thermo Fisher Scientific, EUA).

Como também já mencionado, normalmente amostras de cultivos com leveduras são diluídas para a leitura em espectrofotômetro quando a Abs<sub>600</sub> começa a exceder 0,3 a 0,4. Sabendo disto, para a análise da faixa de linearidade, as amostras retiradas a cada hora – durante os cultivos realizados para as cinéticas de crescimento – foram lidas sem diluição, até atingirem absorvância (a 600 nm) de 0,4 e, a partir deste ponto, as amostras começaram a ser diluídas, quantas vezes fosse necessário, para que a leitura estivesse dentro da faixa confiável (0,2 a 0,4). Os resultados obtidos para as 8 linhagens estudadas estão apresentados na Figura 17.

Dentre as 6 linhagens de *Y. lipolytica* estudadas, 5 delas apresentaram o mesmo comportamento quanto à faixa de linearidade, sendo elas: IMUFRJ 50682, IMUFRJ 50678, W29, CCT 5443 e CCT 7401. Por outro lado, como é possível observar na Figura 17-C, a linhagem *Y. lipolytica* Po1g apresentou diferente comportamento com relação à faixa de linearidade, em comparação com as demais linhagens desta espécie, porém comportamento análogo às linhagens de *R. toruloides*.

**Figura 17 - Análise da faixa de linearidade através de amostras diluídas e não diluídas ( $Abs_{600}$ ) em função do tempo de amostragem, realizadas em frascos agitados a 200 rpm e 30 °C, em meio MDBU e 2,5 g/L de glicerol. A) *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682. B) *Y. lipolytica* IMUFRJ 50678. C) *Y. lipolytica* Po1g. D) *Y. lipolytica* W29. E) *Y. lipolytica* CCT 5443. F) *Y. lipolytica* CCT 7401. G) *R. toruloides* CCT 0783. H) *R. toruloides* Rt 10**



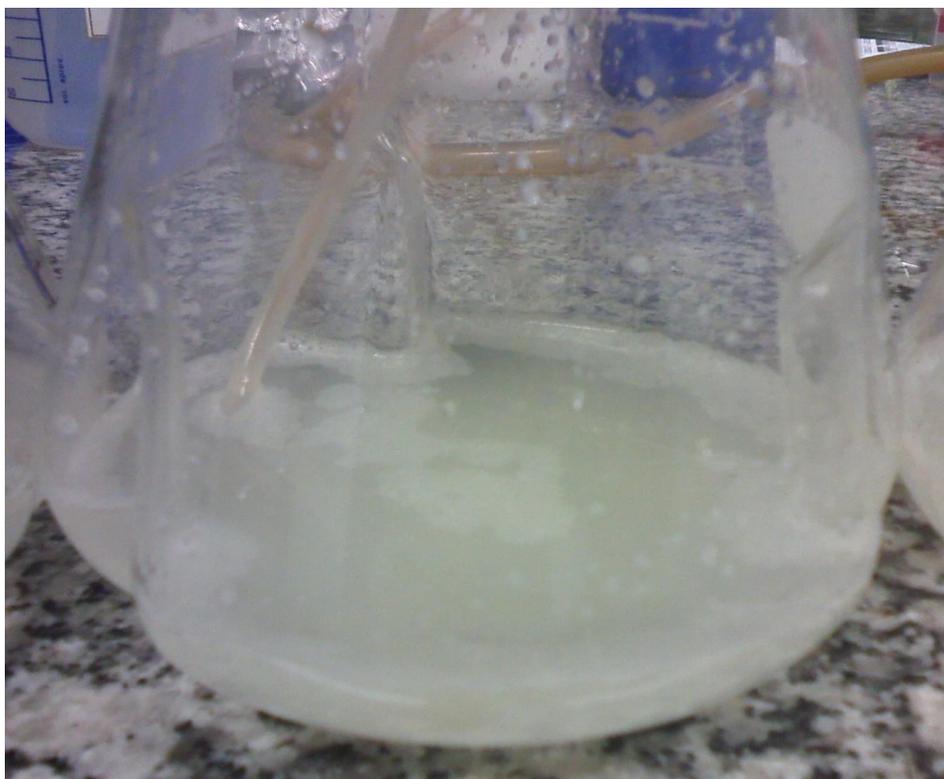
Fonte: elaborada pela autora

De acordo com os resultados obtidos, os cultivos das linhagens *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682, *Y. lipolytica* IMUFRJ 50678, *Y. lipolytica* W29, *Y. lipolytica* CCT 5443 e *Y. lipolytica* CCT 7401 apresentam melhores resultados a partir da leitura de absorbância sem diluição das amostras, mesmo após atingida a faixa de linearidade (i.e., quando as curvas se separam uma da outra). Em contrapartida, para a linhagem *Y. lipolytica* Po1g, as leituras podem ser realizadas sem diluição das amostras até uma  $Abs_{600}$  entre 0,6 e 0,7 e, a partir deste ponto, quando a faixa de linearidade para este microrganismo é excedida, os melhores resultados foram obtidos quando as amostras passaram a ser diluídas. Este tipo de comportamento também é o mesmo observado para as duas linhagens de *R. toulouides* estudadas (Figura 17-G e 17-H), para as quais a faixa de linearidade se manteve até em torno de 0,5; a partir deste ponto, os melhores resultados foram obtidos pelas amostras diluídas. Mais adiante, na Tabela 17 estão apresentados o valor de absorbância máximo mensurado antes que as curvas de  $Abs_{600}$  diluída e não diluída divergem, para cada linhagem.

Durante os cultivos foi observado que, à medida que o tempo de incubação passava gotículas de óleo eram formadas na superfície do meio de cultura líquido (MDBU) e também ficavam aderidas na parede do frasco Erlenmeyer, como apresentado na Figura 18. Além disso, é interessante ressaltar que as laterais das cubetas utilizadas para medidas de absorbância em espectrofotômetro ficavam “manchadas” com uma camada de gordura, após a medição. Normalmente, em nosso laboratório, as cubetas utilizadas são de material plástico e podem ser reutilizadas após lavagem com água e álcool; no entanto, as cubetas utilizadas para medidas de absorbância de amostras das linhagens de *Y. lipolytica* não puderam ser reutilizadas uma vez que as laterais das cubetas perdiam a transparência característica e necessária para que toda a luz emitida pelo equipamento chegassem à amostra.

As propriedades da superfície celular dos microrganismos podem influenciar fortemente a adesão dos microrganismos, tanto em superfícies de materiais quanto em substratos. Estudos realizados sobre a capacidade de adesão de microrganismos demonstrou que a adesão microbiana é melhor com o aumento da hidrofobicidade da superfície celular e do substrato; e que, com relação à superfície de materiais, os microrganismos aderem com maior facilidade à superfícies hidrofóbicas (como PVC) do que à superfícies hidrofílicas (como vidro e metais) (DONLAN; COSTERTON, 2002; RODRIGUES et al., 2009). Estudos realizados com a levedura *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 por Amaral et al. (2006) e Martins et al. (2009) demonstraram que a superfície celular desta levedura é altamente hidrofóbica e, por este motivo, esta levedura é capaz de degradar facilmente substratos hidrofóbicos.

**Figura 18 – Imagem demonstrando a formação de gotículas de óleo durante o cultivo da linhagem *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 realizado em frasco agitado a 200 rpm e 30 °C, em meio MDBU e 2,5 g/L de glicerol, representando o comportamento apresentado também pelas linhagens *Y. lipolytica* IMUFRJ 50678, *Y. lipolytica* W29, *Y. lipolytica* CCT 5443 e *Y. lipolytica* CCT 7401**



Fonte: arquivo da autora

As diluições das amostras, antes da medida de absorvância, eram realizadas com água destilada e, mesmo tomando todos os cuidados necessários, foi observado que a suspensão não era totalmente homogênea e parte da suspensão ficava aderida nas laterais da cubeta. Por este motivo, a medida da absorvância durante os cultivos da maioria das linhagens de *Y. lipolytica* sem diluição prévia foi a melhor opção.

Amaral et al. (2006) também estudou a hidrofobicidade da levedura e *Y. lipolytica* W29 e concluiu que esta linhagem possui superfície celular menos hidrofóbica em comparação com a linhagem IMUFRJ 50682. Porém, com relação à melhor maneira de mensurar a absorvância da suspensão celular (ou seja, com ou sem diluição prévia), a linhagem *Y. lipolytica* W29 apresentou o mesmo comportamento.

O comportamento apresentado pelas leveduras *Y. lipolytica* Po1g, *R. toruloides* CCT 0783 e *R. toruloides* Rt 10, no qual a melhor maneira de realizar as medidas de absorvância foi com diluição prévia das amostras – após atingirem a faixa de linearidade – é condizente com o

observado em laboratório com o decorrer dos experimentos. Ou seja, durante os cultivos, não foi observada a formação de góticulas de óleo e “manchas” na lateral das cubetas, o que permitiu que as diluições com água formassem uma suspensão homogênea. Apesar da linhagem *Y. lipolytica* Po1g ser uma *Y. lipolytica*, é importante lembrar que esta linhagem se trata de uma cepa modificada da linhagem *Y. lipolytica* W29 e que, é possível, que as modificações realizadas possam ter influenciado na hidrofobicidade da superfície celular.

Neste sentido, vale ressaltar ainda que os espectrofotômetros também apresentam medidas diferentes, dependendo do sistema óptico, o qual se refere à maneira como a luz emitida atravessa a cubeta. Conforme apresentado no item 3.2 (Uso da medida de absorvância para estimar a concentração celular durante o cultivo de microrganismos), espectrofotômetros são equipamentos que promovem a transmissão de um feixe de luz através de uma amostra, sendo a luz transmitida (que atravessa toda a amostra) registrada por um detector que fica à jusante da amostra (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2008). Existem dois tipos de sistemas ópticos: sistema *forward* (para frente) ou sistema *reverse* (reverso). No sistema *forward* a luz policromática emitida é primeiramente fracionada por um prisma que, a partir do comprimento de onda escolhido, transmite uma luz monocromática que passa através da amostra e vai para o detector. Já no sistema *reverse*, a luz policromática atravessa diretamente a amostra, a qual reflete a luz para o prisma e vai para o detector, sendo a absorvância detectada em diferentes comprimentos de onda (MATLOCK et al., [s. d.]).

Matlock et al. [s. d.] em um boletim técnico publicado pela empresa Thermo Fisher Scientific para identificar as diferenças entre medidas de concentração celular bacteriana em diferentes espectrofotômetros, também identificaram a necessidade da realização de diluição prévia das amostras. Nesta publicação, os autores cultivaram a bactéria *E. coli* JM109-endA1, no modo batelada, em frasco de 2 L (com deflectores), em caldo LB (Luria Bertani), a 37 °C e 250 rpm por 9,5 h. A cada 30 min uma alíquota do cultivo foi retirada para medidas de absorvância a 600 nm em dois espectrofotômetros, um com sistema óptico *forward* e outro *reverse*. Para ambos os sistemas ópticos, os resultados demonstraram que para esta bactéria, nestas condições de cultivo, é necessária a diluição das amostras após atingida a faixa de linearidade. No equipamento funcionando com sistema *forward* a faixa de linearidade foi atingida a partir de absorvância em torno de 1,0; enquanto que para o espectrofotômetro com sistema *reverse*, a faixa de linearidade foi atingida a partir de 3,0.

Kock (1970) cultivou a bactéria *E. coli* (linhagem B) em glicose e meio M9 e realizou medidas de absorvância da suspensão na fase exponencial de crescimento. As leituras de absorvância foram realizadas a 420 e 600 nm em cinco espectrofotômetros diferentes, com

amostras muito diluídas. A diferença de medida entre os equipamentos foi avaliada em relação à razão  $Abs_{420}/Abs_{600}$ . Os resultados demonstraram que a razão  $Abs_{420}/Abs_{600}$  variou de 1,59 a 2,13, comprovando que existe diferença na leitura de absorvância de uma mesma amostra, em diferentes equipamentos.

Estes resultados demonstraram a importância de se mensurar a faixa de linearidade para cada microrganismo, antes de seu estudo, sempre que se pretenda utilizar medidas de absorvância como forma indireta de medida de concentração celular. Microrganismos se comportam de diferentes maneiras, ainda que sejam de uma mesma espécie, portanto, protocolos de cultivo, ou de medidas de parâmetros, desenvolvidos para um determinado microrganismo, não devem ser utilizados para outras espécies, até mesmo linhagens, sem uma prévia confirmação de que este protocolo funcionará. Além disso, é importante entender que cada espectrofotômetro pode mensurar diferentes absorvâncias e, portanto, a faixa de linearidade também deve ser mensurada em cada equipamento que se deseja utilizar. Por fim, é necessário tomar todos os cuidados para que o uso da absorvância como medida indireta da concentração celular seja aplicada de forma a garantir a correta leitura deste parâmetro.

Após verificadas as faixas de linearidade para cada linhagem, cultivos para cinéticas de crescimento, em triplicata biológica, foram realizados tomando-se medidas de  $Abs_{600}$  e pH com o decorrer do tempo, respeitando a faixa de absorvância e necessidade, ou não, de diluição. Esta etapa do trabalho teve como objetivo determinar parâmetros fisiológicos de cada linhagem durante a fase exponencial de crescimento, portanto, logo após cada amostragem, o valor do logaritmo natural da  $Abs_{600}$  mensurado foi plotado em função do tempo para observar, em tempo real, o início da fase estacionária e conseqüentemente o fim das amostragens. Os valores de absorvância mensurados para cada linhagem foram multiplicados pelo fator de conversão correspondente à linhagem para serem convertidos em massa seca de células (g/L). Na Figura 32 (APÊNDICE) estão apresentadas as curvas de calibração, em duplicata biológica, para cada linhagem de *Y. lipolytica* e na Figura 33 (APÊNDICE) para as linhagens de *R. toruloides*. Como detalhado no item 4.12.2 (Curva de calibração para conversão de absorvância em massa seca), o fator de conversão foi obtido pela média entre os coeficientes angulares das duplicatas biológicas e estão apresentados na Tabela 17, juntamente com a faixa de linearidade de cada linhagem.

**Tabela 17 - Limite superior de absorvância e fator de conversão de absorvância em massa seca para as 8 linhagens estudadas. Cultivos realizados em frascos agitados a 200 rpm e 30 °C, em meio MDBU e 2,5 g/L de glicerol**

<b>Linhagem</b>	<b>Limite superior (Abs<sub>600</sub>)</b>	<b>Fator de conversão de Abs<sub>600</sub> em massa seca</b>
<i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682	0,402	0,8962 ± 0,0050
<i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50678	0,469	0,9602 ± 0,0465
<i>Y. lipolytica</i> Po1g	0,656	1,0346 ± 0,0189
<i>Y. lipolytica</i> W29	0,370	1,0908 ± 0,0913
<i>Y. lipolytica</i> CCT 5443	0,388	0,8959 ± 0,0397
<i>Y. lipolytica</i> CCT 7401	0,370	0,8588 ± 0,1736
<i>R. toruloides</i> CCT 0783	0,539	0,4765 ± 0,0061
<i>R. toruloides</i> Rt 10	0,463	0,5200 ± 0,1289

Limite superior corresponde à absorvância máxima em que as curvas de Abs<sub>600</sub> diluída e não diluída não se separam

Fator de conversão obtido pela média entre as replicatas biológicas

Fonte: elaborada pela autora

Como também foi mencionado no item Revisão Bibliográfica, em culturas microbianas, a luz que atravessa a amostra é detectada em termos dos fenômenos de absorção e dispersão de luz causada pelas partículas em suspensão. Portanto, deve-se escolher um comprimento de onda em que não haja absorvância por componentes do meio (KOCH, 1970; MYERS et al., 2013). Para verificar se o espectrofotômetro estaria mensurando algum produto ou componente do meio no comprimento de onda escolhido (600 nm), foram realizadas análises de espectrometria de varredura em diferentes fases de crescimento das linhagens estudadas.

Durante os cultivos de cada linhagem, uma amostra de cada fase de crescimento (*lag*, exponencial e estacionária) foi submetida à espectrometria de varredura. Primeiramente, o espectrofotômetro foi zerado utilizando água destilada como branco, já que água foi sempre utilizada para diluir as amostras, quando necessário, durante as medidas de absorvância. Em seguida uma parte da alíquota amostrada, contendo meio de cultura e células, foi analisada em comprimento de onda de 350 a 700 nm. Em todas as linhagens, o equipamento mensurou apenas as células presentes no meio de cultura, em torno de 550 e 650 nm. Em paralelo, outra alíquota

amostrada foi centrifugada para separação do meio de cultura e as células. O sobrenadante resultante da centrifugação (i. e., o meio de cultura sem células) foi analisado na mesma faixa de comprimento de onda. Para o sobrenadante, o equipamento reportou valor zero de absorvância em todos os comprimentos de onda. Isto deve-se ao fato de que, uma vez que água e o meio de cultura MDBU são igualmente detectados pelo equipamento, quando o espectrofotômetro foi zerado com água, o meio de cultura foi detectado com absorvância zero. Estas análises, na presença ou não das células, comprovaram que o comprimento de onda escolhido, ou seja 600 nm, foi ideal para mensurar a presença das células nos cultivos de *Y. lipolytica* e *R. toruloides*, sem que houvesse interferência de qualquer outro composto dissolvido no meio.

### 5.3 Cinéticas de crescimento de linhagens de *Yarrowia lipolytica*

O objetivo principal proposto por este trabalho foi comparar características fisiológicas e de acúmulo lipídico de diferentes linhagens da levedura *Y. lipolytica*. Para cumprir este objetivo, buscamos por linhagens disponíveis em bancos de cultura próximos e laboratórios que estivessem/estejam estudando esta levedura. Os trabalhos desenvolvidos na Universidade de São Paulo (USP), por Oliveira (2014) e Bacciotti (2015), também orientados pelo Prof. Andreas Karoly Gombert, utilizaram as linhagens *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 e *Y. lipolytica* W29 e foram disponibilizadas para este trabalho de mestrado. Estas duas linhagens foram cedidas à USP pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, a qual também disponibilizou as linhagens *Y. lipolytica* IMUFRJ 50678 e *Y. lipolytica* Po1g para este trabalho. A linhagem *Y. lipolytica* CCT 5443 foi disponibilizada pela Coleção de Culturas Tropical, pertencente à Fundação André Tosello, em Campinas, São Paulo. Por fim, a linhagem *Y. lipolytica* CCT 7401 estava estocada no próprio laboratório em que este trabalho de mestrado foi desenvolvido (LEMeB), pois foi utilizada por um antigo aluno. Desta forma, seis linhagens da levedura *Y. lipolytica* foram coletadas para estudo comparativo.

Um primeiro cultivo para levantamento da cinética de crescimento da linhagem *Y. lipolytica* Po1g foi realizado exatamente como para as outras linhagens de *Y. lipolytica*, ou seja, apenas com meio MDBU, solução de tiamina e elementos-traço A (conforme descrito no item 4.7 Cultivos para cinéticas de crescimento). Neste cultivo, a linhagem *Y. lipolytica* Po1g apresentou bom crescimento na etapa de pré-inóculo (em YPD) com Abs<sub>600</sub> final em torno de 3,0 (média entre as triplicatas). Quando transferida para a etapa de inóculo (MDBU), a linhagem apresentou pouco crescimento, porém com Abs<sub>600</sub> final suficiente para inoculação, de

aproximadamente 0,4 (média entre as triplicatas). Contudo, na etapa de cultivo esta linhagem não apresentou crescimento, mantendo  $Abs_{600}$  constante. Após 10 h de cultivo, foi realizada uma contagem de células viáveis em microscópio, utilizando corante eritrosina, e foi observado que a viabilidade celular foi de 0%, ou seja, além de não haver crescimento celular, as células perderam a viabilidade.

Segundo o catálogo informativo YLEX *Expression Kit* (números FYY201-1KT e FYY301-120P) da empresa *Yeastern Biotech Co., Ltd*, que comercializa um kit baseado na levedura *Y. lipolytica* para expressão de altos níveis de proteínas recombinantes (composto pela linhagem *Y. lipolytica* Po1g, vetores e primers), a linhagem *Y. lipolytica* Po1g é derivada da linhagem selvagem *Y. lipolytica* W29, a qual sofreu uma série de modificações genéticas. Esta linhagem teve o gene *URA3* interrompido com o gene *SUC2* de *Saccharomyces cerevisiae* e os genes *LEU2*, *XPR2* e *AXP* deletados – sendo estes dois últimos para incapacitar a linhagem de produzir qualquer protease extracelular. Desta forma, esta linhagem comercial é auxotrófica para uracila e leucina, sendo necessária a adição destes aminoácidos ao meio de cultivo para crescimento desta linhagem.

Durante o pré-inóculo a linhagem *Y. lipolytica* Po1g apresentou crescimento pois foi cultivada em meio YPD, um meio complexo que possui em sua formulação extrato de levedura. O extrato de levedura utilizado, marca Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA), segundo a empresa responsável, é fabricado sob condições controladas para manter o teor de vitaminas e aminoácidos livres e possui em sua composição uma concentração maior ou igual a 4,5% de aminoácidos. Por este motivo, as células da linhagem *Y. lipolytica* Po1g foram capazes de crescer na etapa de pré-inóculo – sem adição de uracila e leucina. Já que a passagem para a etapa de inóculo foi realizada por simples transferência de volume do pré-inóculo para o inóculo, sem lavagem das células, provavelmente os resíduos de extrato de levedura carregados da etapa anterior contribuíram para o crescimento da linhagem, ainda que tenha sido em pequena proporção. Para a etapa do cultivo principal, já que as células foram lavadas e centrifugadas para eliminar qualquer resquício de meio proveniente das etapas anteriores, as células não foram capazes de crescer em ausência de uracila e leucina. Sabendo disto, a linhagem *Y. lipolytica* Po1g passou então a ser cultivada nas mesmas condições das demais linhagens, porém com a adição de uracila e leucina a 0,1 g/L cada, durante as etapas em que extrato de levedura não foi utilizado, isto é, nas etapas de inóculo e cultivo.

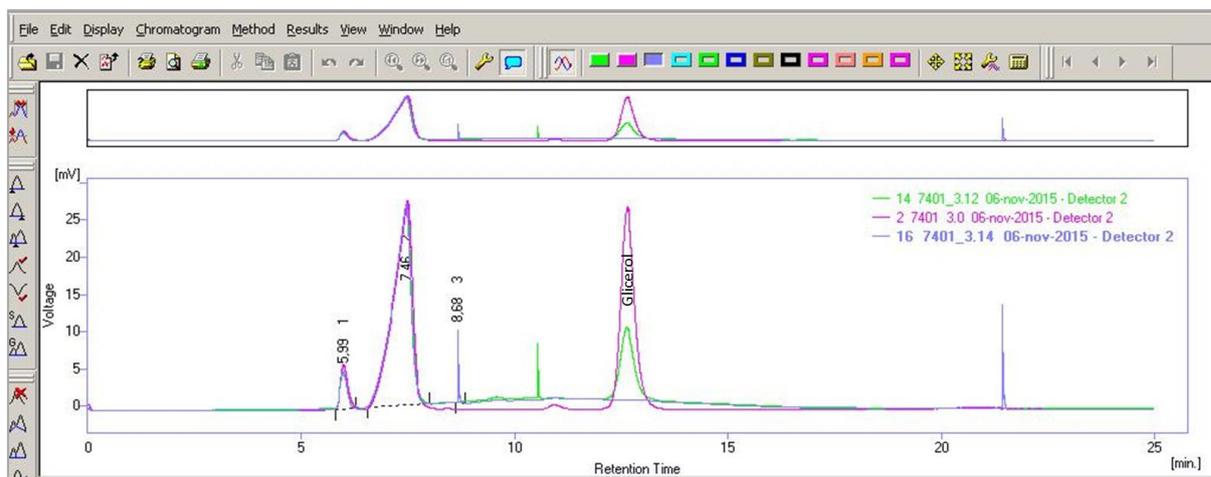
Realizou-se também dois cultivos com a levedura *S. cerevisiae* CEN.PK113-7D, a partir do protocolo para *Y. lipolytica* (meio MDBU, solução de tiamina, elementos-traço A e glicerol como fonte de C), a fim de verificar se este protocolo funcionaria para aquela levedura.

Houve diferença apenas na etapa de inoculação do pré-inóculo, durante a qual células de uma colônia isolada em placa contendo meio YPD sólido foram transferidas, com uma alça, para meio líquido YPD, seguindo-se a partir deste ponto todos os procedimentos do protocolo de *Yarrowia*. Quando cultivada desta forma, *S. cerevisiae* apresentou crescimento vigoroso em meio YPD (pré-inóculo), porém baixo crescimento em glicerol 20 g/L como única fonte de carbono e energia, atingindo durante a etapa de inóculo  $Abs_{600}$  de 0,2 (média entre as triplicatas). Devido ao baixo crescimento, o cultivo não foi levado à diante. Sabe-se que a levedura *S. cerevisiae* possui crescimento fraco ou variável em glicerol como única fonte de carbono e não apresenta crescimento sem a presença de vitaminas no meio (VAUGHAN-MARTINI; MARTINI, 2011). Para verificar se a presença de apenas tiamina no meio foi o fator limitante para o crescimento, e não o glicerol, um segundo cultivo foi realizado trocando-se a solução de tiamina pela solução de vitaminas proposta por Verduyn et al. (1992) e muito utilizada para cultivo de *S. cerevisiae*. Neste segundo cultivo, a levedura apresentou o mesmo comportamento do cultivo anterior, ou seja, crescimento em YPD e baixo crescimento na etapa de inóculo (glicerol a 20 g/L iniciais). Durante a etapa de inóculo o crescimento atingiu, também, em torno de 0,2 ( $Abs_{600}$  média entre as triplicatas), podendo este crescimento ser propiciado pelos resquícios do meio YPD usado na etapa anterior. Estes dois cultivos confirmaram que *S. cerevisiae* CEN.PK113-7D não é capaz de crescer em glicerol como única fonte de carbono, em meio totalmente definido. Vários estudos reportam que linhagens de *S. cerevisiae* apresentam crescimento em glicerol como única fonte de carbono apenas na presença de suplementos como peptona, extrato de levedura ou até mesmo glicose como substrato *starter* (SWINNEN et al., 2013).

Estabelecidas as necessidades nutricionais da linhagem *Y. lipolytica* Po1g, as 6 linhagens de *Y. lipolytica* foram cultivadas de maneira idêntica e conforme o protocolo descrito no item 4 (Material e Métodos). Após realizadas as conversões de  $Abs_{600}$  para massa seca (g/L), os dados foram plotados em função do tempo, juntamente com as medidas de pH. As amostras retiradas a cada instante foram também analisadas em HPLC para detecção da concentração de glicerol (g/L) e para avaliar o aparecimento de eventuais picos que poderiam representar algum produto metabólico excretado (ácidos orgânicos, carboidratos, aldeídos, cetonas, alcoóis ou produtos da fermentação). O tempo de retenção para o glicerol foi identificado a partir da construção de uma curva de calibração deste composto. Esta calibração foi obtida pela injeção de glicerol grau HPLC (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) em diferentes concentrações, variando entre 0,5 e 10 g/L para garantir o ajuste da curva. A fim de exemplificar o consumo de glicerol durante os cultivos, a Figura 19 apresenta os cromatogramas obtidos para a linhagem *Y.*

*lipolytica* CCT 7401 nos instantes 0, 12 e 14 h de cultivo. Vale ressaltar que foram obtidos cromatogramas para todas as replicatas de cada linhagem, a cada instante de cultivo (de hora em hora).

**Figura 19 - Cromatogramas obtidos em HPLC para tempos 0 h (linha rosa), 12 h (linha verde) e 14 h (linha azul) do cultivo de *Y. lipolytica* CCT 7401 em meio MDBU (2,5 g/L iniciais de glicerol), a 30 °C e 200 rpm**



Fonte: arquivo da autora

De acordo com a curva de calibração, o tempo de retenção para o glicerol, utilizando esta coluna e detector (descrição no item 4.12.3) foi de 12,6 min. A linha rosa indica uma amostra do tempo zero de cultivo, a linha verde indica uma amostra do tempo 12 h e a linha azul indica uma amostra do final do cultivo ( $t = 14$  h), para uma das replicatas biológicas. Como pode ser observado, nos tempos inicial (linha rosa) e 12 h (linha verde) o equipamento detectou um pico em 12,6 min (i.e., pico de glicerol) e, a partir da curva de calibração previamente realizada, a concentração de glicerol nestas amostras foi mensurada, sendo 2,030 e 0,509 g/L, respectivamente. No tempo final (linha azul) o equipamento não detectou a presença de glicerol, pois reportou uma linha com voltagem “zero” em 12,6 min, comprovando que a fonte de carbono (glicerol) foi totalmente consumida com o decorrer do tempo de cultivo. Os resultados obtidos também em HPLC, de uma das replicatas, das análises realizadas para as linhagens estudadas encontram-se apresentados na Figura 20. Todos os resultados obtidos durante as cinéticas de crescimento, a cada instante, de todas as replicatas estão apresentados na Tabela 25 (APÊNDICE) para as linhagens de *Y. lipolytica*.

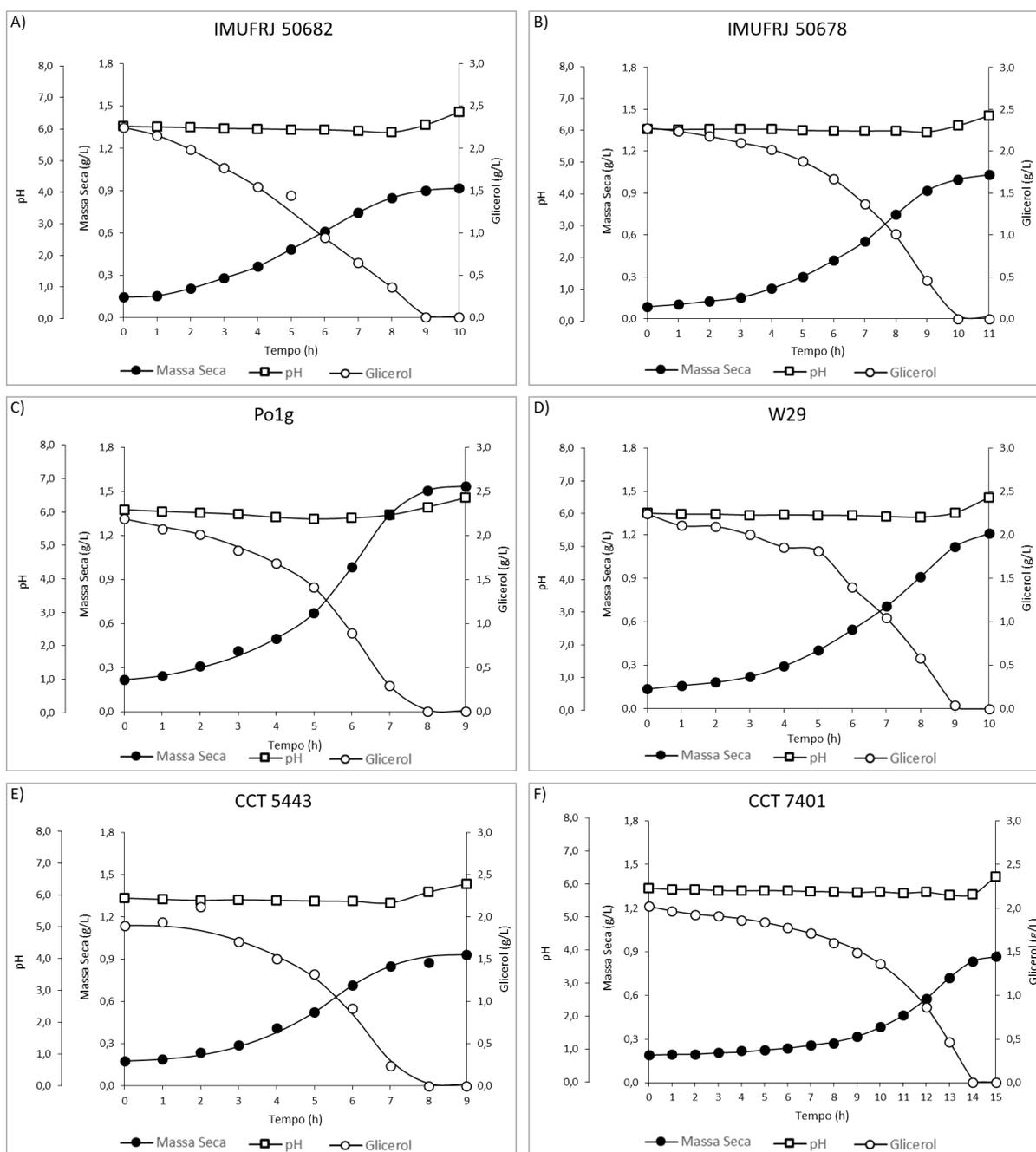
Os cromatogramas demonstraram também que nenhum produto metabólico foi formado e excretado no decorrer dos cultivos com as linhagens de *Y. lipolytica*, já que nenhum

outro pico foi detectado (além do pico correspondente ao glicerol), em nenhum dos cultivos realizados. O fato de o pH ter permanecido praticamente constante ao longo de todo o cultivo (Figura 20), para todas as linhagens, em meio de cultivo sem tamponamento e com ureia como fonte de N, é também um sinal de que não foram excretados ácidos orgânicos, os quais causariam queda do pH ao longo do cultivo. Os dois primeiros picos que aparecem nos cromatogramas, nos instantes 5,99 e 7,45 min (Figura 19), representam os componentes presentes no meio de cultura. Isto foi identificado pela injeção de uma amostra do meio de cultura MDBU estéril, nas mesmas condições de temperatura e tempo de corrida das amostras dos cultivos cinéticos. Os picos que aparecem nos tempos 8,68 e 21,5 min (linha azul) e 10,5 min (linha verde) na realidade não são considerados picos e sim ruídos que eventualmente podem aparecer nos cromatogramas.

Por fim, como não houve produção extracelular de metabólitos, apenas curvas de crescimento, pH e consumo de substrato foram plotadas em função do tempo e estão apresentadas na Figura 20. Nesta figura estão apresentados os gráficos cinéticos de apenas uma das replicatas realizadas com cada linhagem de *Y. lipolytica* estudada. Os outros dois gráficos obtidos em cada triplicata biológica podem ser visualizados na Figura 36 (APÊNDICE).

Nas curvas apresentadas nos gráficos da Figura 20, os símbolos (círculo cheio para a concentração celular, círculo vazio para a concentração de glicerol e quadrado vazio para o pH) representam os dados experimentais obtidos. As linhas de tendência traçadas representam o comportamento esperado para cada variável ao longo do tempo, ou seja, procuram eliminar a influência de eventuais erros experimentais, que podem ter várias causas, durante a realização de experimentos no laboratório. Algumas destas possíveis fontes de erro são: o experimentador pode manipular algum equipamento ou instrumento de laboratório de maneira incorreta; os próprios equipamentos e utensílios como, por exemplo, o espectrofotômetro (como já mencionado) podem variar na leitura da absorbância, dependendo da presença de muitas ou de poucas células; os pipetadores também apresentam um erro inerente, mesmo quando calibrados, o que pode causar variação nos volumes pipetados; erros realizados durante procedimentos de amostragem (por exemplo por causa da não retirada do volume morto presente na mangueira por onde sai a amostra); erros inerentes às determinações analíticas (por exemplo por HPLC); entre outros. Portanto, mesmo tomando o máximo de cuidado possível, alguns erros podem ocorrer.

**Figura 20 - Cinéticas de crescimento de linhagens de *Y. lipolytica* realizadas em meio MDBU (2,5 g/L iniciais de glicerol), a 30 °C e 200 rpm. A) IMUFRJ 50682. B) IMUFRJ 50678. C) Po1g. D) W29. E) CCT 5443. F) CCT 7401**



Fonte: elaborado pela autora

Os microrganismos cultivados em batelada (ou em regime descontínuo) apresentam normalmente um comportamento típico, caracterizado por algumas fases do crescimento, como: *lag*, *log* ou exponencial, de desaceleração e estacionária (MONOD, 1949; DORAN, 1995; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2008). Partiu-se deste pressuposto para ajustar as linhas de tendência, conforme apresentadas na Figura 20. Cabe ressaltar que há casos em que

não necessariamente um microrganismo apresenta claramente uma fase exponencial, com velocidade específica constante e fator de conversão de substrato a células constante. No entanto, no caso do presente trabalho, sempre observamos constância nos valores de  $\mu_{m\acute{a}x}$  e  $Y_{X/S}^{exp}$ , durante a fase exponencial dos cultivos realizado com *Y. lipolytica*.

Quando alguns pontos experimentais divergem do comportamento esperado, linhas de tendências ou linhas suavizadas podem ser traçadas. Esta é uma técnica chamada de “alisamento” e serve para eliminar da tendência que se acredita estar correta a influência de erros experimentais, conforme discutido acima. Assim, caso não haja erros experimentais, todos os pontos estariam sobre a curva de tendência. A linha suavizada pode ser desenhada por *software* computacional, contendo rotinas pré-programadas de acordo com princípios matemáticos ou estatísticos; ou por uma técnica denominada “suavização à mão”, a qual foi a escolhida para este trabalho, já que curvas de crescimento microbiano não são facilmente representadas por uma equação matemática (DORAN, 1995). Cabe mencionar que este procedimento não foi realizado neste trabalho verdadeiramente à mão (em papel milimetrado, por exemplo), mas sim usando planilhas eletrônicas (no caso, o *software Microsoft Office Excel*<sup>®</sup>). A suavização à mão apresenta sobre as técnicas puramente computacionais a vantagem de o experimentador poder julgar sobre a importância e a confiabilidade que tem sobre cada dado experimental obtido (DORAN, 1995).

Através das cinéticas de crescimento obtidas, foi observado que a tendência da variável concentração celular (expressa em termos da massa seca de células, obtida por conversão a partir de dados de absorvância, conforme detalhado no item 5.2) não necessitou de alisamento em todas as linhagens estudadas; porém, a variável concentração de glicerol requereu alisamento para ajustar a tendência. Isto foi devido às dificuldades encontradas neste trabalho para mensurar baixas concentrações de glicerol no meio. Como também pode ser visto, além de alguns pontos experimentais terem divergido da linha de tendência, foi proposto que os cultivos fossem iniciados com uma concentração de 2,5 g/L de glicerol, porém o equipamento não conseguiu detectar com precisão estes valores.

As linhas suavizadas servem também para que se obtenham os dados necessários ao cálculo dos parâmetros fisiológicos  $\mu_{m\acute{a}x}$  e  $Y_{X/S}^{exp}$ . Ambos foram obtidos graficamente (gráficos apresentados nas Figuras 34 e 35 do APÊNDICE) e, a partir destes dois parâmetros,  $r_s^{m\acute{a}x}$  foi calculada para cada linhagem, pela Equação 14. Além destes parâmetros fisiológicos, foi também calculado  $Y_{X/S}^{global}$ , a partir dos valores de concentração de glicerol e massa seca de células, nos instantes inicial e final do cultivo (Equação 15). Os valores obtidos para todos estes

parâmetros, em cada replicata, foram então avaliados estatisticamente, ao nível de significância de 10%, pelo teste de Tukey, para observar se havia diferença significativa entre as linhagens. Os resultados estão apresentados na Tabela 18.

**Tabela 18 – Parâmetros fisiológicos: velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ), fator de conversão de substrato em biomassa na fase expobencial ( $Y_{X/S}^{exp}$ ) e velocidade específica máxima de consumo de substrato ( $r_S^{m\acute{a}x}$ ); e parâmetro de processo: fator global de conversão de substrato em biomassa ( $Y_{X/S}^{global}$ ), para os cultivos realizados em MDBU e glicerol como fonte única de carbono (2,5 g/L iniciais), para as linhagens de *Y. lipolytica* estudadas**

Linhagem	$\mu_{m\acute{a}x}$ [h <sup>-1</sup> ]	$Y_{X/S}^{exp}$ [(g MS).(g S) <sup>-1</sup> ]	$r_S^{m\acute{a}x}$ [(g S).(g MS <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )]	$Y_{X/S}^{global}$ [(g MS).(g S) <sup>-1</sup> ]
<i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682	0,26 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,37 ± 0,02 <sup>ac</sup>	0,70 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,32 ± 0,02 <sup>a</sup>
<i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50678	0,32 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,55 ± 0,04 <sup>ab</sup>	0,57 ± 0,05 <sup>ab</sup>	0,44 ± 0,04 <sup>b</sup>
<i>Y. lipolytica</i> Po1g	0,31 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,64 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,49 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,59 ± 0,01 <sup>c</sup>
<i>Y. lipolytica</i> W29	0,29 ± 0,01 <sup>ab</sup>	0,43 ± 0,07 <sup>abc</sup>	0,68 ± 0,12 <sup>ab</sup>	0,45 ± 0,04 <sup>b</sup>
<i>Y. lipolytica</i> CCT 5443	0,31 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,49 ± 0,05 <sup>abc</sup>	0,65 ± 0,12 <sup>ab</sup>	0,36 ± 0,04 <sup>ab</sup>
<i>Y. lipolytica</i> CCT 7401	0,18 ± 0,03 <sup>c</sup>	0,33 ± 0,05 <sup>c</sup>	0,57 ± 0,09 <sup>ab</sup>	0,34 ± 0,01 <sup>ab</sup>

Médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não apresentam diferença significativa entre si ( $p > 0,1$ ) pelo teste de Tukey

As médias e desvios-padrão foram obtidos a partir das triplicatas biológicas de cinética de crescimento realizadas com cada linhagem

Fonte: elaborada pelo autor

Segundo Monod (1949), o crescimento de um microrganismo só pode ser mensurado com garantia (i. e., com maior precisão), quando os fatores limitantes do crescimento são totalmente conhecidos. Estes fatores limitantes do crescimento podem ser classificados em três grupos: 1) exaustão de nutrientes; 2) acúmulo de produtos metabólitos tóxicos; ou 3) mudança no equilíbrio iônico, principalmente o pH. Normalmente, o crescimento é estimado quando o fator limitante é um nutriente essencial ao crescimento, único e conhecido. Por este motivo, estudos são realizados para estimar os fatores de crescimento e ajustar meios de cultura totalmente definidos para cada microrganismo, de maneira que apenas um fator seja o limitante do crescimento. Quando o substrato é um fator limitante, ou seja, classificado no grupo 1

(exaustão de nutrientes) o crescimento celular cessa quando o substrato limitante é completamente consumido ou atinge uma concentração abaixo do limite necessário ao crescimento. Desta forma, a concentração do substrato limitante e o crescimento celular são diretamente ligados pois, quando o substrato esgota – ou atinge concentração inferior ao limite – as células saem da fase exponencial e atingem fase estacionária de crescimento podendo, ou não, apresentar uma fase intermediária de desaceleração entre estas fases.

Já que um dos objetivos deste trabalho foi determinar as características das linhagens, ou seja, os parâmetros fisiológicos, foi utilizado meio de cultura conhecido e totalmente definido. Como já mencionado, o protocolo de cultivo para as linhagens de *Y. lipolytica* foi o mesmo desenvolvido por Oliveira (2014), no qual utilizou meio de cultivo e condições apropriadas para que a fonte de carbono fosse o fator limitante.

A fonte de carbono utilizada neste trabalho foi o glicerol, numa proporção, em relação aos demais nutrientes, de forma que as células de *Y. lipolytica* interrompessem o crescimento quando este nutriente se esgotasse ou atingisse o limite mínimo de concentração necessária ao crescimento. Conforme apresentado na Figura 19, para as 6 linhagens de *Y. lipolytica* estudadas, o glicerol realmente foi o fator limitante. É possível observar que as curvas de massa seca e concentração de glicerol apresentaram comportamento similar, porém espelhadas; à medida em que o glicerol era consumido, o crescimento celular aumentava, até o esgotamento da fonte de carbono. Com relação ao pH do meio, o comportamento da curva foi o mesmo obtido por Oliveira (2014), ou seja, o pH manteve-se praticamente constante durante todo o cultivo celular, uma vez que ureia foi utilizada – e não sulfato de amônio – e não houve formação de ácidos orgânicos durante o crescimento celular.

A análise estatística dos resultados apresentados na Tabela 18 demonstra que os parâmetros fisiológicos não apresentam diferença significativa para a maioria das linhagens. Partindo do primeiro parâmetro ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ), a linhagem *Y. lipolytica* IMUFRJ 50678 foi a que apresentou o maior valor absoluto de velocidade, entretanto, se comparada estatisticamente com as demais linhagens, esta não apresentou diferença (a 10% de significância) em relação às linhagens *Y. lipolytica* Po1g, *Y. lipolytica* W29 e *Y. lipolytica* CCT 5443. Com relação a  $Y_{X/S}^{exp}$ , a linhagem *Y. lipolytica* Po1g foi a que apresentou maior valor absoluto, igualando-se estatisticamente com as linhagens *Y. lipolytica* IMUFRJ 50678, *Y. lipolytica* W29 e *Y. lipolytica* CCT 5443. Para o parâmetro  $r_S^{m\acute{a}x}$ , apenas a linhagem *Y. lipolytica* Po1g se diferenciou significativamente da linhagem com maior valor absoluto (*Y. lipolytica* IMUFRJ 50682). Entretanto, esta mesma linhagem (*Y. lipolytica* Po1g) foi a que apresentou o maior valor de

$Y_{X/S}^{global}$ , sendo diferente estatisticamente de todas as demais linhagens. Fazendo um panorama geral, considerando todos os parâmetros, as linhagens *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 e *Y. lipolytica* CCT 7401 foram as que mais se diferenciaram das demais, sendo que as linhagens *Y. lipolytica* IMUFRJ 50678, *Y. lipolytica* Po1g, *Y. lipolytica* W29 e *Y. lipolytica* CCT 5443 são fisiologicamente muito similares.

Todas as linhagens de *Y. lipolytica* apresentaram, em média, fase exponencial com duração entre 4 e 5 h, nas condições empregadas neste trabalho, como é possível observar na Figura 34 (APÊNDICE). A fase que demonstrou maior diferença entre as linhagens foi a fase *lag*. Entretanto, foi observado que a fase *lag* propriamente dita ocorreu em, no máximo, 1 h de cultivo, seguida de uma fase de aceleração maior, em torno de 3 h de duração. Neste ponto, a linhagem *Y. lipolytica* CCT 7401 foi a que necessitou de um tempo maior de cultivo para que as células entrassem em fase exponencial de crescimento. Em média, esta linhagem apresentou fase *lag* de 1 a 2 h e fase de aceleração de, em média, 7 h para então começar a crescer exponencialmente. E, por estes motivos, a linhagem *Y. lipolytica* CCT 7401 apresentou o maior tempo de cultivo (15 h) e o menor  $\mu_{m\acute{a}x}$  ( $0,18 \text{ h}^{-1}$ ), o qual foi diferente significativamente das demais 5 linhagens desta espécie.

Santos et al. (2013), cultivaram a levedura *Y. lipolytica* NRRL YB-423 (*Y. lipolytica* CCT 7401) em frasco agitado (batelada) e meio de cultura definido composto por minerais, 12,4 g/L de fosfato de amônio dibásico como fonte de nitrogênio e 40 g/L iniciais de glicerol bruto. O cultivo foi realizado a 30 °C e 180 rpm por 72 h.. O valor de  $\mu_{m\acute{a}x}$  obtido para esta linhagem foi de  $0,18 \text{ h}^{-1}$ , o qual foi exatamente a mesma velocidade específica máxima encontrada neste trabalho de mestrado para a linhagem *Y. lipolytica* CCT 7401. Os autores também relataram que esta linhagem apresentou uma extensa fase *lag*, correspondendo à metade do tempo total de cultivo (em torno de 36 h). No gráfico cinético demonstrado pelos autores, não é possível visualizar a existência, ou não, de uma fase de aceleração, pois a amostragem entre as fases *lag* e *log* foi realizada com um intervalo de tempo de 12 h. Porém, foi possível observar a necessidade de um tempo maior de adaptação desta linhagem, antes que a fase de crescimento exponencial fosse atingida.

Glicerol é uma molécula pequena, não carregada e pode ser transportada através da membrana celular por difusão passiva, por um gradiente de concentração (TOMASZEWSKA-HETMAN; RYWIŃSKA, 2015). Entretanto, a entrada de glicerol na célula por diferença de concentração apenas pode ser comprometida em baixas concentrações deste substrato (da SILVA; MACK; CONTIERO, 2009). Foi também reportado que esta molécula pode entrar em

células microbianas por difusão facilitada, através de proteínas da membrana celular; ou por transporte ativo, com gasto de energia (WANG et al., 2001; FONTES et al., 2012; TOMASZEWSKA-HETMAN; RYWIŃSKA, 2015).

Em estudo realizado por Workman, Holt e Thykaer (2013), os autores relataram que a levedura *Y. lipolytica* possui preferência pela utilização de glicerol quando cultivada em uma mistura de glicerol e glicose. Os autores explicam que esta preferência é consequência do fato de, no genoma da levedura, haver apenas um gene que codifica o transporte de hexoses e, pelo menos 3 genes que codificam proteínas relacionadas com o transporte de glicerol. Para este estudo, cultivaram a linhagem *Yarrowia lipolytica* IBT 446 em meio de cultura totalmente definido e glicerol ou glicose como única fonte de carbono ou uma mistura dos dois substratos, para calcular parâmetros fisiológicos. Esta linhagem foi cultivada em um meio contendo minerais, elementos-traço e solução de vitaminas, a 30 °C e 600 rpm em biorreator de 1 L. Realizaram quatro bateladas com diferentes concentrações de fonte de carbono, sendo elas: 1) glicose 20 g/L; 2) glicerol 20 g/L; 3) glicerol 45 g/L; e 4) glicose e glicerol a 10 g/L cada. Os valores de velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) obtidos para cada experimento foram, respectivamente, 0,24, 0,30, 0,32 e 0,38 h<sup>-1</sup>. Os valores obtidos quando apenas glicerol foi utilizado como fonte de carbono (0,30 e 0,32 h<sup>-1</sup>) encontram-se na faixa de velocidades obtidas para as linhagens *Y. lipolytica* IMUFRJ 50678, *Y. lipolytica* Po1g, *Y. lipolytica* W29 e *Y. lipolytica* CCT 5443.

No trabalho realizado por Oliveira (2014), no qual o protocolo de cultivo deste trabalho de mestrado foi baseado, cultivou-se as linhagens *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 e *Y. lipolytica* W29 e obteve-se velocidade específica máxima de 0,46 e 0,36 h<sup>-1</sup> e velocidade específica máxima de consumo de substrato de 0,96 e 0,71 (g S).(g MS<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>), respectivamente. Como já mencionado, o protocolo de cultivo utilizado neste trabalho foi o mesmo desenvolvido por Oliveira (2014) e, portanto, era esperado que os parâmetros obtidos (pelo menos para as linhagens *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 e *Y. lipolytica* W29) fossem similares. No entanto, os valores de  $\mu_{\text{máx}}$  reportados pelo autor são superiores aos obtidos neste trabalho, para estas mesmas linhagens (0,26 e 0,29 h<sup>-1</sup>, respectivamente). Uma diferença existente entre o protocolo desenvolvido por Oliveira (2014) e o utilizado neste trabalho de mestrado é referente à temperatura de cultivo das linhagens. Oliveira (2014) realizou os cultivos à 28 °C, enquanto que neste trabalho, as linhagens foram incubadas à 30 °C. A diferença de temperatura, mesmo que em 2 °C, pode ter influenciado na velocidade específica máxima de crescimentos destas linhagens. Além disto, os detalhes sobre a maneira como as medidas de absorbância foram realizadas não são mencionados no trabalho desenvolvido por Oliveira (2014) e, como já

discutido, isto interfere nas medidas de absorvância. Portanto, a escolha de realizar as leituras destas linhagens sem diluição prévia das amostras, durante todo o cultivo, pode ter sido um outro fator que influenciou na obtenção da velocidade específica máxima de crescimento. Outro fato interessante observado nos resultados reportados por Oliveira (2014) é que, para ambas as linhagens estudadas, também foi observada fase *lag* de 1 h, porém não foi observada fase de aceleração, ou seja, as linhagens começaram a crescer exponencialmente a partir do instante 2 h. Para a linhagem *Y. lipolytica* W29 o parâmetro  $r_s^{m\acute{a}x}$  foi próximo ao deste trabalho (0,68) para a mesma linhagem. Quanto ao rendimento em biomassa na fase exponencial de crescimento, os valores obtidos por Oliveira (2014) – 0,48 e 0,51 (g MS).(g S)<sup>-1</sup> – estão dentro da faixa encontrada para as 6 linhagens avaliadas.

Em um estudo realizado por Bacciotti (2015), linhagens de *Y. lipolytica* foram cultivadas em meio totalmente definido (MDBU) e glicerol como única fonte de carbono a uma concentração de 20,5 g/L. As células foram cultivadas, separadamente, em frasco Erlenmeyer com deflectores, durante 20 h a 28 °C e 250 rpm. Após os cultivos, foram obtidos valores de  $\mu_{m\acute{a}x}$  de 0,36 e 0,34 h<sup>-1</sup> e  $Y_{X/S}^{exp}$  de 0,58 e 0,71 (g MS).(g S)<sup>-1</sup> para as linhagens *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 e *Y. lipolytica* W29, respectivamente. Estes valores foram superiores aos obtidos neste trabalho, porém os rendimentos em biomassa se encontram próximo aos obtidos para as linhagens *Y. lipolytica* IMUFRJ 50678 e *Y. lipolytica* Po1g (0,55 e 0,64).

Bacciotti (2015) também realizou cultivo destas mesmas linhagens (50682 e W29) em biorreator com volume de trabalho de 1 L, operando no modo batelada. O meio de cultura foi o mesmo utilizado em frascos (MDBU), porém com adição de 0,3 mL/L de anti-espumante e concentração inicial de glicerol de 5,1 g/L. Os cultivos foram realizados a 28 °C, 100 rpm, vazão de ar de 1 vvm e pH do meio igual a 5 (durante todo o processo). Os valores de  $\mu_{m\acute{a}x}$  obtidos foram de 0,34 e 0,37 h<sup>-1</sup> e  $Y_{X/S}^{exp}$  de 0,55 e 0,59 (g MS).(g S)<sup>-1</sup> para IMUFRJ 50682 e W29, respectivamente. Vários fatores podem ter causado estas diferenças nos parâmetros fisiológicos, uma vez que este experimento foi realizado em condições diferentes como, por exemplo, a realização dos cultivos em biorreator operando em modo contínuo, adição de ar ao sistema, pH do meio igual a 5, menor agitação, menor temperatura e presença de anti-espumante.

São escassos na literatura trabalhos que determinaram parâmetros fisiológicos da levedura *Yarrowia lipolytica* em meio de cultura totalmente definido, sendo que, os trabalhos acima apresentados foram os encontrados. A quase totalidade dos trabalhos utilizaram de um ou mais suplementos complexos para impulsionar o crescimento celular, sendo o extrato de

levedura o mais utilizado. A adição destes suplementos torna o meio de cultura classificado como complexo, ou seja, não é possível determinar com exatidão a composição total do meio. Como já mencionado anteriormente, para que os parâmetros fisiológicos de um determinado microrganismo sejam mensurados com maior precisão, é necessário conhecer o meio em que o microrganismo foi cultivado, portanto, a comparação de parâmetros fisiológicos determinados em meio complexo com os mensurados em meio totalmente definido pode ser realizada, porém com muita atenção. Os resultados obtidos por outros autores, acima citados e os que serão citados a seguir, estão apresentados resumidamente na Tabela 28 (APÊNDICE).

Papanikolaou et al. (2002), cultivaram a levedura *Y. lipolytica* LGAM S(7)1 para avaliar o potencial de produção de ácido cítrico por esta linhagem. A levedura foi cultivada em frasco Erlenmeyer a 28° C e 185 rpm. O meio de cultura era composto por minerais, elementos-traço, sulfato de amônio e extrato de levedura como fontes de N e 32 g/L iniciais de glicerol puro ou bruto, como fonte de C. Os parâmetros  $\mu_{\text{máx}}$  e  $Y_{X/S}^{\text{global}}$  obtidos foram, respectivamente, 0,2 h<sup>-1</sup> e 0,23 (g MS).(g S)<sup>-1</sup>, quando utilizado glicerol puro; e 0,2 h<sup>-1</sup> e 0,24 (g MS).(g S)<sup>-1</sup> quando glicerol bruto foi utilizado.

Papanikolaou et al. (2008), estudaram o comportamento da linhagem *Y. lipolytica* ACA-DC 50109 cultivada em diferentes concentrações iniciais de glicerol bruto, em frascos agitados a 28° C e utilizando extrato de levedura (0,5 g/L) como uma das fontes de nitrogênio. A levedura foi cultivada em cinco experimentos diferentes, com concentração inicial de glicerol variando entre 20,5 e 164,0 g/L e tempo total de cultivo entre 90 e 600 h. A partir destes experimentos, obtiveram valores de  $\mu_{\text{máx}}$  entre 0,16 e 0,21 h<sup>-1</sup> e observaram que a velocidade específica máxima de crescimento diminuiu à medida que a concentração inicial de substrato aumentou. Sobre este fato, os autores presumiram que altas concentrações de substrato, neste caso glicerol, podem ter inibido o crescimento desta linhagem.

Com o intuito de investigar o impacto do aumento da concentração inicial de glicerol sobre o comportamento bioquímico da levedura *Y. lipolytica*, André et al. (2009) cultivaram a linhagem *Y. lipolytica* ACA-YC 5033 em frasco agitado, com adição de 0,5 g/L de extrato de levedura ao meio de cultivo e glicerol bruto nas concentrações iniciais de 70, 90 e 120 g/L de glicerol bruto, a 28 °C e 180 rpm. Para estas diferentes concentrações de fonte de carbono, obtiveram valores de  $\mu_{\text{máx}}$  de 0,14, 0,12 e 0,06 h<sup>-1</sup>, respectivamente, comprovando também que altas concentrações de substrato podem inibir o crescimento celular.

Santos et al. (2013), realizaram estudos cinéticos com as leveduras *Y. lipolytica* NRRL Y-1095 e *Y. lipolytica* NRRL YB-423, as quais correspondem, respectivamente, às linhagens

*Y. lipolytica* CCT 5443 e *Y. lipolytica* CCT 7401 utilizadas neste trabalho de mestrado. Estas linhagens foram cultivadas em meio de cultura composto por minerais, sulfato de amônio e extrato de levedura como fontes de nitrogênio e 30 g/L iniciais de glicerol puro ou bruto como fonte de carbono. Os valores de  $\mu_{\text{máx}}$  obtidos para as linhagens *Y. lipolytica* NRRL Y-1095 e *Y. lipolytica* NRRL YB-423 foram 0,13 e 0,25 h<sup>-1</sup>, respectivamente, quando utilizado glicerol puro; e, quando utilizado glicerol bruto, os valores obtidos foram 0,15 e 0,14 h<sup>-1</sup> (sem diferença significativa), respectivamente. Quando glicerol puro foi utilizado como fonte de carbono, a levedura *Y. lipolytica* CCT 7401 apresentou maior  $\mu_{\text{máx}}$ , em comparação com a outra linhagem; este comportamento foi contrário ao encontrado neste trabalho de mestrado, no qual o parâmetro  $\mu_{\text{máx}}$  da linhagem *Y. lipolytica* CCT 7401 foi menor em relação à linhagem *Y. lipolytica* CCT 5443. Como mencionado anteriormente (ainda neste item), estes mesmos autores cultivaram a linhagem *Y. lipolytica* NRRL YB-423 (*Y. lipolytica* CCT 7401) em meio definido e glicerol bruto como fonte de carbono, e encontraram velocidade específica máxima de 0,18 h<sup>-1</sup>. Isto indica que a presença do extrato de levedura no meio de cultivo, pode ter impulsionado o crescimento desta linhagem, apresentando um aumento na velocidade específica máxima de crescimento.

Juszczuk et al. (2013) estudaram o comportamento de oito linhagens da levedura *Y. lipolytica* em glicerol puro, as quais foram isoladas de amostras de solo ou de queijo (*blue-veined cheese*) e depositadas na coleção de culturas pertencente ao Departamento de Biotecnologia e Microbiologia de Alimentos, da Universidade de Ciências do Ambiente e da Vida de Wrocław (Polônia), como S5, S6, S9, S10, S11, S12, S17 e S21. Estas linhagens foram cultivadas em biorreator, contendo 1 g/L de extrato de levedura e 0,75 g/L de bacto-peptona como suplementos, a 30 °C e 550 rpm. Neste estudo, obtiveram fatores globais de conversão de substrato em biomassa na faixa de 0,28 a 0,56 (g MS).(g S)<sup>-1</sup>.

Microrganismos se comportam de maneira diferente dependendo do ambiente à que foram expostos. A variação existentes entre os parâmetros fisiológicos obtidos neste trabalho e os parâmetros reportados por outros autores podem ser causados por variações no ambiente de cultivo, como por exemplo: temperatura de incubação, presença ou não de suplementos complexos (extrato de levedura, peptona, entre outros), velocidade de agitação, uso de anti-espumantes, utilização de glicerol puro ou bruto, fonte de nitrogênio, tempo de incubação, pH, entre outros. Além disso, variações podem ocorrer a partir de fatores operacionais como: a escolha da metodologia para quantificação da biomassa, dos produtos formados ou dos substratos consumidos; tipo de espectrofotômetro utilizado; e tempo de amostragem. Entretanto, apesar das variações encontradas entre os resultados publicados, estas informações

são importantes para fundamentar trabalhos futuros, pois trazem dados relativos ao comportamento de uma mesma espécie em diferentes condições ou de diferentes espécies em uma mesma condição de cultivo; além de fornecer importantes parâmetros quanto ao potencial desta levedura em aplicações industriais.

#### 5.4 Cinéticas de crescimento de linhagens de *Rhodospiridium toruloides*

Assim como para as linhagens de *Y. lipolytica*, uma busca por linhagens da levedura *R. toruloides* foi realizada, a fim de comparar características fisiológicas e de acúmulo lipídico de diferentes linhagens. Uma única linhagem de *R. toruloides* está disponível na Coleção de Culturas Tropical, pertencente à Fundação André Tosello, em Campinas, São Paulo, a linhagem *R. toruloides* CCT 0783. Esta é a mesma linhagem utilizada por Bonturi (2016), tese na qual o protocolo para acúmulo de lipídeos deste trabalho de mestrado foi baseado; desta maneira, a linhagem *R. toruloides* CCT 0783 foi obtida diretamente do laboratório no qual esta tese foi desenvolvida (Laboratório de Engenharia de Bioprocessos, Unicamp), juntamente com a linhagem evoluída *R. toruloides* Rt 10.

Inicialmente, foram realizadas cinéticas de crescimento com as linhagens de *R. toruloides* seguindo o mesmo protocolo desenvolvido para *Y. lipolytica*, ou seja, meio MDBU (2,5 g/L iniciais de glicerol), solução de tiamina e solução de elementos-traço A (conforme Figura 8 do item 4.7). Entretanto, o tempo das etapas preparatórias (pré-inóculo e inóculo) foi modificado de 12 para 24 h, haja visto que, durante um experimento teste, as linhagens de *R. toruloides* apresentaram baixo crescimento em 12 h de cultivo – como também relatado no item 5.1 Identificação molecular das espécies.

Neste cultivo, as linhagens *R. toruloides* CCT 0783 e *R. toruloides* Rt 10 apresentaram velocidade específica máxima de crescimento de 0,073 e 0,097 h<sup>-1</sup>, respectivamente. Estas velocidades foram calculadas também graficamente, porém com dados de Abs<sub>600</sub> em função do tempo, para uma rápida obtenção e análise dos valores. Se comparada com as linhagens da outra espécie estudada, a média de velocidade entre as duas linhagens de *R. toruloides* é 3,3 vezes menor que a média dos  $\mu_{m\acute{a}x}$  das linhagens de *Y. lipolytica*. Portanto, foi proposto um novo protocolo de cultivo para as linhagens *R. toruloides* CCT 0783 e *R. toruloides* Rt 10, em que mais nutrientes (vitaminas e/ou outros compostos como ácidos orgânicos) fossem adicionados ao meio de cultivo e que pudessem aumentar a velocidade de crescimento destas linhagens. Importante ressaltar que neste novo protocolo não poderiam ser adicionados componentes complexos, a fim de que o meio de cultivo se mantivesse totalmente conhecido e definido.

Para a montagem deste novo protocolo de cultivo, foi realizada uma busca na literatura por meios definidos para o cultivo de *R. toruloides*, independentemente do substrato utilizado como fonte de carbono. A Tabela 19 apresenta a composição de dois meios de cultura definidos utilizados para crescimento de linhagens de *Rhodospiridium toruloides*.

**Tabela 19 - Meios de cultura definidos para o crescimento de *Rhodospiridium toruloides***

<b>Meio X (Atkins et al., 1970)</b>		<b>Meio Y (Wiebe et al., 2012)</b>	
<b>Componente</b>	<b>(g/L)</b>	<b>Componente</b>	<b>(g/L)</b>
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	---
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	3,0	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2
Acetato de amônio	6,0	Acetato de amônio	---
Ácido cítrico	1,0	Ácido cítrico	5,26 mg
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,8	MgSO <sub>4</sub>	1,5
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	9,0 mg	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	---
Sulfato de amônio	---	Sulfato de amônio	quantidade necessária para diferentes C/N
<b>Elementos-traço</b>	<b>(g/L)</b>	<b>Elementos-traço</b>	<b>(g/L)</b>
Ácido bórico	0,0005	Ácido bórico	0,0001
Sulfato de cobre	0,00004	Sulfato de cobre	0,00026
Iodeto de potássio	0,0001	Iodeto de potássio	---
Cloreto férrico	0,0002	Cloreto férrico	---
Sulfato de manganês	0,0004	Sulfato de manganês	0,0001
Molibdato de amônio	0,0002	Sulfato de ferro	0,0014
Sulfato de zinco	0,0004	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5,26 mg
Molibdato de sódio	---	Molibdato de sódio	0,0001
Cloreto de cobalto	---	Cloreto de cobalto	0,0005
CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	---	CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,1
<b>Vitaminas</b>	<b>(g/L)</b>	<b>Vitaminas</b>	<b>(g/L)</b>
Biotina	0,01	Biotina	0,000125
Mio-inositol	0,2	Mio-inositol	0,125
Tiamina	0,2	Tiamina	0,005
Ácido aminobenzóico	0,05 - 0,1	Ácido aminobenzóico	---
Ácido pantotênico	0,05 - 0,1	Ácido pantotênico	0,0062
Ácido nicotínico	0,05 - 0,1	Ácido nicotínico	0,005
Piridoxol	0,05 - 0,1	Piridoxol	0,0062

Fonte: elaborada pela autora

Foi possível observar que estes meios de cultura encontrados na literatura apresentam diferenças com o meio proposto para cultivo de *Y. lipolytica* (Tabelas 10 e 11). Dentre estas diferenças está a presença de ácido cítrico e, pelo menos, cinco vitaminas. Com relação ao ácido cítrico, a solução de elementos-traço proposta por Meesters et al. (1996) e utilizada por Bonturi

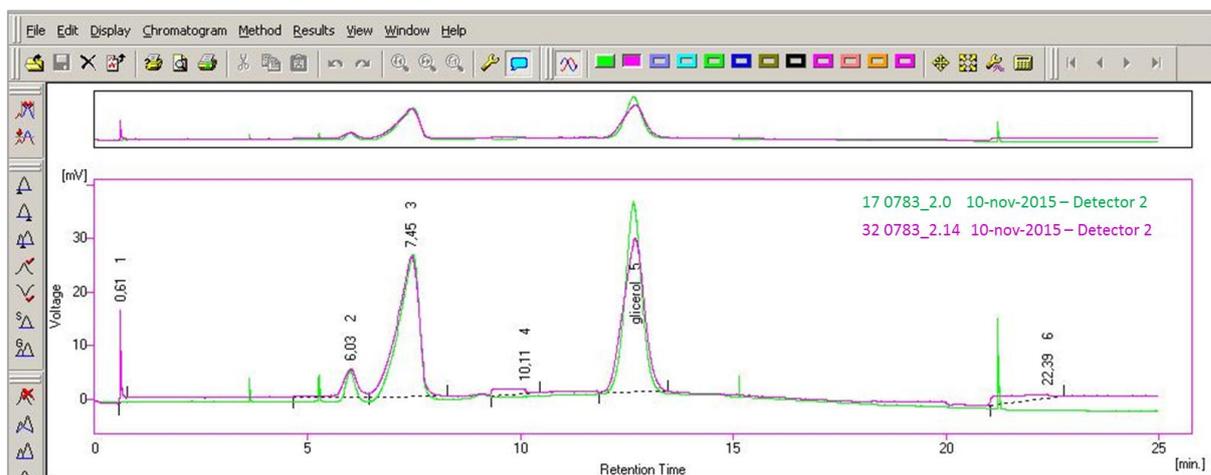
(2016) atende a esta necessidade, pois contém ácido cítrico em sua composição, bem como todos os outros componentes-traço necessários. Esta solução já seria utilizada mais adiante neste trabalho para os cultivos visando ao acúmulo de lipídeos e, por já tê-la no laboratório, foi decidido utilizá-la para suprir a falta de ácido cítrico. Quanto às vitaminas, o Laboratório de Engenharia Metabólica e de Bioprocessos (LEMeB), no qual este trabalho foi realizado, desenvolve várias pesquisas com a levedura *S. cerevisiae* utilizando a solução de vitaminas proposta por Verduyn et al. (1992), solução esta que apresenta em sua composição todas as vitaminas propostas na Tabela 19 e, por este motivo, foi escolhida para suprir a falta de vitaminas no meio de cultivo. Por fim, um novo protocolo foi desenvolvido baseado nas etapas e meios propostos para *Y. lipolytica*, o qual foi detalhado no item 4.7 (Cultivos para cinéticas de crescimento).

Depois de estabelecido um novo protocolo de cultivo, assim como feito para as linhagens de *Y. lipolytica*, as faixas de linearidade foram estabelecidas entre a medida de absorvância e de concentração celular por massa seca de células. Em seguida, os cultivos para obtenção das cinéticas de crescimento foram realizados. Dados de concentração celular (em termos da massa seca de células), de concentração de glicerol e de pH foram plotados em função do tempo. As amostras retiradas em cada instante foram analisadas em HPLC a partir da mesma metodologia proposta para as linhagens de *Y. lipolytica*. A Figura 21 apresenta os cromatogramas obtidos para a linhagem *R. toruloides* CCT 0783 nos tempos inicial e final de cultivo. Vale ressaltar ainda que foram obtidos cromatogramas para todas as replicatas de cada linhagem, a cada instante de cultivo. Esta linhagem foi escolhida apenas para ilustrar o comportamento apresentado pelas duas linhagens de *R. toruloides* analisadas.

A linha verde indica uma amostra do tempo zero de cultivo e a linha rosa indica uma amostra do tempo final (14 h) de cultivo da linhagem *R. toruloides* CCT 0783, para uma das replicatas biológicas. Como pode ser observado, para as duas amostras o equipamento detectou o pico de glicerol (12,6 min) e, a partir da curva de calibração previamente realizada, a concentração de glicerol nestas amostras foi mensurada, sendo 2,264 e 1,755 g/L, respectivamente. No tempo final (linha rosa) era esperado que a concentração da fonte de carbono fosse nula, já que pareceu haver uma tendência de estabilização do valor da concentração celular nos instantes finais. Entretanto, isto não foi o observado para ambas as linhagens de *R. toruloides*, sendo que, por exemplo, apenas 23% da fonte de carbono foi consumida no cultivo da linhagem *R. toruloides* CCT 0783. Com base nisto, o ideal teria sido realizar novos cultivos por períodos mais longos e com amostragens em intervalos de tempo

maiores, de forma a se poder avaliar mais adequadamente a cinética de crescimento de *R. toruloides*. No entanto, não houve tempo para a realização destes experimentos.

**Figura 21 - Cromatogramas obtidos em HPLC para tempos 0 h (linha verde) e 14 h (linha rosa) do cultivo de *R. toruloides* CCT 0783 em meio MDBU (2,5 g/L iniciais de glicerol), a 30 °C e 200 rpm**



Fonte: arquivo da autora

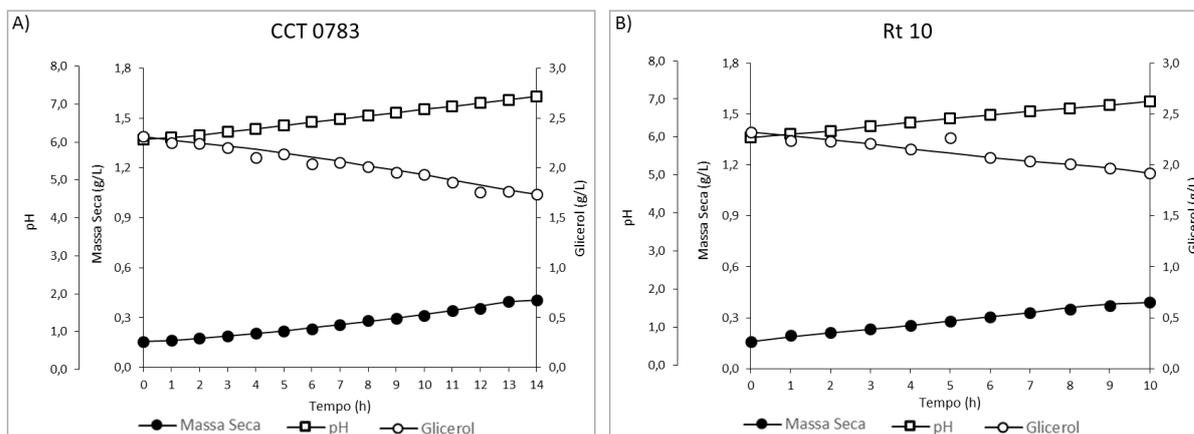
Acredita-se que o ácido cítrico presente na solução de elementos-traço utilizada para os cultivos cinéticos de *R. toruloides*, não apareça nos cromatogramas obtidos em HPLC devido à sua baixa concentração no meio. A solução de elementos-traço continha 0,5 g/L de ácido cítrico e apenas 1 % desta solução foi adicionada ao meio de cultivo, desta forma, a concentração final de ácido cítrico no meio era de 0,005 g/L.

Os cromatogramas demonstraram também que nenhum produto metabólico foi produzido no decorrer do cultivo das linhagens de *R. toruloides*, assim como ocorrera para as linhagens de *Y. lipolytica*. Os dois primeiros picos detectados nos cromatogramas também representam os componentes do meio MDBU. Portanto, curvas de crescimento, pH e consumo de substrato foram plotadas em função do tempo e estão apresentadas na Figura 22. Os outros dois gráficos obtidos para cada replicata podem ser visualizados na Figura 37 (APÊNDICE).

Assim como para as linhagens de *Y. lipolytica*, os parâmetros fisiológicos velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ), fator de conversão de substrato em biomassa na fase exponencial ( $Y_{X/S}^{exp}$ ) e velocidade específica máxima de consumo de substrato ( $r_S^{m\acute{a}x}$ ) e o parâmetro de processo fator global de conversão de substrato em biomassa ( $Y_{X/S}^{global}$ ), foram obtidos, em cada replicata, e avaliados estatisticamente, ao nível de significância de 10%, pelo

teste de Tukey, para observar se havia diferença significativa entre as linhagens. Os resultados estão apresentados na Tabela 20.

**Figura 22 - Cinéticas de crescimento de linhagens de *R. toruloides* realizadas em meio MDBU (2,5 g/L iniciais de glicerol), a 30 °C e 200 rpm. A) CCT 0783. B) Rt 10**



Fonte: elaborado pela autora

**Tabela 20 – Parâmetros fisiológicos velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ), fator de conversão de substrato em biomassa na fase exponencial ( $Y_{X/S}^{exp}$ ) e velocidade específica máxima de consumo de substrato ( $r_s^{m\acute{a}x}$ ) e parâmetro de processo, fator global de conversão de substrato em biomassa ( $Y_{X/S}^{global}$ ) para os cultivos realizados em MDBU e glicerol como fonte única de carbono (2,5 g/L iniciais), para as linhagens de *R. toruloides* estudadas. As médias e desvios-padrão foram obtidos a partir das triplicatas biológicas de cinética de crescimento realizadas com cada linhagem**

Linagem	$\mu_{m\acute{a}x}$ [h <sup>-1</sup> ]	$Y_{X/S}^{exp}$ [(g MS).(g S) <sup>-1</sup> ]	$r_s$ [(g S).(g MS <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )]	$Y_{X/S}^{global}$ [(g MS).(g S) <sup>-1</sup> ]
<i>R. toruloides</i> 0783	0,076 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,45 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,42 ± 0,03 <sup>a</sup>
<i>R. toruloides</i> Rt 10	0,092 ± 0,004 <sup>a</sup>	0,60 ± 0,19 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,45 ± 0,11 <sup>a</sup>

Médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não apresentam diferença significativa entre si ( $p > 0,1$ ) pelo teste de Tukey

Fonte: elaborada pela autora

Como é possível observar na Tabela 20, para todos os parâmetros analisados, não houve diferença significativa, ao nível de significância de 10%, entre as duas linhagens de *R.*

*toruloides* estudadas. É importante ressaltar que a linhagem Rt 10 é uma linhagem evoluída a partir da linhagem *R. toruloides* CCT 0783, por cultivos sucessivos em concentrações crescentes de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar (xilose 5,3 g/L, glicose 0,4 g/L, ácido acético 1,4 g/L, hidroximetilfurfural 0,2 g/L e furfural 1,7 g/L) em meio de cultivo contendo, em g/L: xilose (20,0), glicose (5,0), extrato de levedura (1,9),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1,5),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (5,0),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (3,6) e 2% de solução de elementos-traço (BONTURI; MIRANDA; BERGLUND, 2013). Provavelmente, esta evolução não modificou as características fisiológicas do microrganismo, apesar de que tanto o  $\mu_{\text{máx}}$  como o  $Y_{X/S}^{\text{exp}}$  e o  $Y_{X/S}^{\text{global}}$  apresentarem valores absolutos (sem levar em consideração a análise estatística) maiores na linhagem *R. toruloides* Rt 10, em relação à *R. toruloides* CCT 0783. A adaptação/evolução sofrida por esta linhagem objetivou um maior acúmulo lipídico, o qual é um metabolismo que pode ter sido afetado sem interferir nas características de crescimento da linhagem em apenas glicerol puro como fonte de carbono. Comportamento análogo também foi observado entre as linhagens *Y. lipolytica* W29 e *Y. lipolytica* Polg, as quais mesmo sendo cepa parental e modificada, respectivamente, não apresentaram diferença significativa em todos os parâmetros fisiológicos.

Quanto ao perfil de consumo de substrato, apesar de parecer que a concentração celular estivesse tendendo a uma estabilização, foi possível observar que, para as duas linhagens, o glicerol não foi completamente consumido. Ao realizar um cálculo médio entre as triplicatas biológicas de cada levedura, foi constatado que apenas 26 e 19% da fonte de carbono foi consumida nos cultivos para *R. toruloides* CCT 0783 e *R. toruloides* Rt 10, respectivamente. Somente com a realização de cultivos mais longos seria possível verificar se: 1) as células estão entrando em fase estacionária ou não nos instantes finais dos cultivos realizados e 2) caso este seja o caso, se isto ocorre devido ao acúmulo de algum produto tóxico ou à elevação do pH.

Um fato curioso e inesperado ocorreu com relação ao perfil de pH durante o cultivo. Normalmente, em cultivos microbianos, o pH do meio tende à acidificação, principalmente em microrganismos produtores de ácidos orgânicos. Este é o comportamento apresentado pela levedura *Y. lipolytica*. Oliveira (2014) cultivou linhagens de *Y. lipolytica*, com sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, com o pH do meio ajustado para 6,0 e, ao final do cultivo, observou que o pH extracelular atingiu um patamar de 2,0. Por este motivo, substituiu o sulfato de amônio por ureia como fonte de carbono, para que o pH do meio fosse mantido constante durante todo o cultivo.

Como mencionado no item 5.3 (Cinéticas de crescimento de linhagens de *Yarrowia lipolytica*), a mudança no equilíbrio iônico é um dos grupos de fatores limitantes do crescimento

celular (MONOD, 1949). O pH extracelular é o principal fator limitante classificado no grupo de mudança no equilíbrio iônico (grupo 3) e representa o mais importante fator influenciador do crescimento e fisiologia celular. O crescimento celular de todos os microrganismos é influenciado pelo pH extracelular; e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um exemplo disto, a qual é um microrganismo acidófilo, pois apresenta melhor crescimento em pH ácido do que em pH neutro ou alcalino. A manutenção do pH intracelular em *S. cerevisiae* é realizada, principalmente, pela bomba  $H^+$ -ATPase, a qual expulsa prótons para o meio externo à medida que ATP é hidrolisado. A expulsão de prótons para o meio externo faz com que o pH intracelular seja mantido neutro, proporcionando um ambiente favorável para uma efetiva absorção dos nutrientes presentes no meio. Por ser uma levedura acidófila, o crescimento de *S. cerevisiae* em pH alcalino representa uma situação de *stress* para esta levedura e que, mesmo que o meio extracelular esteja em condições de baixa alcalinidade (i. e., valores de pH não muito elevados), a levedura precisará sofrer uma série de adaptações fisiológicas para sobreviver e multiplicar (SERRANO et al., 2004).

Relatos sobre deficiência de crescimento em pH alcalino por linhagens de *R. toruloides* ainda não foram reportados na literatura. Porém, é muito provável que o pH extracelular foi o fator limitante do crescimento nestas linhagens – nas condições propostas neste trabalho. Bonturi (2016) também observou o aumento de pH em cultivos com as leveduras oleaginosas *R. toruloides* CCT 0783 e *L. starkeyi* CBS 1807 durante evolução destas linhagens em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar e em hidrolisado de extrato hemicelulósico de cavacos de bétula, respectivamente. Durante os cultivos sucessivos para evolução, observou o aumento do pH extracelular de 6,0 para 8,0. Após realizar um cultivo teste com adição de ácido acético ao meio, propôs a hipótese de que o aumento do pH foi causado pelo consumo do ácido acético durante os cultivos. Antes do cultivo, o pH do meio foi ajustado e o meio continha ácido acético, portanto, conforme este ácido foi consumido pelas leveduras, o pH do meio tendeu à alcalinidade.

Neste trabalho, ácido cítrico (AC) foi adicionado ao meio de cultura para impulsionar o crescimento celular portanto, um pensamento análogo poderia ser realizado para consumo do ácido cítrico relacionado com o aumento de pH do meio. Entretanto, como mencionado no início deste item, um primeiro cultivo foi realizado sem a adição de AC no meio e o perfil de pH observado foi o mesmo para os cultivos com ácido cítrico, ou seja, aumento constante de pH durante o cultivo celular. Outro fato curioso é que nos ensaios utilizando AC (Figura 22) o pH extracelular atingido no final do cultivo foi em torno de 7,3 para a linhagem *R. toruloides* CCT 0783 e 7,0 para *R. toruloides* Rt 10 (dados apresentados na Tabela 26 do APÊNDICE) e,

para os cultivos preliminares realizados sem adição de AC, atingiram pH em torno de 7,6 para ambas as linhagens. Estes resultados contrariam a hipótese levantada por Bonturi (2016), pois a presença ou não de ácido orgânico no meio de cultivo não modificou o perfil de aumento de pH extracelular durante todo o cultivo. Além disso, não havia uma concentração significativa de ácido cítrico que pudesse interferir tão fortemente no crescimento celular, pois a concentração final de ácido cítrico no meio era muito baixa, de 0,005 g/L. Por fim, é provável que o pH realmente tenha sido o fator limitante do crescimento celular das linhagens de *R. toruloides*, porém a causa do aumento de pH ainda não foi identificada e não foram encontrados relatos sobre isto na literatura.

Estudos realizados com a espécie *R. toruloides* em meio totalmente definido para obtenção de parâmetros fisiológicos são inexistentes na literatura. Para esta espécie, a adição de suplementos complexos ao meio de cultivo é muito mais frequente, se comparada com a levedura *Y. lipolytica*, haja visto que linhagens de *R. toruloides* apresentam velocidade específica máxima de crescimento muito baixa. Como também demonstrado neste trabalho, no qual as linhagens *R. toruloides* CCT 0783 e *R. toruloides* Rt 10 apresentaram  $\mu_{\text{máx}}$  em média 3,3 vezes menores que a média de velocidade das 6 linhagens de *Y. lipolytica*. A maioria dos trabalhos publicados sobre *R. toruloides* objetivaram a produção de óleo microbiano e/ou carotenóides, em meio complexo visando à produção industrial, e não estudos sobre suas características fisiológicas em meio definido. Portanto, mesmo em estudos realizados com a adição de componentes complexos no meio, normalmente apenas os parâmetros de processo relacionados à produção principalmente de lipídeos e carotenóides são calculados. Por fim, apenas duas publicações que reportam parâmetros fisiológicos da levedura *R. toruloides* foram encontradas na literatura e os resultados obtidos por estes autores estão detalhados a seguir e apresentados resumidamente na Tabela 28 (APÊNDICE).

Bommareddy et al. (2015) cultivaram a linhagem *R. toruloides* DSMZ 4444 em biorreator, utilizando extrato de levedura e sulfato de amônio (0,5 g/L cada) como fontes de nitrogênio e glicerol a 75 g/L como fonte de carbono. Após o cultivo, obtiveram velocidade específica máxima de crescimento de  $0,12 \text{ h}^{-1}$ , valor este superior aos encontrados neste trabalho. Entretanto, vale ressaltar que a presença de extrato de levedura no meio de cultura impulsiona um melhor crescimento desta espécie.

Kiran, Trzcinski e Webb (2013) estudaram a produção de lipídeos por *R. toruloides* Y4 cultivada em biorreator utilizando glicerol puro como fonte de carbono, a uma concentração inicial de 100 g/L. A fonte de nitrogênio utilizada foi um autolisado obtido por fermentação em estado sólido de farelo de colza, a uma concentração de 300 mg/L de nitrogênio. A linhagem

foi cultivada também na presença de minerais, com pH do meio ajustado para 6,0 e temperatura de cultivo de 30 °C. Os autores obtiveram velocidades específica máxima de crescimento de até 0,085 h<sup>-1</sup> quando em alta velocidade de agitação (1200 rpm).

Finalmente, cabe ressaltar que a maioria dos estudos relatados sobre a levedura *R. toruloides* foram realizados com o intuito de avaliar a produção de lipídeos e/ou carotenóides. As velocidades específica máxima de crescimento relatadas nos dois trabalhos acima mencionados, são em relação à produção de lipídeos por esta levedura. Observa-se que a adição de extrato de levedura pode aumentar o parâmetro  $\mu_{\text{máx}}$ , como no trabalho realizado por Bommareddy et al. (2015), o qual obteve  $\mu_{\text{máx}}$  1,5 vezes maior que a média entre as linhagens *R. toruloides* CCT 0783 e *R. toruloides* Rt 10, deste trabalho de mestrado (0,084 h<sup>-1</sup>). Por outro lado, a utilização do autolisado de farelo de colza (KIRAN; TRZCINSKI; WEBB, 2013) pode ter sido uma boa escolha devido a diminuição de custos, uma vez que resíduo foi utilizado como fonte de N, porém isto não favoreceu ao aumento da velocidade específica máxima de crescimento, sendo similar à média entre as linhagens deste trabalho de mestrado.

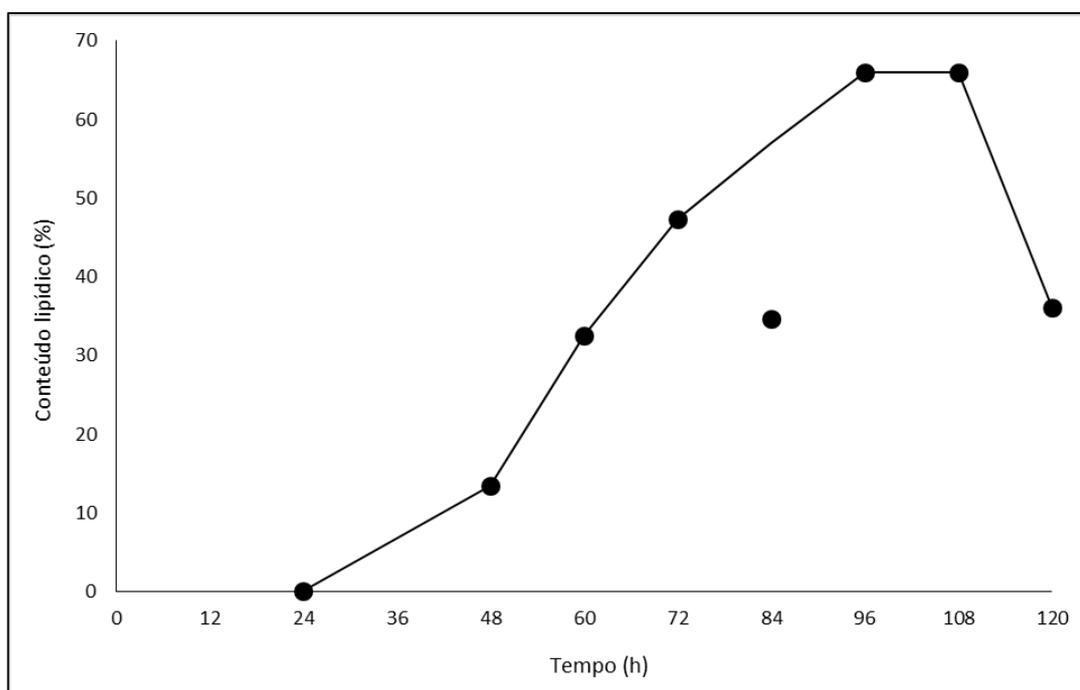
### 5.5 Teor de lipídeos em diferentes linhagens de *Yarrowia lipolytica*

O protocolo de cultivo para acúmulo de lipídeos foi o mesmo utilizado por Bonturi (2016). Este protocolo foi desenvolvido para cultivos da levedura *R. toruloides* em glicose, xilose e mistura de xilose e glicose. Como um dos objetivos deste trabalho foi determinar a capacidade de acúmulo de lipídeos em glicerol como única fonte de carbono e utilizando uma espécie diferente de levedura, foi necessário identificar qual o tempo de cultivo em que o acúmulo lipídico atingisse o porcentual máximo. Por se tratar de 6 diferentes linhagens de *Y. lipolytica*, não foi possível verificar o melhor tempo de cultivo em cada uma delas, por questão do tempo disponível para a realização dos experimentos. Portanto, uma das linhagens foi escolhida para a realização de uma cinética de acúmulo lipídico. A linhagem foi escolhida a partir dos valores de velocidade específica máxima de crescimento obtidos nos cultivos cinéticos, sendo a linhagem *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 escolhida por ter a velocidade próxima à média entre as 6 linhagens (Tabela 18).

Escolhida a linhagem, a mesma foi cultivada conforme descrito no item 4.10 (Cultivos para cinética de acúmulo de lipídeos) e retiradas amostras nos tempos 24, 48, 60, 72, 84, 96, 108 e 120 h para extração e determinação do porcentual de lipídeos acumulados. A Figura 23 apresenta a cinética de acúmulo de lipídeos para a linhagem *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 em glicerol como única fonte de carbono.

Assim como para as cinéticas de crescimento, os pontos representam os dados experimentais coletados e a linha representa a tendência esperada, de acordo com as medidas experimentais, construída pela técnica de “suavização à mão” em *Microsoft Office Excel*<sup>®</sup>. Foi possível observar que apenas um ponto, no tempo 84 h, divergiu do comportamento esperado. Atribuímos este fato à algum erro experimental (não houve replicatas biológicas ou analíticas) e, por isto, este ponto não foi considerado para ajuste da linha de tendência. A partir dos dados obtidos, foi possível determinar que o tempo de cultivo ideal para acúmulo de lipídeos nesta linhagem foi de 96 h, uma vez que o maior percentual lipídico foi atingido neste instante. Estipulado o tempo de cultivo, as 6 linhagens de *Y. lipolytica* foram cultivadas, cada uma em triplicata biológica, segundo descrito no item 4.9 (Cultivos para acúmulo de lipídeos) e a biomassa obtida foi submetida à extração pelo método de Folch et al. (1957). A Figura 24 apresenta os resultados de percentagem lipídica obtidos para todas as linhagens de *Y. lipolytica*, cultivadas em glicerol como única fonte de carbono.

**Figura 23 - Cinética de acúmulo de lipídeos para a linhagem *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682, cultivada em meio MCL, a 28 °C e 200 rpm**

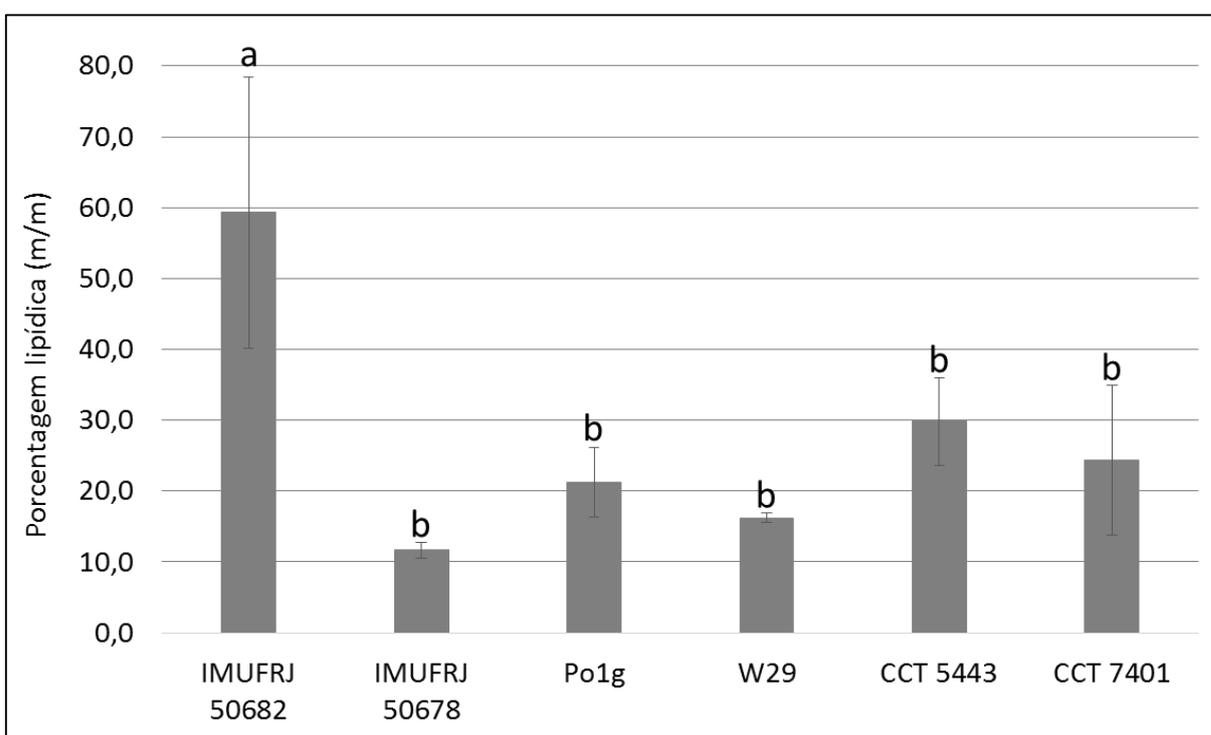


Fonte: elaborada pela autora

As porcentagens lipídicas obtidas para as 6 linhagens de *Y. lipolytica* foram submetidas ao teste de Tukey, ao nível de 10% de significância, para avaliar se ocorreu diferença significativa entre as linhagens. Como é possível observar na Figura 24, a linhagem *Y. lipolytica*

IMUFRJ 50682 foi a que apresentou maior teor lipídico, em uma relação massa/massa, sendo diferente significativamente das demais linhagens. Dentre as outras 5 linhagens de *Y. lipolytica*, não houve diferença significativa na porcentagem lipídica. O fato da linhagem *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 ter apresentado o maior teor de lipídeos pode ser devido ao fato de que o tempo de 96 h de cultivo foi determinado a partir desta linhagem. Como tem sido enfatizado, cada linhagem se comporta de maneira diferente, portanto, o ideal seria que uma cinética de acúmulo de lipídeos tivesse sido realizada para cada linhagem, a fim de se determinar qual o instante de máximo acúmulo lipídico para cada uma. Por outro lado, o cultivo de todas as linhagens até um mesmo instante facilita a comparação entre os parâmetros de processo, uma vez que o tempo de cultivo é muito importante industrialmente e influencia diretamente no cálculo da produtividade, por exemplo.

**Figura 24 - Porcentagem lipídica (m/m) para linhagens de *Y. lipolytica* cultivadas em meio MCL (70 g/L iniciais de glicerol), a 28 °C e 200 rpm, por 96 h**



Colunas seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa entre si ( $p > 0,1$ ) pelo teste de Tukey. Colunas representam a média entre as replicatas e as barras correspondem ao desvio-padrão relativo às médias.

Fonte: elaborada pela autora

A metodologia de extração de lipídeos aplicada fornece teores lipídicos por uma relação massa/massa, ou seja, através da medida da massa de óleo presente em determinada massa seca de células. As análises da massa seca de células ao final do cultivo demonstraram a

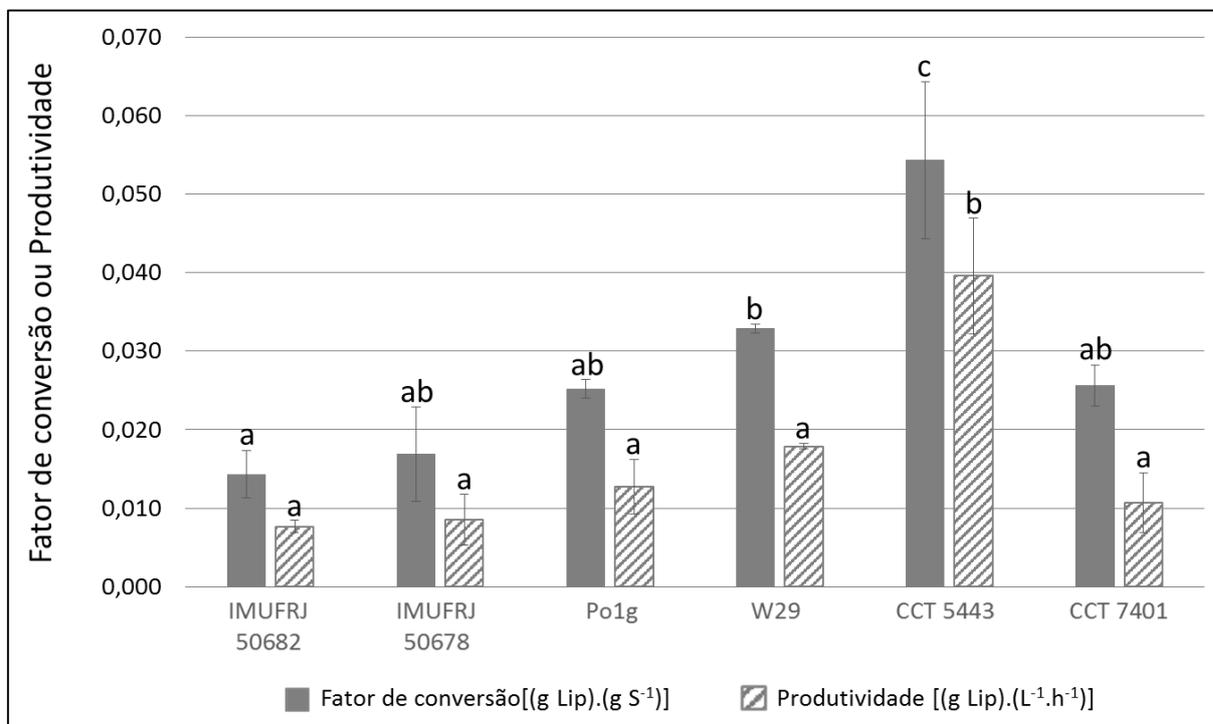
existência de uma grande faixa de variação de biomassa entre as linhagens, variando de 1,34 a 12,83 (g MS. L<sup>-1</sup>). A linhagem *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682, que apresentou maior teor lipídico (59,29%), foi a produtora de menos biomassa (1,34 g/L). Como já mencionado no item 3.5 (Produção industrial de óleo microbiano (*single cell oil*)), os principais fatores que agregam custo à produção de óleo microbiano são o custo do substrato e o custo dos fermentadores, os quais estão diretamente relacionados a dois importantes parâmetros de processo: o fator de conversão de substrato em lipídeos ( $Y_{Lip/S}$ ) e a produtividade em lipídeos ( $P_{Lip}$ ), respectivamente.

Estes dois parâmetros foram calculados pelas Equações 16 e 17, respectivamente, nas quais a concentração inicial de lipídeos foi considerada zero. Esta suposição foi realizada pois acredita-se que no tempo inicial de cultivo não havia concentração significativa de lipídeos, já que as células vieram de pré-inóculo e inóculo em condições de excesso de fonte de carbono e de nitrogênio (meio YPD), o que caracteriza uma condição favorável ao crescimento celular e não ao acúmulo de produtos (KOUTINAS et al., 2014). A Figura 25 apresenta o gráfico com os resultados obtidos para os parâmetros de processo, fator global de conversão de substrato em lipídeos e produtividade em lipídeos, para as 6 linhagens de *Y. lipolytica* estudadas.

Como se pode observar na Figura 25, a análise estatística demonstrou que a linhagem *Y. lipolytica* CCT 5443 apresentou os maiores valores de ( $Y_{Lip/S}$ ) e ( $P_{Lip}$ ), sendo eles, respectivamente, 0,054 (g Lip).(g S<sup>-1</sup>) e 0,040 (g Lip).(L<sup>-1</sup>. h<sup>-1</sup>). Para uma melhor visualização dos resultados, a Tabela 21 apresenta os parâmetros numericamente. Todos os valores obtidos nos cultivos para acúmulo de lipídeos em *Y. lipolytica* estão apresentados na Tabela 27 (APÊNDICE).

Uma observação importante deve ser realizada com relação aos altos erros (desvios-padrão) apresentados pela maioria das linhagens. Dentre as 6 linhagens de *Y. lipolytica* estudadas, apenas a linhagem *Y. lipolytica* W29 não apresenta formação de espuma durante os cultivos. A formação de espuma ocorreu nas primeiras 24 h de cultivo, ou seja, na fase de crescimento, no qual a fonte de nitrogênio ainda não foi completamente consumida. Nos estudos realizados por Oliveira (2014), o autor relatou que, em condições de excesso de carbono e nitrogênio no meio, ocorreu a formação de espuma nos cultivos. Por este motivo, optou por realizar cultivos cinéticos em baixa concentração de fonte de carbono.

**Figura 25 – Parâmetros de processo fator global de conversão de substrato em lipídeos ( $Y_{Lip/S}$ ) e produtividade em lipídeos ( $P_{Lip}$ ) para linhagens de *Y. lipolytica* cultivadas em meio MCL (70 g/L iniciais de glicerol), a 28 °C e 200 rpm, por 96 h**



Colunas de um mesmo parâmetro seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa entre si ( $p > 0,1$ ) pelo teste de Tukey

Colunas representam a média entre as replicatas e as barras correspondem ao desvio-padrão relativo às médias

Fonte: elaborada pela autora

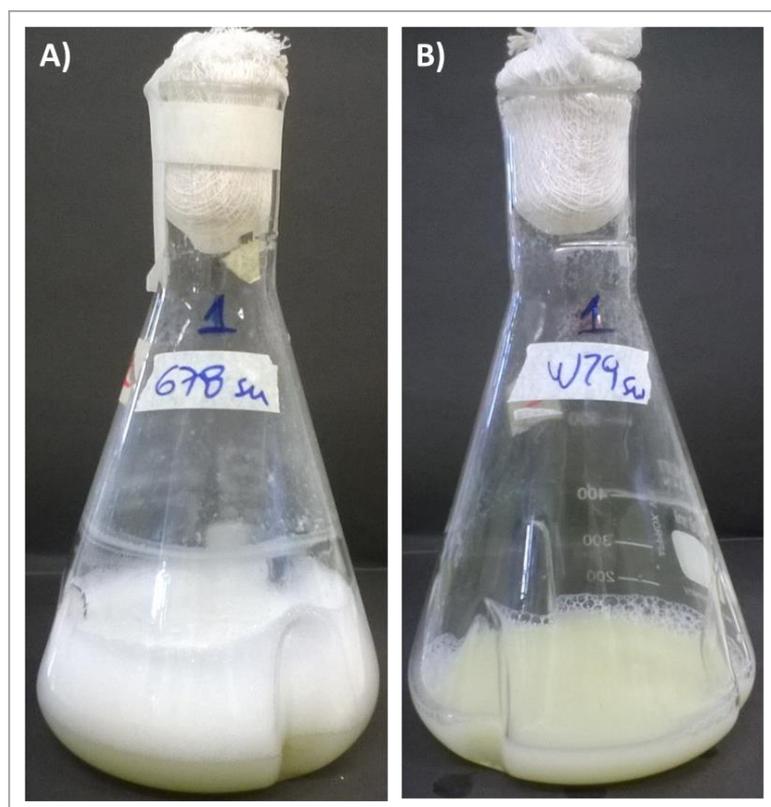
**Tabela 21 - Biomassa, concentração de lipídeos, porcentagem de lipídeos, fator global de conversão de substrato em lipídeos ( $Y_{Lip/S}$ ) e produtividade em lipídeos ( $P_{Lip}$ ) para linhagens de *Y. lipolytica* cultivadas em meio MCL (70 g/L iniciais de glicerol), a 28 °C e 200 rpm, por 96 h**

Linhagem	X (g MS/L)	Lipídeos (g Lip/L)	% Lipídeos (m/m)	$Y_{Lip/S}$ (gLip/g S)	$P_{lip}$ (g Lip/L.h)
IMUFRJ 50682	1,34 ± 0,47	0,74 ± 0,08	59,29 ± 19,09	0,014 ± 0,003	0,0077 ± 0,0008
IMUFRJ 50678	7,26 ± 3,11	0,82 ± 0,31	11,63 ± 1,14	0,017 ± 0,006	0,0085 ± 0,0032
Po1g	6,16 ± 2,68	1,22 ± 0,34	21,28 ± 4,89	0,025 ± 0,012	0,013 ± 0,004
W29	10,60 ± 0,23	1,72 ± 0,03	16,21 ± 0,65	0,033 ± 0,001	0,018 ± 0,000
CCT 5443	12,83 ± 1,63	3,80 ± 1,03	29,81 ± 6,15	0,054 ± 0,010	0,040 ± 0,007
CCT 7401	5,69 ± 5,20	1,03 ± 0,37	24,38 ± 10,54	0,026 ± 0,003	0,011 ± 0,004

Fonte: elaborada pela autora

Na Figura 26 são apresentadas imagens típicas de cultivos realizados em meio MCL (70 g/L iniciais de glicerol, 28 °C e 200 rpm) com a linhagem *Y. lipolytica* IMUFRJ 50678 (26-A) e a linhagem *Y. lipolytica* W29 (26-B). Nestas imagens é possível observar a formação de espuma no cultivo da linhagem *Y. lipolytica* IMUFRJ 50678, a qual representa o mesmo comportamento apresentado pelas linhagens *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682, *Y. lipolytica* Po1g, *Y. lipolytica* CCT 5443 e *Y. lipolytica* CCT 7401. Uma alçada foi retirada da espuma de uma das linhagens e observada em microscópio. A lâmina com esta espuma apresentou grande quantidade de células, indicando que as células de *Y. lipolytica* migram para a espuma o que, por consequência dificultou a reprodutibilidade dos cultivos, em cada replicata, uma vez que as células perdem contato com o meio de cultura e esta espuma diminui a transferência de oxigênio. Por este motivo, alguns autores relatam a utilização de anti-espumante na formulação dos meios de cultura utilizados.

**Figura 26 - Cultivo para acúmulo de lipídeos em meio MCL (70 g/L iniciais de glicerol), a 28 °C e 200 rpm, após 96 h de incubação. A) *Y. lipolytica* IMUFRJ 50678. B) *Y. lipolytica* W29**



Fonte: arquivo da autora

A utilização de anti-espumante nos cultivos microbianos pode resolver o problema da excessiva formação de espuma, no entanto, os anti-espumantes podem afetar o crescimento de

diversos microrganismos (ROSANO; CECCARELLI, 2014). Cabe lembrar ainda, que a espécie *Y. lipolytica* é capaz de utilizar, com muita eficiência, óleos, gorduras e outros compostos hidrofóbicos como substrato (KURTZMAN, 2011) e, sabendo que alguns anti-espumantes são um tipo de emulsão formada por água e polidimetilsiloxano (óleo de silicone), esta espécie pode ser capaz de utilizar esta emulsão como substrato para biossíntese de lipídeos. Como já mencionado, o protocolo aplicado para acúmulo de lipídeos foi o mesmo desenvolvido por Bonturi (2016) para cultivos de *Rhodospiridium toruloides*, espécie que não apresenta formação de espuma durante os cultivos e não necessita da utilização de anti-espumantes (resultados mencionados mais adiante no item 5.6). Por fim, com base nestas informações e objetivando manter uniformidade nos cultivos das duas espécies (*Y. lipolytica* e *R. toruloides*), decidimos não adicionar anti-espumante ao meio MCL para que não fosse um interferente no crescimento e que os resultados obtidos pudessem ser comparados entre si.

André et al. (2009) cultivaram a linhagem *Y. lipolytica* LFMB 20 em frasco agitado, com adição de 0,5 g/L de extrato de levedura ao meio de cultivo e glicerol bruto na concentração inicial de 30 g/L, ou seja, um cultivo com limitação de nitrogênio, a 28 °C e 180 rpm. Os autores também utilizaram solução de clorofórmio:metanol (2:1) para extração dos lipídeos presentes da biomassa obtida. Para esta linhagem, o cultivo durou 90 h e apresentou os seguintes parâmetros: biomassa de 8,2 g MS.L<sup>-1</sup>; concentração de lipídeos de 0,61 g Lip. L<sup>-1</sup> (representando 7,4%); e fator de conversão de substrato em lipídeos de 0,024 g Lip. g S<sup>-1</sup>. Os resultados obtidos por André et al. (2009) foram próximas aos obtidos neste trabalho de mestrado, para a linhagem que apresentou baixas concentrações, tanto de biomassa quanto de lipídeos, ou seja a linhagem *Y. lipolytica* IMUFRJ 50678. Os autores realizaram cultivo para acúmulo lipídico da linhagem *Y. lipolytica* LFMB 20 em condições muito similares às utilizadas para as 6 linhagens aqui estudadas; no entanto, o baixo acúmulo de lipídeos alcançado por esta linhagem, se comparado às 6 linhagens, pode ser devido à diferença de concentração inicial de fonte de carbono (30 g/L).

Makri, Fakas e Aggelis (2010) cultivaram a linhagem *Y. lipolytica* ACA-DC 50109 em biorreator com volume de trabalho de 2,5 L, a 28 °C, oxigênio dissolvido a 30%, utilizando glicerol puro em duas concentrações (27,8 e 104,9 g/L) como fonte de carbono e extrato de levedura (0,5 g/L) e sulfato de amônio (0,5 g/L) como fontes de nitrogênio. Anti-espumante (Antifoam A, 1,85 mL) foi adicionado no início de cada batelada. Para o cultivo com 27,8 g/L de glicerol, os autores obtiveram, na fase de acúmulo de lipídeos, os seguintes resultados: 4,68 g/L de biomassa, 22,30% de lipídeos e 0,08 g Lip/g S como fator de conversão de glicerol em lipídeos. Para o cultivo a 104,9 g/L de glicerol, obtiveram maior concentração de biomassa

(78,29 g/L), porém menor teor de lipídeos (20,41%) e fator de conversão de glicerol em lipídeos (0,05 g Lip/g S). Estes resultados demonstraram que, para um mesmo microrganismo, o aumento da concentração inicial de fonte de carbono pode contribuir para o aumento do fator de conversão de substrato em biomassa, ou seja, mais carbono será consumido na fase de crescimento celular e o microrganismo poderá atingir maior concentração final de biomassa. No entanto, isto não garante que mais lipídeos serão acumulados, como é o caso deste estudo, no qual houve aumento da concentração de biomassa, porém diminuição da porcentagem lipídica e fator de conversão de substrato em lipídeos. Portanto, é necessário encontrar uma concentração inicial de fontes de C e N, na qual o acúmulo lipídico será o maior possível.

Poli et al. (2014) avaliaram o efeito de diferentes fontes de nitrogênio, velocidade de agitação e razão C/N no acúmulo de lipídeos pela linhagem *Y. lipolytica* QU21, cultivada em frasco agitado. Os autores concluíram que a utilização de sulfato de amônio, 150 rpm e razão C/N de 184, a 28 °C por 4 dias, foram os parâmetros que geraram efeito mais positivo na produção de lipídeos por esta linhagem. A partir das condições de cultivo determinadas, os autores avaliaram a produção de óleo microbiano em glicerol puro (100 g/L iniciais) ou bruto (83 g/L iniciais), por esta linhagem. Utilizando glicerol puro, a levedura atingiu concentrações de 4,92 g/L de biomassa, 1,48 g/L de lipídeos (representando 30,1%) e fator de conversão de substrato em lipídeos de 0,07 g Lip/g S. Ao utilizar glicerol bruto observaram um aumento estatisticamente significativo da biomassa celular para 6,7 g/L e diminuição da concentração de lipídeos para 1,27 g/L, porém sem diferença significativa. A porcentagem máxima obtida para glicerol bruto foi de 18,9% e fator de conversão de de substrato em lipídeos de 0,06 g Lip/g S. A utilização de glicerol bruto proporcionou um significativo aumento na concentração final de biomassa, porém a concentração de lipídeos e o fator de conversão de substrato em lipídeos não acompanharam esse aumento. Segundo Juszczuk et al. (2013), este aumento na produção de biomassa em glicerol bruto pode ser devido às impurezas presentes neste substrato; impurezas como peptídeos e proteínas podem ser fontes adicionais de nitrogênio e que, de acordo com Poli et al. (2014), diminuiu a razão C/N e por este motivo ocorre o aumento na produção de biomassa, sem aumento no acúmulo lipídico.

Tchakouteu et al. (2015) cultivaram as linhagens *Y. lipolytica* ACA YC 5029 e *Y. lipolytica* ACA YC 5033 em frasco agitado contendo 30 g/L de glicerol bruto como fonte de carbono e peptona e extrato de levedura como fontes de nitrogênio (e de outros nutrientes), atingindo razão C/N de aproximadamente 100. Os cultivos foram realizados a 28 °C e 180 rpm. Para a linhagem *Y. lipolytica* ACA YC 5029, com 22 e 95 h de cultivo obtiveram os seguintes resultados para biomassa (g MS/L), concentração de lipídeos (g Lip/L) e teor de lipídeos (%)

m/m), respectivamente: 3,1, 0,28 e 9,0; e 5,5, 0,21 e 3,8%. Para a linhagem *Y. lipolytica* ACA YC 5033, com 26 e 190 h de cultivo obtiveram os seguintes resultados para biomassa (g MS/L), concentração de lipídeos (g Lip/L) e teor de lipídeos (% m/m), respectivamente: 4,1, 0,86 e 20,9; e 6,1, 0,27 e 4,4%. É evidente que, para as duas linhagens, o aumento do tempo de cultivo acarretou aumento na concentração de biomassa, porém diminuição no acúmulo lipídico (concentração e porcentagem de lipídeos). Os autores demonstraram que, após obter a maior concentração de lipídeos (em torno de 20 h), se o cultivo não fosse interrompido, os lipídeos começavam a ser degradados e ácido cítrico (*Y. lipolytica* ACA YC 5033) e uma mistura de ácido cítrico e manitol (*Y. lipolytica* ACA YC 5029) eram excretados para o meio, conforme o aumento da fase estacionária. Os resultados obtidos por outros autores, acima citados, estão apresentados resumidamente na Tabela 28 (APÊNDICE).

Como observado nos resultados obtidos para este trabalho, apesar da linhagem *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 ter apresentado a maior porcentagem de lipídeos (59,29%), os dois importantes parâmetros de processo (fator de conversão de substrato em lipídeos e produtividade em lipídeos) foram os menores, dentre todas as linhagens. Isto deve-se ao fato de que a biomassa de células, e conseqüentemente a massa de lipídeos, atingidas por esta linhagem, foram muito baixas, influenciando matematicamente nos cálculos dos parâmetros de processo. Esta linhagem apresentou grande potencial em converter sua massa seca em óleo microbiano, pois 59,29% da massa de células estava na forma de lipídeos, porém em relação à quantidade mássica (g Lip/L), a linhagem *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 fica em desvantagem frente aos parâmetros obtidos para as outras linhagens. Tomando como exemplo a linhagem *Y. lipolytica* CCT 5443, esta apresentou porcentagem de lipídeos 2 vezes menor em comparação com a linhagem *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682; por outro lado, a linhagem *Y. lipolytica* CCT 5443 apresentou a maior concentração de células e, mesmo com baixa porcentagem, a maior concentração absoluta de lipídeos, fator de conversão de substrato em lipídeos e produtividade em lipídeos.

Sabe-se que o cultivo para acúmulo de lipídeos abrange duas etapas: crescimento celular e, com a exaustão da fonte de nitrogênio, a fase de acúmulo (também chamada de lipogênese) (MAKRI; FAKAS; AGGELIS, 2010; KOUTINAS et al., 2014). A priori, poderiam ser realizados novos estudos a fim de estender a fase de crescimento, para o aumento da concentração de biomassa, e então o acúmulo de lipídeos seria maior. Isto resolveria o problema de baixa biomassa apresentada pela linhagem *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682, admitindo que esta manteria a proporção de 59% de lipídeos presentes na biomassa. Contudo, como demonstrado por Makri, Fakas e Aggelis (2010) e Poli et al. (2014), as linhagens por eles estudadas

apresentaram um aumento na concentração de biomassa, porém menores valores de fator de conversão de substrato em lipídeos e produtividade em lipídeos. Desta maneira, é necessário desenvolver condições ideais de cultivo que aumentem a capacidade de acúmulo lipídico visando ao aumento dos dois parâmetros de processo mais importantes para que as linhagens sejam utilizadas para produção em grande escala de óleo microbiano, ou seja, o fator de conversão de substrato em lipídeos e a produtividade em lipídeos.

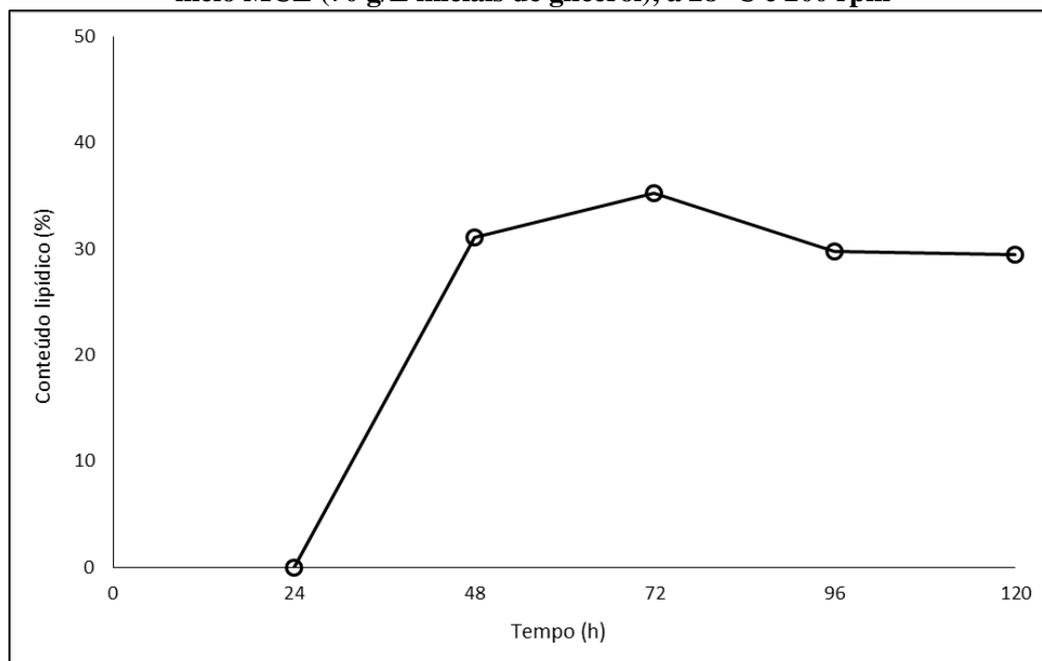
Os resultados obtidos neste trabalho serviram para verificar qual linhagem apresentou os mais favoráveis parâmetros para produção industrial de lipídeos, em uma mesma condição de cultivo, ou seja, a linhagem *Y. lipolytica* CCT 5443, pois apresentou os maiores valores de  $Y_{Lip/S}$  e  $P_{lip}$ . Porém, para avaliar a capacidade de acúmulo máxima para cada linhagem, seria necessária a realização de estudos isolados, partindo da cinética de acúmulo lipídico para cada linhagem, seguido da variação de razão C/N, fontes de carbono, concentração de substratos, tempo de cultivo, entre outros.

### **5.6 Teor de lipídeos em diferentes linhagens de *Rhodospiridium toruloides***

Assim como para as linhagens de *Y. lipolytica*, uma das linhagens de *R. toruloides* foi escolhida para a realização de uma cinética de acúmulo lipídico. A linhagem foi escolhida aleatoriamente, uma vez que em todos os parâmetros fisiológicos, as duas linhagens estudadas não apresentaram diferença significativa. Portanto, a linhagem *R. toruloides* Rt 10 foi escolhida e cultivada de acordo com a metodologia apresentada no item 4.10 (Cultivos para cinética de acúmulo de lipídeos) e retiradas amostras nos tempos 24, 48, 72, 96 e 120 h para extração e determinação do porcentual de lipídeos acumulados. A Figura 27 apresenta a cinética de acúmulo de lipídeos para a linhagem *R. toruloides* Rt 10 em glicerol como única fonte de carbono.

Os pontos representam os dados experimentais coletados e a linha representa a tendência esperada, a qual foi de acordo com as medidas experimentais, sem a necessidade da aplicação da técnica de “suavização à mão”. A partir dos dados obtidos, foi possível determinar que o tempo de cultivo ideal para acúmulo de lipídeos nesta linhagem foi de 72 h, uma vez que o maior porcentual lipídico foi atingido neste tempo. Estipulado o tempo de cultivo, as 2 linhagens de *R. toruloides* foram cultivadas, em triplicata biológica, segundo descrito no item 4.9 (Cultivos para acúmulo de lipídeos) e a biomassa obtida foi submetida à extração pelo método de Folch et al. (1957).

**Figura 27 - Cinética de acúmulo de lipídeos para a linhagem *R. toruloides* Rt 10, cultivada em meio MCL (70 g/L iniciais de glicerol), a 28 °C e 200 rpm**

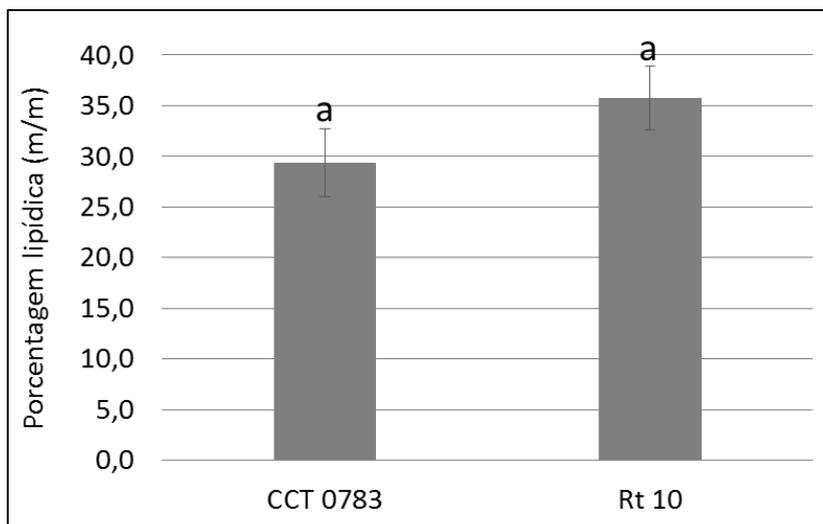


Fonte: elaborada pela autora

A porcentagem lipídica, o fator de conversão de substrato em lipídeos ( $Y_{Lip/S}$ ) e a produtividade em lipídeos ( $P_{Lip}$ ) obtidos para as 2 linhagens foram submetidas ao teste de Tukey, ao nível de 10% de significância, para avaliar se existe diferença significativa entre elas. A Figura 28 apresenta os resultados de porcentagem lipídica e a Figura 29 os resultados para o fator de conversão de substrato em lipídeos e a produtividade em lipídeos, todos obtidos para as duas linhagens de *R. toruloides*, cultivadas em glicerol como única fonte de carbono.

Como é possível observar na Figura 28, a linhagem *R. toruloides* Rt 10 apresentou maior valor absoluto para teor lipídico (35,75%) em relação à linhagem *R. toruloides* CCT 0783 (29,37%), no entanto, de acordo com o teste estatístico, estes percentuais de lipídeos não são diferentes significativamente. Por outro lado, a análise estatística apresentada na Figura 29 demonstrou que a linhagem *R. toruloides* Rt 10 apresentou maiores valores de  $Y_{Lip/S}$  e  $P_{Lip}$  – 0,11 (g Lip).(g S<sup>-1</sup>) e 0,10 (g Lip).(L<sup>-1</sup>. h<sup>-1</sup>), respectivamente – sendo estes valores estatisticamente diferentes dos valores obtidos para a linhagem *R. toruloides* CCT 0783. Para uma melhor visualização numérica dos resultados, na Tabela 22 são apresentados os parâmetros numericamente. Todos os valores obtidos nos cultivos para acúmulo de lipídeos em *R. toruloides* estão apresentados na Tabela 27 (APÊNDICE).

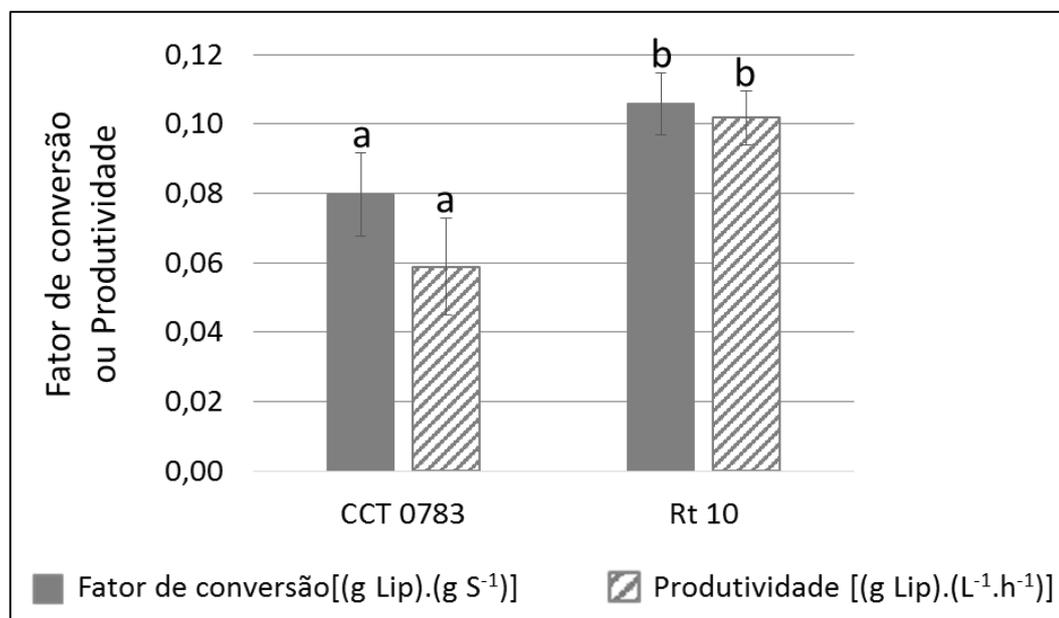
**Figura 28 - Porcentagem lipídica (m/m) para linhagens de *R. toruloides* cultivadas em meio MCL (70 g/L iniciais de glicerol), a 28 °C e 200 rpm, durante 72 h**



Colunas seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa entre si ( $p > 0,1$ ) pelo teste de Tukey  
Colunas representam a média entre as replicatas e as barras correspondem ao desvio-padrão relativo às médias

Fonte: elaborada pela autora

**Figura 29 – Parâmetros de processo fator global de conversão de substrato em lipídeos ( $Y_{Lip/S}$ ) e produtividade em lipídeos ( $P_{Lip}$ ) para linhagens de *R. toruloides* cultivadas em meio MCL MCL (70 g/L iniciais de glicerol), a 28 °C e 200 rpm, durante 72 h**



Colunas de um mesmo parâmetro seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa entre si ( $p > 0,1$ ) pelo teste de Tukey

Colunas representam a média entre as replicatas e as barras correspondem ao desvio-padrão relativo às médias

Fonte: elaborada pelo autor

**Tabela 22 - Biomassa, concentração de lipídeos, porcentagem de lipídeos, fator global de conversão de substrato em lipídeos ( $Y_{Lip/S}$ ) e produtividade em lipídeos ( $P_{Lip}$ ) para linhagens de *R. toruloides* cultivadas em meio MCL (70 g/L iniciais de glicerol), a 28 °C e 200 rpm, por 72 h**

Linhagem	X (g MS/L)	Lipídeos (g Lip/L)	% Lipídeos (m/m)	$Y_{Lip/S}$ (gLip/g S)	$P_{Lip}$ (g Lip/L.h)
CCT 0783	14,29 ± 2,06	4,24 ± 1,02	29,37 ± 3,36	0,080 ± 0,012	0,059 ± 0,014
Rt10	20,52 ± 0,90	7,33 ± 0,56	35,75 ± 3,14	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,01

Fonte: elaborada pela autora

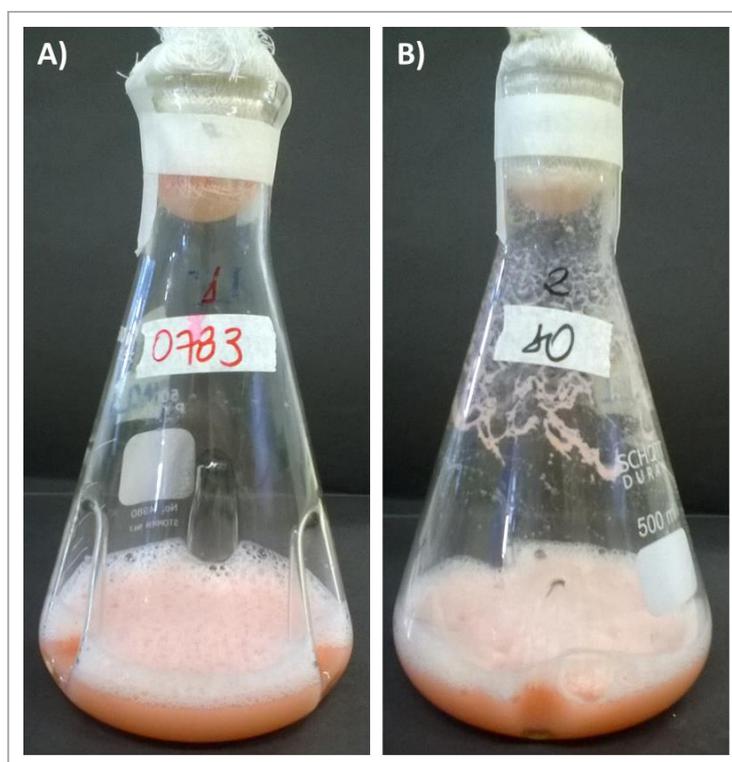
Pode-se observar que os erros experimentais (desvios-padrão) para esta espécie são menores em relação aos apresentados pelas linhagens de *Y. lipolytica* que formaram espuma. Ambas as linhagens de *R. toruloides* não apresentaram formação de espuma durante os cultivos. A diferença “visual” entre os frascos das 8 linhagens estudadas está na notável formação de carotenóides pelas linhagens de *R. toruloides* CCT 0783 e *R. toruloides* Rt 10, característica comum a esta espécie (LEE et al., 2014; DIAS et al., 2015).

A Figura 30 apresenta imagens de cultivos realizados em meio MCL (70 g/L iniciais de glicerol, 28 °C e 200 rpm) com a linhagem *R. toruloides* CCT 0783 (30-A) e a linhagem *R. toruloides* Rt 10 (30-B), após 72 h de cultivo. Nestas imagens é possível observar a produção de carotenóides durante o cultivo pela mudança de cor inicial amarelada do meio de cultivo – como para os cultivos de *Y. lipolytica* apresentados na Figura 26 – para coloração rosa.

Kiran, Trzcinski e Webb (2013) estudaram a produção de lipídeos por *R. toruloides* Y4 cultivada em biorreator operando em modo batelada. Para os cultivos utilizaram glicerol puro como fonte de carbono, em concentrações iniciais de 100, 200 e 300 g/L, e sulfato de amônio e extrato de levedura como fonte de nitrogênio. A linhagem foi cultivada também na presença de minerais, com pH do meio ajustado para 6,0 e temperatura de cultivo de 30 °C e agitação de 200 rpm, por 120 h. Para os cultivos em 100 g/L de glicerol obtiveram os seguintes resultados: 35,3 g/L de biomassa; 16,2 g/L de lipídeos (representando 46%); e fator de conversão de substrato em lipídeos de 0,26 g Lip/g S. Para os cultivos em 200 g/L de glicerol obtiveram: 16,2 g/L de biomassa; 8,6 g/L de lipídeos (representando 53,1%); e fator de conversão de substrato em lipídeos de 0,23 g Lip/g S. E por fim, para os cultivos em 300 g/L de glicerol obtiveram: 4,0 g/L de biomassa; 2,0 g/L de lipídeos (representando 50,6%); e fator de conversão de substrato em lipídeos de 0,16 g Lip/g S. Além disso, os autores cultivaram esta mesma linhagem, nas mesmas condições de cultivo, porém substituindo glicerol puro por glicerol bruto, também a 100 g/L iniciais, a fim de verificar o comportamento da levedura. Com glicerol bruto obtiveram: 19,3 g/L de biomassa; 8,9 g/L de lipídeos (representando 43,0%); e

fator de conversão de substrato em lipídeos de 0,08 g Lip/g S. Os resultados demonstraram que à medida em que a concentração de glicerol puro aumentou, houve a diminuição do acúmulo lipídico pela levedura – representado pelos parâmetros concentração e teor de lipídeos e fator de conversão de substrato em lipídeos – sendo este o mesmo comportamento apresentado para linhagens de *Y. lipolytica*. No entanto, em relação à produção de biomassa, a levedura *R. toruloides* apresentou comportamento inverso ao encontrado por Makri, Fakas e Aggelis (2010) para *Y. lipolytica*, ou seja, em *R. toruloides* o aumento da concentração de biomassa acarretou a diminuição da concentração final de biomassa. Outra diferença que pode ser observada entre estas duas espécies, refere-se ao uso de glicerol bruto como fonte de carbono. Juszczuk et al. (2013) observaram que em glicerol bruto a levedura *Y. lipolytica* foi capaz de produzir mais biomassa. Por outro lado, Kiran, Trzcinski e Webb (2013) demonstram que, para a levedura *R. toruloides*, a concentração final de biomassa diminuiu quando glicerol bruto foi utilizado como fonte de carbono, ao invés de glicerol puro; neste sentido os autores atribuíram este fato à presença de compostos inibitórios no glicerol bruto como, por exemplo, metanol.

**Figura 30 - Cultivo para acúmulo de lipídeos em meio MCL (70 g/L iniciais de glicerol), a 28 °C e 200 rpm, após 72 h de incubação. A) *R. toruloides* CCT 0783. B) *R. toruloides* Rt 10**



Fonte: arquivo do autor

Bommareddy et al. (2015) cultivaram a linhagem *R. toruloides* DSMZ 4444 em biorreator, utilizando extrato de levedura e sulfato de amônio (0,5 g/L cada) como fontes de nitrogênio e glicerol a 75 g/L como fonte de carbono, conferindo ao cultivo condição de limitação de nitrogênio. Após o cultivo, obtiveram fator de conversão de glicerol em lipídeos de 0,27 g Lip/g. S, sendo este valor maior que o encontrado para as duas linhagens deste trabalho, e produtividade em lipídeos de 0,06 g Lip/L.h, valor semelhante ao encontrado para a linhagem *R. toruloides* CCT 0783 (0,059 g Lip/L.h), porém menor que da linhagem *R. toruloides* Rt 10 (0,10 g Lip/L.h).

Tchakouteu et al. (2015) cultivaram as linhagens *R. toruloides* DSM 4444 e NRRL Y-27012 em frasco agitado contendo 30 g/L de glicerol bruto (fonte de carbono) e peptona e extrato de levedura (fontes de nitrogênio), atingindo razão C/N de aproximadamente 100. Os cultivos em batelada foram realizados a 28 °C e 180 rpm. Para a linhagem *R. toruloides* DSM 4444, com 168 h de cultivo obtiveram os seguintes resultados: 8,9 g/L de biomassa e 2,22 g/L de lipídeos (representando 24,9%). Para a linhagem NRRL Y-27012, após 92 h de cultivo obtiveram 11 g/L de biomassa e 2,83 g/L de lipídeos (representando 25,7%). Para as duas linhagens os parâmetros avaliados foram inferiores ao encontrados para as linhagens *R. toruloides* CCT 0783 e *R. toruloides* Rt 10 neste trabalho. Como já mencionado, valores inferiores de acúmulo lipídico podem ser devido à utilização de glicerol bruto como fonte de carbono, o qual reduz a capacidade de acúmulo de lipídeos, em comparação com glicerol puro. Neste mesmo trabalho, Tchakouteu et al. (2015) avaliaram o efeito do aumento da concentração inicial de glicerol bruto. Nestes experimentos, confirmaram o comportamento já citado, de que o fator de conversão de substrato em lipídeos decresce à medida que a concentração inicial de glicerol aumenta. No entanto, os resultados com relação à concentração final de biomassa e lipídeos, foram contrários aos encontrados por Kiran, Trzcinski e Webb (2013), ou seja, à medida em que a concentração inicial de fonte de carbono aumentou, houve também aumento significativo da biomassa final. Porém, vale ressaltar que os resultados obtidos por Tchakouteu et al. (2015) foram com glicerol bruto e por Kiran, Trzcinski e Webb (2013) com glicerol puro.

Bonturi et al. (2015) cultivaram a linhagem *R. toruloides* CCT 0783 com a mesma composição do meio de cultura utilizado neste trabalho de mestrado, porém com uma mistura de glicose (5 g/L) e xilose (65 g/L) como fontes de carbono. A linhagem foi cultivada em biorreator de 3 L (com volume de trabalho de 2,5 L), a 500 rpm e aeração de 1 vvm. Após 95 h de cultivo, foi realizada a extração dos lipídeos com solução de clorofórmio:metanol (2:1) e obteve teor lipídico de 42%, o qual é superior ao teor obtido neste trabalho de mestrado para as duas linhagens (29,37% para *R. toruloides* CCT 0783 e 35,75% para *R. toruloides* Rt 10). Como

já citado, a levedura *R. toruloides* é estritamente aeróbica e, portanto, o maior teor lipídico pode ter sido resultado do cultivo em biorreator, com maior agitação e aeração constante do meio. Os resultados obtidos por outros autores, acima citados e os que serão citados a seguir, estão apresentados resumidamente na Tabela 28 (APÊNDICE).

Por fim, os resultados obtidos neste trabalho de mestrado, demonstraram que a linhagem *R. toruloides* Rt 10 apresenta maior capacidade de acúmulo lipídico em glicerol como única fonte de carbono, se comparada à linhagem *R. toruloides* CCT 0783. Em vista dos resultados obtidos para os parâmetros de processo fator de conversão de substrato em lipídeos e produtividade em lipídeos, a linhagem *R. toruloides* Rt 10 mostra-se um microrganismo mais adequado para ser utilizado como conversor de glicerol em lipídeos, em relação à outra linhagem. No entanto, para que este microrganismo seja considerado, de forma global, um organismo com grande potencial para ser empregado na produção industrial de lipídeos, são necessários estudos em grande escala, levando-se em consideração todos os custos envolvidos neste processo.

Porém, é importante lembrar que, o tempo final de cultivo (72 h) foi estipulado a partir da cinética de acúmulo lipídico para a linhagem *R. toruloides* Rt 10, na qual esta linhagem apresentou sua capacidade máxima de acúmulo. Portanto, para avaliar a capacidade de acúmulo máxima também da linhagem *R. toruloides* CCT 0783, seria necessária a realização de uma cinética de acúmulo lipídico, a fim de verificar qual o tempo de cultivo ideal para que esta linhagem alcance sua capacidade máxima de produção de lipídeos, utilizando glicerol puro como única fonte de carbono.

### **5.7 Potencial de *Yarrowia lipolytica* e *Rhodospiridium toruloides* para emprego em processos industriais visando à produção de óleo microbiano**

Após realizadas análises a partir das cinéticas de crescimento e cultivos para acúmulo de lipídeos em separado para as duas espécies (*Y. lipolytica* e *R. toruloides*), comparando diferenças apenas entre as linhagens, os parâmetros fisiológicos e de processo das 6 linhagens de *Y. lipolytica* e 2 linhagens de *R. toruloides* foram submetidos à análise estatística entre si, com nível de significância de 10%, a fim de verificar se havia diferenças significativas em cada parâmetro para as diferentes linhagens e espécies. Os dados comparativos estão apresentados na Tabela 23.

**Tabela 23 – Parâmetros fisiológicos velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ), fator de conversão de substrato em biomassa na fase exponencial ( $Y_{X/S}^{\text{exp}}$ ) e velocidade específica máxima de consumo de substrato ( $r_S^{\text{máx}}$ ) e de processo, fator global de conversão de substrato em biomassa ( $Y_{X/S}^{\text{global}}$ ) obtidos para as linhagens de *Y. lipolytica* e *R. toruloides* cultivadas em meio MDBU (2,5 g/L iniciais de glicerol), a 30 °C e 200 rpm; e porcentagem de lipídeos (m/m) e parâmetros de processo, fator global de conversão de substrato em lipídeos ( $Y_{Lip/S}$ ) e produtividade em lipídeos ( $P_{Lip}$ ) obtidos para as linhagens de *Y. lipolytica* e *R. toruloides* cultivadas em meio MCL (70 g/L iniciais de glicerol, C/N = 100), a 28 °C e 200 rpm**

<b>Linhagem</b>	<b><math>\mu_{\text{máx}}</math> [h<sup>-1</sup>]</b>	<b><math>Y_{X/S}^{\text{exp}}</math> [(g MS).(g S)<sup>-1</sup>]</b>	<b><math>r_S^{\text{máx}}</math> [(g S).(g MS<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>)]</b>	<b><math>Y_{X/S}^{\text{global}}</math> [(g MS).(g S)<sup>-1</sup>]</b>	<b>% Lipídeos (m/m)</b>	<b><math>Y_{Lip/S}</math> [(g Lip).(g S)<sup>-1</sup>]</b>	<b><math>P_{Lip}</math> [(g Lip).(L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>)]</b>
<i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682	0,26 ± 0,020 <sup>a</sup>	0,37 ± 0,020 <sup>ac</sup>	0,70 ± 0,052 <sup>a</sup>	0,32 ± 0,023 <sup>a</sup>	59,29 ± 19,09 <sup>a</sup>	0,014 ± 0,0030 <sup>a</sup>	0,0077 ± 0,00080 <sup>a</sup>
<i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50678	0,32 ± 0,0067 <sup>b</sup>	0,55 ± 0,042 <sup>ab</sup>	0,57 ± 0,052 <sup>ab</sup>	0,44 ± 0,035 <sup>b</sup>	11,63 ± 1,14 <sup>b</sup>	0,017 ± 0,0060 <sup>ab</sup>	0,0085 ± 0,0032 <sup>a</sup>
<i>Y. lipolytica</i> Po1g	0,31 ± 0,0063 <sup>b</sup>	0,64 ± 0,028 <sup>b</sup>	0,49 ± 0,013 <sup>b</sup>	0,59 ± 0,011 <sup>c</sup>	21,28 ± 4,89 <sup>bc</sup>	0,025 ± 0,012 <sup>ab</sup>	0,013 ± 0,0035 <sup>a</sup>
<i>Y. lipolytica</i> W29	0,29 ± 0,0052 <sup>ab</sup>	0,43 ± 0,072 <sup>abc</sup>	0,68 ± 0,12 <sup>ab</sup>	0,45 ± 0,036 <sup>b</sup>	16,21 ± 0,65 <sup>bc</sup>	0,033 ± 0,00056 <sup>b</sup>	0,018 ± 0,00033 <sup>a</sup>
<i>Y. lipolytica</i> CCT 5443	0,31 ± 0,025 <sup>b</sup>	0,49 ± 0,046 <sup>abc</sup>	0,65 ± 0,12 <sup>ab</sup>	0,36 ± 0,035 <sup>ab</sup>	29,81 ± 6,15 <sup>bc</sup>	0,054 ± 0,010 <sup>c</sup>	0,040 ± 0,0074 <sup>b</sup>
<i>Y. lipolytica</i> CCT 7401	0,18 ± 0,025 <sup>c</sup>	0,33 ± 0,052 <sup>c</sup>	0,57 ± 0,092 <sup>ab</sup>	0,34 ± 0,0078 <sup>ab</sup>	24,38 ± 10,54 <sup>bc</sup>	0,026 ± 0,0026 <sup>ab</sup>	0,011 ± 0,0038 <sup>a</sup>
<i>R. toruloides</i> CCT 0783	0,076 ± 0,0015 <sup>d</sup>	0,45 ± 0,062 <sup>abc</sup>	0,17 ± 0,024 <sup>c</sup>	0,42 ± 0,025 <sup>ab</sup>	29,37 ± 3,36 <sup>bc</sup>	0,080 ± 0,012 <sup>d</sup>	0,059 ± 0,014 <sup>c</sup>
<i>R. toruloides</i> Rt 10	0,092 ± 0,0036 <sup>d</sup>	0,60 ± 0,19 <sup>b</sup>	0,17 ± 0,064 <sup>c</sup>	0,45 ± 0,11 <sup>b</sup>	35,75 ± 3,14 <sup>c</sup>	0,11 ± 0,0090 <sup>e</sup>	0,10 ± 0,0078 <sup>d</sup>

Médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não apresentam diferença significativa entre si ( $p > 0,1$ ) pelo teste de Tukey

Fonte: elaborada pelo autor

Como pode ser observado na Tabela 23, dentre os parâmetros fisiológicos ( $Y_{X/S}^{exp}$  e  $r_S^{máx}$ ) e o parâmetro de processo  $Y_{X/S}^{global}$  todas as linhagens apresentaram valores muito próximos, inclusive entre as duas espécies. Lembrando que, estes dados foram coletados em meio totalmente definido a 2,5 g/L de glicerol como única fonte de carbono e energia. Apenas no parâmetro  $\mu_{máx}$  foi observada uma diferença significativa entre linhagens e entre espécies. As linhagens de *Y. lipolytica* apresentaram velocidades específicas máximas de crescimento muito próximas uma das outras, com exceção da linhagem *Y. lipolytica* CCT 7401, a qual apresentou a menor velocidade. Entre as linhagens *R. toruloides* CCT 0783 e *R. toruloides* Rt 10, não houve diferença significativa, porém ambas as linhagens foram nitidamente diferentes de todas as linhagens de *Y. lipolytica*. Fazendo um panorama geral dos parâmetros fisiológicos ( $\mu_{máx}$ ,  $Y_{X/S}^{exp}$  e  $r_S^{máx}$ ) e de processo ( $Y_{X/S}^{global}$ ) nestas condições, as linhagens *Y. lipolytica* IMUFRJ 50678, *Y. lipolytica* Po1g, *Y. lipolytica* W29 e *Y. lipolytica* CCT 5443 apresentaram resultados similares.

Apesar das linhagens de *R. toruloides* apresentarem velocidade específica máxima de crescimento 3,3 vezes menor que a média das velocidades de *Y. lipolytica*, quando comparadas quanto aos parâmetros de processo mais importantes para produção industrial de óleo microbiano ( $Y_{Lip/S}$  e  $P_{Lip}$ ), as linhagens de *R. toruloides* apresentaram os melhores resultados dentre todas as linhagens estudadas. Ainda que a linhagem *Y. lipolytica* tenha demonstrado alta capacidade de acumular lipídeos, pois 59,29% de sua biomassa era composta por lipídeos, sua baixa concentração em biomassa desfavorece sua utilização para produção industrial, uma vez que apresentou os piores resultados de fator de conversão de glicerol em lipídeos e produtividade em lipídeos.

Como já mencionado, a linhagem *R. toruloides* Rt 10 é uma cepa adaptada da linhagem selvagem *R. toruloides* CCT 0783. A adaptação foi realizada por cultivos sucessivos em concentrações crescentes de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, contendo xilose (5,3 g/L), glicose (0,4 g/L), ácido acético (1,4 g/L), hidroximetilfurfural (0,2 g/L) e furfural (1,7 g/L) (BONTURI; MIRANDA; BERGLUND, 2013). As características fisiológicas da linhagem adaptada não foram diferentes significativamente da linhagem parental, no entanto, quando trata-se da avaliação da linhagem *R. toruloides* Rt 10 quanto à produção de lipídeos, esta apresentou características mais promissoras em comparação com a linhagem parental. Estes resultados também sugerem que este processo de adaptação ao qual a linhagem *R. toruloides* CCT 0783 foi submetida, não modificou as características básicas/fisiológicas desta linhagem, porém modificou características quanto à capacidade de acúmulo lipídico.

No estudo realizado por Bonturi (2016), uma alíquota da biomassa obtida para as linhagens *R. toruloides* CCT 0783 e *R. toruloides* Rt 10, após cultivadas em meio de cultura contendo uma mistura de xilose e glicose (6:1), foi avaliada quanto à quantificação de genes relacionados à tolerância a hidrolisados e ao acúmulo de lipídeos. Para isto, avaliou genes que expressam enzimas chave para a tolerância a hidrolisados: 6-fosfogluconato desidrogenase (GND1), D-ribulose 5-fosfato 3-epimerase (RPE1), transquetolase (TKL1) e aldeído desidrogenase (ALD4); e genes que expressam enzimas chave para o acúmulo de lipídeos: fosfofrutoquinase (PFK), ATP citrato liase (ACL1) e ácido graxo sintetase subunidades  $\alpha$  (FAS2) e  $\beta$  (FAS1). Os resultados demonstraram que a linhagem adaptada *R. toruloides* Rt 10, em geral, apresentou maior expressão de todos estes genes citados, em comparação com a linhagem parental. Logo, a capacidade de acúmulo da linhagem adaptada provavelmente é maior devido à maior expressão dos genes relacionados ao acúmulo de lipídeos e também ao aumento no fornecimento de NADPH (acelerado pelas enzimas GND1 e ALD4) e gliceraldeído 3-fosfato (pela enzima TKL1) – um precursor do glicerol 3-fosfato – os quais são essenciais para a biossíntese de TAG.

Uma comparação similar pode ainda ser realizada para as linhagens parental e modificada, *Y. lipolytica* W29 e *Y. lipolytica* Po1g, respectivamente. Porém, para estas linhagens, os resultados deste trabalho de mestrado sugerem que, tanto as características fisiológicas, quanto a capacidade de acúmulo de lipídeos, não foram alteradas a partir das modificações genéticas realizadas na linhagem *Y. lipolytica* W29.

Cálculos estequiométricos demonstraram que o fator de conversão máximo teórico de lipídeos produzidos por microrganismos oleaginosos é de 0,32 g Lip/g S para glicose, 0,34 g Lip/g S para xilose e 0,30 g Lip/g S para glicerol (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2011; HUANG et al., 2013). No entanto, em condições ideais de cultivo, o fator de conversão de glicose em lipídeos, por exemplo, raramente pode ser maior que 0,22 g Lip/g S, sendo que outros autores consideram ser 0,20 g Lip/g S ou menos. Com relação ao glicerol, em geral é considerado que microrganismos oleaginosos, independente da espécie, são capazes de converter em torno de 10% de glicerol em lipídeos, ou seja, um fator de conversão de substrato em lipídeos de 0,10 g Lip/g S (FAKAS et al., 2009; PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2011).

Com base nas informações apresentadas no item 3.5, este trabalho de mestrado envolveu o estudo de fatores que envolvem o processo de obtenção de óleo microbiano, visando à produção de biodiesel. A utilização de glicerol como fonte de carbono e energia representa o uso de um substrato de baixo custo e ainda o aproveitamento de um subproduto da própria

produção do biodiesel. O estudo comparativo realizado entre 6 linhagens da levedura *Y. lipolytica* e 2 linhagens de *R. toruloides* serviu como um *screening* para reconhecer qual(is) linhagem(ns) possui potencial para produção de óleo microbiano. Além disso, dentre as linhagens estudadas, foi comparada a capacidade de acúmulo lipídico entre uma linhagem selvagem (*R. toruloides* CCT 0783) e uma linhagem adaptada (*R. toruloides* Rt 10). Por fim,  $Y_{Lip/S}$  que é um parâmetro de processo (relacionado ao custo da matéria-prima) – juntamente com outro importante parâmetro, a produtividade em lipídeos – foram avaliados como indicadores do potencial de emprego destas linhagens para produção industrial de lipídeos, utilizando glicerol puro como fonte de carbono e energia. É evidente que as linhagens de *R. toruloides* seriam a melhor escolha, com maior ênfase para a linhagem *R. toruloides* Rt 10, haja visto que esta linhagem apresentou fator de conversão de glicerol em lipídeos em torno do valor estimado para microrganismos oleaginosos (0,11 g Lip/g S) e ainda o maior valor de produtividade em lipídeos, dentre todas as linhagens estudadas, 0,10 (g Lip).(L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>).

Por fim, ao analisar os resultados obtidos para todas as linhagens estudadas, observou-se que cada microrganismo se comporta de diferentes maneiras, ainda que sejam de uma mesma espécie. Além disso, foram encontradas dificuldades em aplicar um protocolo de cultivo desenvolvido para uma determinada espécie em outra, demonstrando que protocolos de cultivo, ou de determinação de parâmetros, devem ser desenvolvidos especificamente para cada espécie, ou até mesmo linhagem, a fim de que os resultados obtidos sejam precisos e confiáveis.

## 6 CONCLUSÕES

A análise de identificação das espécies comprovou que as 6 linhagens de *Y. lipolytica* e 2 linhagens de *R. toruloides* utilizadas neste trabalho de mestrado são realmente pertencentes às espécies a que foram designadas. Além disso, os resultados do alinhamento Blast comprovaram que a sequência de DNA que codifica o gene correspondente ao domínio D1/D2 da subunidade maior 26S do RNA ribossomal é diferente entre as espécies de *Yarrowia*, *Rhodospodium* e *Saccharomyces* (esta usada como controle externo).

Os resultados obtidos quanto às técnicas de medida de absorvância das suspensões celulares demonstraram que cada microrganismo possui um limite superior de absorvância que deve ser mensurada em cada espectrofotômetro a ser utilizado. O comprimento de onda escolhido (600 nm) para as leituras de absorvância das suspensões celulares, foi ideal para mensurar a presença das células nos cultivos de *Y. lipolytica* e *R. toruloides*, sem que houvesse interferência de qualquer outro composto dissolvido no meio ou algum produto metabólico que eventualmente poderia ter sido formado durante o cultivo.

Foi possível determinar os parâmetros fisiológicos velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ), fator de conversão de substrato em biomassa na fase exponencial ( $Y_{X/S}^{\text{exp}}$ ) e velocidade específica de consumo de substrato ( $r_S^{\text{máx}}$ ) e o parâmetro de processo fator global de conversão de substrato em biomassa ( $Y_{X/S}^{\text{global}}$ ) das linhagens de *Y. lipolytica* em meio de cultura totalmente definido e glicerol como única fonte de carbono e energia. Foram obtidos valores para estes parâmetros, respectivamente, na faixa de 0,18 a 0,32 h<sup>-1</sup>, 0,33 a 0,64 g MS/g S, 0,49 a 0,70 g S/ gMS.h e 0,32 a 0,59 g MS/g S. Os resultados demonstraram que o glicerol foi o substrato limitante do crescimento, em todas as linhagens, e que as linhagens *Y. lipolytica* IMUFRJ 50678, *Y. lipolytica* Po1g, *Y. lipolytica* W29 e *Y. lipolytica* CCT 5443 são fisiologicamente muito similares.

O protocolo de cultivo desenvolvido para a levedura *Y. lipolytica* (meio MDBU, 2,5 g/L iniciais de glicerol, solução de tiamina e elementos-traço sem ácido cítrico) necessitou de adaptações para que os parâmetros fisiológicos e de processo pudessem ser determinados para as linhagens de *R. toruloides*, em glicerol como única fonte de carbono e energia. Portanto, as linhagens de *R. toruloides* foram cultivadas também em meio MDBU e 2,5 g/L iniciais de glicerol, porém com solução de vitaminas e elementos-traço contendo ácido cítrico em sua composição. Os resultados demonstraram que o glicerol pode não ter sido o substrato limitante

do crescimento e/ou que o aumento do pH extracelular durante os cultivos cinéticos pode ter sido um fator inibitório do crescimento. As linhagens de *R. toruloides* apresentaram velocidade específica máxima de crescimento 3,3 vezes menor que a média de  $\mu_{\text{máx}}$  das linhagens de *Y. lipolytica*. Os parâmetros  $\mu_{\text{máx}}$ ,  $Y_{X/S}^{\text{exp}}$ ,  $r_S^{\text{máx}}$  e  $Y_{X/S}^{\text{global}}$  obtidos para as linhagens *R. toruloides* CCT 0783 e *R. toruloides* Rt 10 foram, respectivamente: 0,076 e 0,092 h<sup>-1</sup>; 0,45 e 0,60 g MS/g S; 0,17 e 0,17 g S/ gMS.h; e 0,42 e 0,45 g MS/g S. Todos os parâmetros obtidos a partir dos cultivos cinéticos das leveduras *R. toruloides* CCT 0783 e *R. toruloides* Rt 10 foram iguais, estatisticamente, pressupondo que o processo de evolução aplicado à linhagem *R. toruloides* CCT 0783 não alterou as características fisiológicas da linhagem.

Dentre as 6 linhagens de *Y. lipolytica* estudadas, a linhagem *Y. lipolytica* CCT 5443 foi a que apresentou maior capacidade de acúmulo de lipídeos, com fator de conversão de substrato em lipídeos de 0,054 (g Lip).(g S<sup>-1</sup>) e produtividade em lipídeos de 0,040 (g Lip).(L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>). Tanto entre as linhagens de *R. toruloides* quanto em comparação com todas as linhagens analisadas, a linhagem *R. toruloides* Rt 10 foi a que apresentou maiores valores de fator de conversão de substrato em biomassa (0,11 g Lip/g S<sup>-1</sup>) e produtividade em biomassa (0,10 g Lip/L.h), sendo considerada a linhagem mais promissora para aplicação em produção industrial de óleo microbiano.

## 6.1 Sugestões para trabalhos futuros

Para a realização de trabalhos futuros, sugere-se:

1. Estudar a cinética de crescimento das linhagens de *R. toruloides* nas mesmas condições já estudadas, porém com intervalos maiores de amostragem e por períodos de tempo mais longos, a fim de verificar se a fonte de carbono (glicerol) será totalmente consumida.
2. Conforme acima, incluindo um tampão no meio de cultivo, para diminuir a alteração do pH. Com isto, seria possível estabelecer se a mudança de pH realmente ocasiona o término da fase exponencial de crescimento e a interrupção do consumo do glicerol.

3. Estudar a cinética de acúmulo de lipídeos para as linhagens *Y. lipolytica* IMUFRJ 50678, *Y. lipolytica* Po1g, *Y. lipolytica* W29, *Y. lipolytica* CCT 5443, *Y. lipolytica* CCT 7401 e *R. toruloides* CCT 0783, para verificar o instante de cultivo em que estas linhagens apresentam o maior teor de lipídeos.
4. Adicionar anti-espumante nos cultivos para acúmulo de lipídeos das linhagens de *Y. lipolytica* para verificar o efeito deste composto no metabolismo das linhagens.
5. Testar diferentes razões C/N, maiores que 100, em todas as linhagens, a fim de verificar se o acúmulo lipídico é intensificado com o aumento desta razão.
6. Repetir os experimentos realizados substituindo glicerol puro por glicerol bruto, um substrato de menor custo.

## 7 REFERÊNCIAS

ABE, K.; KUSAKA, I.; FUKUI, S. Morphological Change in the Early Stages of the Mating Process of *Rhodospidium toruloides*. *Journal of Bacteriology*, v. 122, n. 2, p. 710-718, 1975.

ADACHI, O et al. Crystallization and Properties of L-Phenylalanine Ammonia-lyase from *Rhodospidium toruloides*. *Agricultural and Biological Chemistry.*, v. 54, n. 11, p. 2839-2843, 1990

AGEITOS, J. M. et al. Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 90, p. 1219–1227, 2011.

AKPINAR, O.; UÇAR, F. B. Molecular characterization of *Yarrowia lipolytica* strains isolated from different environments and lipase profiling. *Turkish Journal of Biology*, v. 37, p. 249-258, 2013.

ALKASRAWI, M. et al. A microbial biosensor based on *Yarrowia lipolytica* for the off-line determination of middle-chain alkanes. *Biosensors & Bioelectronics*, v. 14, p. 723–727, 1999.

ALVAREZ, H. M.; STEINBÜCHEL, A. Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 60, p. 367–376, 2002.

AMARAL, P. F. F. et al. Cell surface characterization of *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682. *Yeast*, v. 23, p. 867-877, 2006.

ANDRÉ, A. et al. Biotechnological conversions of bio-dieselderived crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* strains. *Engineering in Life Sciences*, v. 9, n. 6, p. 468–478, 2009.

AZÓCAR, L. et al. Biotechnological processes for biodiesel production using alternative oils. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 88, p. 621–636, 2010.

BACCIOTTI, F. *Fisiologia e formação de partículas lipídicas durante o crescimento da levedura Yarrowia lipolytica IMUFRJ 50682*. 2015. 119 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2015.

BALDI, F.; PEPI, M.; FAVA, F. Growth of *Rhodospidium toruloides* Strain DBVPG 6662 on Dibenzothiophene Crystals and Orimulsion. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 8, p. 4689–4696, 2003.

BANKAR, A. V.; KUMAR, A. R.; ZINJARDE, S. S. Removal of chromium (VI) ions from aqueous solution by adsorption onto two marine isolates of *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Hazardous Materials*, v. 170, p. 487–494, 2009.

BARTH, G; GAILLARDIN, C. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 19, p. 219–237, 1997.

BEOPOULOS, A. et al. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Progress in Lipid Research*, v. 48, p. 375–387, 2009.

BEOPOULOS, A; CHARDOT, T.; NICAUD, J-M. *Yarrowia lipolytica*: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. *Biochimie*, v. 91, p. 692–696, 2009.

BOLETIM TÉCNICO T041. Comparing Microvolume and Cuvette Based Measurements of Microbial Cell Cultures. Thermo Scientific, 2011. Disponível em: <www.nanodrop.com>.

BOMMAREDDY, R. R. et al. Metabolic network analysis and experimental study of lipid production in *Rhodospiridium toruloides* grown on single and mixed substrates. *Microbial Cell Factories*, v. 14, n. 36, 2015.

BONTURI, N. et al. Single Cell Oil Producing Yeasts *Lipomyces starkeyi* and *Rhodospiridium toruloides*: Selection of Extraction Strategies and Biodiesel Property Prediction. *Energies*, v. 8, p. 5040-5052, 2015.

BONTURI, N. *Produção de óleo microbiano por cepas evoluídas de leveduras oleaginosas a partir de materiais hemicelulósicos visando a sua aplicação em biorrefinarias*. 2016. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. 2015.

BONTURI, N.; MIRANDA, E. A.; BERGLUND, K. A. Single cell oil production in sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysates and cell recovery by flotation. In: XIX SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS; X SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, 4., 2013, Paraná. **Anais...** Paraná: Foz do Iguaçu, 2013.

BUTINAR, L. et al. Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS Microbiology Letters*, v. 244, p. 229–234, 2005.

CHANG, C-F. et al. Identifying and characterizing *Yarrowia keelungensis* sp. nov., an oil-degrading yeast isolated from the sea surface microlayer. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 104, p. 1117–1123, 2013.

CINAR, A. et al. (2003). In: CINAR, A. et al (Eds). *Batch Fermentation – Modeling, Monitoring, and Control*. New York, USA: Marcel Dekker, Inc., 2003.

da SILVA, G. P.; MACK, M; CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*, v. 27, p. 30–39, 2009.

de LIMA, J. R. C. et al. Utilization of Crude Glycerol by *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678 in Bioproduct Production. *Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, v. 7, p. 1087-1093, 2013.

DEMIRBAS, A; DEMIRBAS, M. F. Importance of algae oil as a source of biodiesel. *Energy Conversion and Management*, v. 52, p. 163–170, 2011.

DIAS, C. et al. New dual-stage pH control fed-batch cultivation strategy for the improvement of lipids and carotenoids production by the red yeast *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921. *Bioresource Technology*, v. 189, p. 309–318, 2015.

DONLAN, R. M; COSTERTON, J. W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 15, n. 2, p. 167–193, 2002.

DONOT, F. et al. Single cell oils (SCOs) from oleaginous yeasts and moulds: Production and genetics. *Biomass and Bioenergy*, v. 68, p. 135–150, 2014.

DORAN, P. M. Presentation and Analysis of Data and Homogeneous Reactions. In: DORAN, P. M. (Ed). *Bioprocess Engineering Principles*. Elsevier, 1995.

FAKAS, S. et al. Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*. *Biomass and Bioenergy*, v. 33. p. 573-580, 2009.

FELL, J. W. et al. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 50, p. 1351–1371, 2000.

FICKERS, P. et al. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Research*, v. 5, p. 527–543, 2005.

FOLCH, J. et al. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

FONTES, G. C. et al. Factorial Design to Optimize Biosurfactant Production by *Yarrowia lipolytica*, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2010, p. 1-8, 2012.

GAILLARDIN, C. M. et al. A study of copulation, sporulation and meiotic segregation in *Candida lipolytica*. *Arch Mikrobiol*, v. 92, p. 69-83, 1973.

GONÇALVES, F. A. G.; COLEN, G.; TAKAHASHI, J. A. *Yarrowia lipolytica* and Its Multiple Applications in the Biotechnological Industry. *The Scientific World Journal*, v. 2014, p. 1–14, 2014.

GROENEWALD, M. et al. *Yarrowia lipolytica*: Safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 40, n. 3, p. 187–206, 2014.

GROENEWALD, M; SMITH, M. T. The teleomorph state of *Candida deformans* Langeron & Guerra and description of *Yarrowia yakushimensis* comb. nov.. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 103, p. 1023–1028, 2013.

HAGLER, A. N.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. *Candida lipolytica* isolated from Guanabara Bay and its ability to grow in marine and estuarine conditions. *Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas*, v. 12, n. 4-5, p. 273–277, 1979.

HEARD, G. M.; FLEET, G. H. *Yarrowia (Candida) lipolytica*. In: Robinson, R.; BATT, C. A.; PATEL, P. D. (Eds). *Encyclopedia of food microbiology, 1st edition*. New York: Academic Press, 1999, 360–365.

HESSE, A. Industrial Biosyntheses. Part I. FATS. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, v. 9, p. 653–704, 1949.

HISS, H. Cinética de processos fermentativos. In: SCHMIDELL, W; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Eds). *Biotechnologia Industrial, Volume II, Engenharia Bioquímica*. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2001.

HUANG, C. et al. Single cell oil production from low-cost substrates: The possibility and potential of its industrialization. *Biotechnology Advances*, v. 31, p. 129–139, 2013.

ISHIKURA, T. , FOSTER, J. W. Incorporation of molecular oxygen during microbial utilization of olefins. *Nature*, v. 192, p. 892-893, 1961.

JANNASCH, H. W.; EGLI, T. Microbial growth kinetics: a historical perspective. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 63, p. 213-224, 1993.

JUSZCZYK, P. et al. Biomass production by novel strains of *Yarrowia lipolytica* using raw glycerol, derived from biodiesel production. *Bioresource Technology*, v. 137, p. 124–131, 2013.

KAMZOLOVA, S. V. et al. Lipase Secretion and Citric Acid Production in *Y. lipolytica* Yeast Grown on Animal and Vegetable Fat. *Food Technology and Biotechnology*, v. 43, n. 2, p. 113–122, 2005.

KERSCHER, S. et al. Application of the yeast *Yarrowia lipolytica* as a model to analyse human pathogenic mutations in mitochondrial complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase). *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1659, p. 197–205, 2004.

KIRAN, E. U.; TRZCINSKI, A.; WEBB, C. Microbial oil produced from biodiesel by-products could enhance overall production. *Bioresource Technology*, v. 129, p. 650–654, 2013.

KOCH, A. L. Turbidity Measurements of Bacterial Cultures in Some Available Commercial Instruments. *Analytical Biochemistry*, v. 38, p. 252-259, 1970.

KOHLWEIN, S. D.; PALTAUF, F. Uptake of fatty acids by the yeasts, *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces lipolytica*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 792, p. 310–317, 1983.

KOUTINAS, A. A. et al. Design and techno-economic evaluation of microbial oil production as a renewable resource for biodiesel and oleochemical production. *Fuel*, v. 116, p. 566–577, 2014.

KURTZMAN, C. P. *Yarrowia van der Walt & von Arx* (1980). In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W., BOEKHOUT, T. (Eds). *The yeasts, a taxonomic study, 5th edition*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 2011.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 73, p. 331–371, 1998.

LAZAR, Z. et al. Hexokinase—A limiting factor in lipid production from fructose in *Yarrowia lipolytica*. *Metabolic Engineering*, v. 26, p. 89–99, 2014.

LAZAR, Z.; et al. Optimized invertase expression and secretion cassette for improving *Yarrowia lipolytica* growth on sucrose for industrial applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v.40, p. 1273–1283, 2013.

LEE, J. J. L. et al. Metabolomic Profiling of *Rhodospiridium toruloides* Grown on Glycerol for Carotenoid Production during Different Growth Phases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 62, p. 10203–10209, 2014.

LI, Q.; DU, W.; LIU, D. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology* v. 80, p. 749–756, 2008.

LI, Y.; ZHAO, Z. K.; BAI, F. High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 41, p. 312–317, 2007.

LIN, X. et al. Functional integration of multiple genes into the genome of the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *FEMS Yeast Research*, v. 14, p. 547–555, 2014.

LIU, H. et al. Comparative proteomic analysis of *Rhodospiridium toruloides* during lipid accumulation. *Yeast*, v. 26, p. 553–566, 2009.

LÖÖKE, M.; KRISTJUHAN, K.; KRISTJUHAN, A. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *Biotechniques*, v. 50, n. 5, p. 325–328, 2011.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. Crescimento Microbiano. In: MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. (Eds). *Microbiologia de Brock*. 10ª edição, Porto Alegre: Artmed, 2008.

MADZAK, C. et al. Strong hybrid promoters and integrative expression/secretion vectors for quasi-constitutive expression of heterologous proteins in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, v. 2, p. 207–216, 2000.

MAKRI, A.; FAKAS, S.; AGGELIS, G. Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeated batch cultures. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 2351–2358, 2010.

MARTINS, F. F. et al. Influência da fonte de carbono na hidrofobicidade de *Yarrowia lipolytica*. In: VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 6., 2009, Minas Gerais. **Anais...** Minas Gerais: Uberlândia, 2009.

MATLOCK, B. C. et al. Analyzing Differences in Bacterial Optical Density Measurements between Spectrophotometers. Abstract 1730. Thermo Scientific, [s. d.]. Disponível em: <www.Thermoscientific.com/nanodrop>.

MATSAKAS, L. et al. High concentrations of dried sorghum stalks as a biomass feedstock for single cell oil production by *Rhodospiridium toruloides*. *Biotechnology for Biofuels*, v. 8, p. 1–6, 2015.

- MCKAY, A. M. Growth of fermentative and non-fermentative yeasts in natural yoghurt, stored in polystyrene cartons. *International Journal of Food Microbiology*, v. 15, p. 383–388, 1992.
- MEESTERS, P. A. E. P. et al. High-cell-density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 45, n. 5, p. 575-579, 1996.
- MENG, X. et al. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*, v. 34, p. 1–5, 2009.
- MONOD, J. The growth of bacterial cultures. *Annual Review of Microbiology.*, v. 3, p. 371-394, 1949.
- MYERS, J. A. et al. Improving accuracy of cell and chromophore concentration measurements using optical density. *BMC Biophysics*, v. 6, n. 4, p. 1-16, 2013.
- NAGY, E. et al. *Yarrowia divulgata* f.a., sp. nov., a yeast species from animal-related and marine sources. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 63, p. 4818–4823, 2013.
- NAGY, E. et al. *Yarrowia porcina* sp. nov. and *Yarrowia bubula* f.a. sp. nov., two yeast species from meat and river sediment. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 105, p. 697–707, 2014.
- NAIK, S. N. et al. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, p. 578–597, 2010.
- NICAUD, J-M. *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*, v. 29, p. 409–418, 2012.
- NICOL, R. W.; MARCHAND, K.; LUBITZ, W. D. Bioconversion of crude glycerol by fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 93, p. 1865–1875, 2012.
- NIELSEN, J. Microbial process kinetics. In: RATLEDGE, C; KRISTIANSEN, B. (Eds). *Basic Biotechnology*, 3<sup>rd</sup> ed., Cambridge: Cambridge University Press, 2006.
- OLIVEIRA, P. H. S. *Análise fisiológica e cinética do crescimento da levedura oleaginosa Yarrowia lipolytica IMUFRJ 50682 em diferentes fontes de carbono*. 2014. 121 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2014.
- OLSSON, L.; NIELSEN, J. On-line and in situ monitoring of biomass in submerged cultivations. *Tibtech*, v. 15, p. 517-522, 1997.
- PAPANIKOLAOU, S. et al. Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. *Biomass and Bioenergy*, v. 32, p. 60-71, 2008.
- PAPANIKOLAOU, S. et al. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. *Journal of Applied Microbiology*, v. 92, p. 737–744, 2002.

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. *Bioresource Technology*, v. 82, p. 43–49, 2002.

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 113, p. 1031–1051, 2011.

PETROBRÁS. Produção de biocombustíveis. Disponível em: <<http://www.petrobras.com.br/pt/nossas-atividades/areas-de-atuacao/producao-de-biocombustiveis/>>. Acesso em 24 de setembro de 2014.

POLI, J. S. et al. Microbial lipid produced by *Yarrowia lipolytica* QU21 using industrial waste: A potential feedstock for biodiesel production. *Bioresource Technology*, v. 161, p. 320–326, 2014.

RANE, K. D.; SIMS, K. A. Production of citric acid by *Candida lipolytica* Y1095: Effect of glucose concentration on yield and productivity. *Enzyme and Microbial Technology*, v.15, p. 646–651, 1993.

RATLEDGE, C. Biochemistry and Physiology of Growth and Metabolism. In: RATLEDGE, C; KRISTIANSEN, B. (Eds). *Basic Biotechnology*, 1<sup>st</sup> ed., Cambridge: Cambridge University Press, 2006.

RATLEDGE, C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimie*, v. 86, p. 807–815, 2004.

RATLEDGE, C. Single cell oils - have they a biotechnological future? *Tibtech*, v. 11, p. 278–284, 1993.

RATLEDGE, C; WYNN, J. P. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Advances in Applied Microbiology*, v. 51, p. 1–51, 2002.

RODRIGUES, L. B. et al. Avaliação da hidrofobicidade e da formação de biofilme em poliestireno por *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 37, n. 3, p. 225-23, 2009

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, v. 5, p. 1-17, 2014.

SAMPAIO, J. P. *Rhodospiridium Banno* (1967). In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W., BOEKHOUT, T. (Eds). *The yeasts, a taxonomic study, 5th edition*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 2011.

SANTOS, E. O. et al. Raw Glycerol as Substrate for the Production of Yeast Biomass. *International Journal of Food Engineering*, v. 9, n. 4, p. 413–420, 2013.

SCHWARTZ, S. J. et al. Parte II – Componentes Minoritários dos Alimentos. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K; FENNEMA, O. R. (Eds). Química de alimentos de Fennema, 4ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2010.

SERRANO, R. et al. Copper and Iron Are the Limiting Factors for Growth of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* in an Alkaline Environment. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 19, p. 19698-19704, 2004.

SESTRIC, R. et al. Growth and neutral lipid synthesis by *Yarrowia lipolytica* on various carbon substrates under nutrient-sufficient and nutrient-limited conditions. *Bioresource Technology*, v. 164, p. 41–46, 2014.

SITEPU, I. R. et al. Oleaginous yeasts for biodiesel: Current and future trends in biology and production. *Biotechnology Advances*, v. 32, p. 1336–1360, 2014.

SOARES, A. T. et al. Comparative Analysis of the Fatty Acid Composition of Microalgae Obtained by Different Oil Extraction Methods and Direct Biomass Transesterification. *Bioenergy Research*, v. 7, p. 1035–1044, 2014.

SUTHERLAND, J. B.; CORNELISON, C.; CROW JR., S. A. *Yarrowia (Candida) lipolytica*. In: BATT, C. A.; TORTORELLO, M., (Eds). *Encyclopedia of food microbiology, 2nd edition*. New York: Academic Press, 374–378, 2014.

SUZZI, G. et al. Proteolytic, lipolytic and molecular characterisation of *Yarrowia lipolytica* isolated from cheese. *International Journal of Food Microbiology*, v. 69, p. 69–77, 2001.

SWINNEN, S. et al. Re-evaluation of glycerol utilization in *Saccharomyces cerevisiae*: characterization of an isolate that grows on glycerol without supporting supplements. *Biotechnology for Biofuels*, v. 6, n. 157, p. 1-12, 2013.

TCHAKOUTEU, S. S. et al. Lipid production by yeasts growing on biodiesel-derived crude glycerol: strain selection and impact of substrate concentration on the fermentation efficiency. *Journal of Applied Microbiology*, v. 118, p. 911-927, 2015.

TOMASZEWSKA-HETMAN, L; RYWIŃSKA, A. Erythrose reductase as an enzyme responsible for erythritol overproduction in *Yarrowia lipolytica* yeast grown on glycerol media. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, v. 18, n. 4, p. 1-10, 2015.

TSIGIE, Y. A. et al. Catalyst-free biodiesel preparation from wet *Yarrowia lipolytica* P01g biomass under subcritical condition. *Fuel Processing Technology*, v. 115, p. 50–56, 2013.

TSIGIE, Y. A. et al. Maximizing biodiesel production from *Yarrowia lipolytica* P01g biomass using subcritical water pretreatment. *Bioresource Technology*, v. 111, p. 201–207, 2012.

TSUGAWA, R. et al. Fermentation of  $\eta$ -Paraffins by Yeast. Part III.  $\alpha$ -Ketoglutarate Productivity of Various Yeast. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 33, n. 6, p. 929–938, 1969.

VAN DER WALT, J. P.; SCOTT, D. B. The yeast genus *Saccharomycopsis schiöninghii*. *Mycopathologia et Mycologia applicata*, v. 43, n. 3–4, p. 279–288, 1971.

- VAN DER WALT, J. P.; VON ARX, J. A. The yeast genus *Yarrowia* gen. nov. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 46, p. 517–521, 1980.
- VAUGHAN-MARTINI, A; MARTINI, A. *Saccharomyces* Meyen ex Reess (1870). In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W., BOEKHOUT, T. (Eds). *The yeasts, a taxonomic study, 5th edition*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 2011.
- VERDUYN, C. et al. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast*, v. 8, n. 7, 1992.
- VON ARX, J. A. On *Endomyces*, *Endomycopsis* and related yeast-like fungi. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 38, p. 289–309, 1972.
- WACHÉ, Y. et al. Catabolism of hydroxyacids and biotechnological production of lactones by *Yarrowia lipolytica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 61, p. 393–404, 2003.
- WANG, Z. et al. Glycerol production by microbial fermentation: A review. *Biotechnology Advances*, v. 19, p. 201–223, 2001.
- WIEBE, M. G. et al. Lipid production in batch and fed-batch cultures of *Rhodospiridium toruloides* from 5 and 6 carbon carbohydrates. *BMC Biotechnology*, v. 12, n. 26, p. 1-10, 2012.
- WORKMAN, M.; HOLT, P.; THYKAER, J. Comparing cellular performance of *Yarrowia lipolytica* during growth on glucose and glycerol in submerged cultivations. *AMB Express*, v. 3, n. 58, p. 1-9, 2013.
- YARROW, D. Four new combinations in Yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 38, p. 357–360, 1972.
- YIN, X. et al. Enhanced alpha-ketoglutaric acid production in *Yarrowia lipolytica* WSH-Z06 by regulation of the pyruvate carboxylation pathway. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 96, p. 1527–1537, 2012.
- YKEMA, A. et al. Optimization of lipid production in the oleaginous yeast *Apiotrichum curvature* in wheypermeate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 29, p. 211-218, 1988.
- YLEX *Expression Kit* (números FYY201-1KT e FYY301-120P). *Yeastern Biotech Co., Ltd.* Disponível em: <[www.yeastern.com](http://www.yeastern.com)>.
- ZHU, Z. et al. A multi-omic map of the lipid-producing yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Nature Communications*, 3:1112, 2012.
- ŻOGAŁA, B. et al. Geoelectrical Observation of *Yarrowia lipolytica* Bioremediation of Petrol-Contaminated Soil. *Polish Journal of Environmental Studies*, v. 14, n. 5, p. 665–669, 2005.



**Tabela 24 – Sequências consenso obtidas por sequenciamento do DNA correspondente à região D1/D2 da subunidade 26S do RNA ribossomal, a partir do alinhamento dos *primers* NL-1, NL-2A, NL-3A e NL-4, para as 6 linhagens de *Y. lipolytica*, 2 linhagens de *R. toruloides* e 1 linhagem de *S. cerevisiae* estudadas**

Linhagem	Sequência consenso
<i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682	GTCGTCGGTGGCAGTGTGGAGGGTTAGGGGAGAACGCCCGAAAGGCGCTCCCATTGTAACCCTCGTCTCGCTATCGATGACTCGGCGTCGGCAGTAC ACCGCCACGAGGGGCGGCTGAAACCTCGGCCACTCTCCACTCATTTCCTCCCTATCAACAATTTACATACTATTTCACTCTCTTTCAAAGTTCTTTT CACCTTTCCTTACAGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCTACCAGTATTTAGCTTTAGATGGAGTTTACCACCCACTTTGAGCTGCATTCCCAAACAACCTCG ACTCTTTGATAAGGCAATACATGGAGAACGGTTAGCCAGACGGGGTTGTCACCCTCTATGACGTAATTTCCAAGCAACTGGGTTAGCTTTCTCCAAT GCCAAATCTTCAAATTACAATCCCAGGGTTTCAAATTTGAGCTTTGCCGCTTCACTCGCCGTTACTGAGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTCTCCGCT TATTGATATG
<i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50678	CTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAAGCTCAAATTTGAAACCCTCGGGATTGTAATTTGAAGATTTGGCATTGGAGAAAAGCTAACCCAAGTTGCTT GGAATAGTACGTCATAGAGGGTGACAACCCCGTCTGGCTAACCGTTCTCCATGTATTGCCTTATCAAAGAGTCGAGTTGTTGGGAATGCAGCTCAAAG TGGGTGGTAAACTCCATCTAAAGCTAAATACTGGTGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAAGGTGAAAAGAAGTTGAAAAGAGAGTG AAATAGTATGTGAAATTGTTGATAGGGAAGGAAATGAGTGGAGAGTGGCCGAGGTTTCAGCCGCCCTCGTGGGCGGTGTAAGTCCGACGCCGAGTCA TCGATAGCGAGACGAGGGTTACAAATGGGAGCGCCTTTCGG
<i>Y. lipolytica</i> Polg	GTCGGTGGCAGTGTGGAGGGTTAGGGGAGAACGCCCGAAAGGCGCTCCCATTGTAACCCTCGTCTCGCTATCGATGACTCGGCGTCGGCAGTACACC GCCACGAGGGGCGGCTGAAACCTCGGCCACTCTCCACTCATTTCCTTCCCTATCAACAATTTACATACTATTTCACTCTCTTTCAAAGTTCTTTTAC CTTTCCTTACAGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCTACCAGTATTTAGCTTTAGATGGAGTTTACCACCCACTTTGAGCTGCATTCCCAAACAACCTCGACT CTTTGATAAGGCAATACATGGAGAACGGTTAGCCAGACGGGGTTGTCACCCTCTATGACGTAATTTCCAAGCAACTTGGGTTAGCTTTCTCCAATGCC AAATCTTCAAATTACAATCCCAGGGTTTCAAATTTGAGCTTTTGCCGCTTCACTCGCCGTTACTGAGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTCTCCGCT
<i>Y. lipolytica</i> W29	GCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAAGCTCAAATTTGAAACCCTCGGGATTGTAATTTGAAGATTTGGCATTGGAGAAAAGCTAACCCAAGTTGC TTGGAATAGTACGTCATAGAGGGTGACAACCCCGTCTGGCTAACCGTTCTCCATGTATTGCCTTATCAAAGAGTCGAGTTGTTGGGAATGCAGCTCAA AGTGGGTGGTAAACTCCATCTAAAGCTAAATACTGGTGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAAGGTGAAAAGAAGTTGAAAAGAGAG TGAAATAGTATGTGAAATTGTTGATAGGGAAGGAAATGAGTGGAGAGTGGCCGAGGTTTCAGCCGCCCTCGTGGGCGGTGTAAGTCCGACGCCGAGT CATCGATAGCGAGACGAGGGTTACAAATGGGAGCGCCTTTCGGG
<i>Y. lipolytica</i> CCT 5443	TTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAAGCTCAAATTTGAAACCCTCGGGATTGTAATTTGAAGATTTGGCATTGGAGAAAAGCTAACCCAAGTT GCTTGGGAATAGTACGTCATAGAGGGTGACAACCCCGTCTGGCTAACCGTTCTCCATGTATTGCCTTATCAAAGAGTCGAGTTGTTGGGAATGCAGCTC AAAGTGGGTGGTAAACTCCATCTAAAGCTAAATACTGGTGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAAGGTGAAAAGAAGTTGAAAAGAG AGTGAAATAGTATGTGAAATTGTTGATAGGGAAGGAAATGAGTGGAGAGTGGCCGAGGTTTCAGCCGCCCTCGTGGGCGGTGTAAGTCCGACGCCGA GTCATCGATAGCGAGACGAGGGTTACAAATGGGAGCGCCTTTCGGG

**Tabela 24 – Sequências consenso obtidas por sequenciamento do DNA correspondente à região D1/D2 da subunidade 26S do RNA ribossomal, a partir do alinhamento dos primers NL-1, NL-2A, NL-3A e NL-4, para as 6 linhagens de *Y. lipolytica*, 2 linhagens de *R. toruloides* e 1 linhagem de *S. cerevisiae* estudadas (continuação)**

Linhagem	Sequência consenso
<i>Y. lipolytica</i> CCT 7401	GGAGGGTTAGGGGAGAACGCCCGAAGGCGCTCCCATTTGTAACCCTCGTCTCGCTATCGATGACTCGGCGTCGGCAGTACACCGCCACGAGGGG CGGCTGAAACCTCGGCCACTCTCCACTCATTTCCCTCCCTATCAACAATTTACATACTATTTACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTACCTTTCCCTCA CAGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCTCACCAGTATTTAGCTTTAGATGGAGTTTACCACCCACTTTGAGCTGCATTCCCAAACAACCTCGACTCTTTGAT AAGGCAATACATGGAGAACGGTTAGCCAGACGGGGTTGTCACCCTCTATGACGTAATTTCCAAGCAACTTGGGTTAGCTTTCTCCAATGCCAAAT CTTCAAATTACAATCCCGAGGGTTTCAAATTTGAGCTTTTGCCGCTTCACTCGCCGTTACTGAGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCCCTCCGCT
<i>R. toruloides</i> CCT 0783	CAATAAGCGGAGGAAAAGAACTAACAAGGATTCCTAGTAGCGGCGAGCGAAGCGGGAAGAGCTCAAATTTGTAATCTGGCACCTTCGGTGTC CGAGTTGTAATCTCTAGAAGTGTTTTCCGCGTTGGACCGCACACAAGTCTGTTGGAATACAGCGGCATAGTGGTGATACCCATTACACGGTGCGG ACGCCCAGCGCTTTGTGATACACTTCGACGAGTCGAGTTGTTGGGAATGCAGCTCAAATTTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGC GAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAAAGTACGTGAAATTGTTGGAAGGAAACGC TTGAAGTCAGACTTGCTTGCCGGGCTTGCTCGGTTTGCAGGCCAGCATCAGTTTTCCGGGGCGGATAATGGCAGTTAGAATGTAGCAGTCTCGGCT GTGTTATAGCTTTCTGCTGGATACGTCCTGGGGACTGAGGAACGCAGCGTGCCGTATGGCGAGGGCTTCGGTCCTTTCACGCTTAGGATGCTGGT GGAATGGCTTTAAACGACCCGCTTGA
<i>R. toruloides</i> Rt10	AAGCGGAGGAAAAGAACTAACAAGGATTCCTAGTAGCGGCGAGCGAAGCGGGAAGAGCTCAAATTTGTAATCTGGCACCTTCGGTGTCGA GTTGTAATCTCTAGAAGTGTTTTCCGCGTTGGACCGCACACAAGTCTGTTGGAATACAGCGGCATAGTGGTGATACCCATTACACGGTGCGGACG CCCAGCGCTTTGTGATACACTTTTCGACGAGTCGAGTTGTTGGGAATGCAGCTCAAATTTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAG AGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAAAGTACGTGAAATTGTTGGAAGGAAACGCTTG AAGTCAGACTTGCTTGCCGGGCTTGCTCGGTTTGCAGGCCAGCATCAGTTTTCCGGGGCGGATAATGGCAGTTAGAATGTAGCAGTCTCGGCTGTG TTATAGCTTTCTGCTGGATACGTCCTGGGGACTGAGGAACGCAGCGTGCCGTATGGCGAGGGCTTCGGTCCTTTCACGCTTAGGATGCTGGTGA ATGGCTTTAAACGACCCGCTTGA
<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK113-7D	TCAAGACGGGCGGCATATAACCATTATGCCAGCATCCTTGACTTACGTCGAGTCCCTCAGTCCCAGCTGGCAGTATTCCACAGGCTATAATACTT ACCGAGGCAAGCTACATTCCTATGGATTTATCCTGCCACCAAACTGATGCTGGCCAGTGAAATGCGAGATTCCCTACCCACAAGGAGCAGAG GGCACAAAACACCATGTCTGATCAAATGCCCTTCCCTTTCAACAATTTACGTAATTTTACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTTCATCTTTCCATCACT GTAATTTGTTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTAGAGCTGCATTCCCAAACAACCTCGACTCTTCAAG GCACTTTACAAAAGAACCGCACTCCTCGCCACACGGGATTCTCACCTCTATGACGTCCTGTTCCAAGGAACATAGACAAGGAACGGCCCCAAAGTT GCCCTCTCAAATTACAACCTCGGGCACCGAAGGTACCAGATTTCAAATTTGAGCTTTTGCCGCTTCACTCGCCGTTACTAAGGCAATCCCGGTTGGT TTCTTTTCCCTCCGCT

Fonte: elaborada pelo autor

**Tabela 25 - Dados experimentais para as cinéticas de crescimento de linhagens de *Y. lipolytica* realizadas em meio MDBU (2,5 g/L iniciais de glicerol), 30 °C e 200 rpm**

	IMUFRJ 50682 - Replicata 1					IMUFRJ 50682 - Replicata 2					IMUFRJ 50682 - Replicata 3				
Tempo (h)	MS (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	Linha MS (g/L)	Linha Gli (g/L)	MS (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	Linha MS (g/L)	Linha Gli (g/L)	MS (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	Linha MS (g/L)	Linha Gli (g/L)
0	0,142	6,03	2,249	0,142	2,249	0,141	6,02	2,522	0,141	2,522	0,162	6,01	2,274	0,162	2,274
1	0,152	6,01	2,152	0,152	2,152	0,157	5,97	2,148	0,157	2,200	0,207	5,96	2,156	0,200	2,180
2	0,205	5,99	1,986	0,205	1,986	0,201	5,96	1,971	0,201	1,971	0,250	5,94	2,087	0,250	2,087
3	0,279	5,96	1,769	0,279	1,769	0,260	5,94	1,829	0,260	1,829	0,339	5,94	1,887	0,330	1,887
4	0,360	5,95	1,541	0,360	1,541	0,340	5,93	1,591	0,340	1,670	0,431	5,91	1,561	0,431	1,620
5	0,483	5,93	1,444	0,483	1,250	0,435	5,90	1,420	0,435	1,440	0,547	5,87	1,285	0,547	1,300
6	0,610	5,92	0,939	0,610	0,939	0,553	5,91	1,136	0,553	1,100	0,669	5,85	1,216	0,669	0,950
7	0,745	5,88	0,647	0,745	0,647	0,679	5,83	0,371	0,679	0,600	0,796	5,78	0,724	0,796	0,550
8	0,849	5,84	0,358	0,849	0,350	0,783	5,77	0,100	0,783	0,100	0,902	5,74	0,155	0,902	0,155
9	0,902	6,07	0,000	0,902	0,000	0,830	5,73	0,000	0,850	0,000	0,954	6,18	0,000	0,954	0,000
10	0,917	6,48	0,000	0,917	0,000	0,891	6,21	0,000	0,891	0,000	0,889	6,53	0,000	0,889	0,000
	IMUFRJ 50678 - Replicata 1					IMUFRJ 50678 - Replicata 2					IMUFRJ 50678 - Replicata 3				
Tempo (h)	MS (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	Linha MS (g/L)	Linha Gli (g/L)	MS (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	Linha MS (g/L)	Linha Gli (g/L)	MS (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	Linha MS (g/L)	Linha Gli (g/L)
0	0,086	6,05	2,28	0,086	2,280	0,100	6,04	2,208	0,105	2,208	0,084	6,05	2,078	0,084	2,078
1	0,103	6,03	2,24	0,103	2,240	0,131	6,00	2,104	0,131	2,104	0,104	6,06	1,917	0,104	2,078
2	0,127	6,04	2,179	0,127	2,179	0,157	6,01	2,040	0,157	2,040	0,128	6,01	2,107	0,128	2,070
3	0,153	6,04	2,104	0,153	2,104	0,202	6,03	1,965	0,202	1,965	0,160	6,02	1,961	0,160	2,010
4	0,217	6,04	2,024	0,217	2,024	0,277	6,01	1,874	0,277	1,880	0,224	6,01	1,904	0,224	1,920
5	0,302	6,00	1,881	0,302	1,881	0,396	6,00	1,750	0,396	1,750	0,318	5,99	---	0,318	1,780
6	0,419	5,99	1,67	0,419	1,670	0,540	5,99	1,459	0,540	1,520	0,450	5,99	1,589	0,450	1,589
7	0,555	5,98	1,368	0,555	1,368	0,707	5,99	1,109	0,707	1,109	0,603	6,00	1,262	0,603	1,262
8	0,747	5,99	1,014	0,747	0,990	0,893	5,99	0,603	0,893	0,603	0,788	5,99	0,866	0,788	0,850
9	0,918	5,95	0,460	0,918	0,460	1,064	6,05	0,000	1,010	0,000	0,995	5,96	0,301	0,995	0,301
10	0,999	6,15	0,000	0,999	0,000	1,036	6,51	0,000	1,040	0,000	1,077	6,30	0,000	1,077	0,040
11	1,032	6,47	0,000	1,032	0,000	1,043	6,70	0,000	1,043	0,000	1,057	6,58	0,000	1,080	0,020

**Tabela 25 - Dados experimentais para as cinéticas de crescimento de linhagens de *Y. lipolytica* realizadas em meio MDBU (2,5 g/L iniciais de glicerol), 30 °C e 200 rpm (continuação)**

	Po1g - Replicata 1					Po1g - Replicata 2					Po1g - Replicata 3				
Tempo (h)	MS (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	Linha MS (g/L)	Linha Gli (g/L)	MS (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	Linha MS (g/L)	Linha Gli (g/L)	MS (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	Linha MS (g/L)	Linha Gli (g/L)
0	0,191	6,11	2,206	0,191	2,206	0,217	6,11	2,186	0,217	2,186	0,208	6,11	2,294	0,208	2,294
1	0,220	6,08	2,062	0,220	2,062	0,245	6,06	2,071	0,245	2,100	0,234	6,06	2,152	0,234	2,152
2	0,276	6,03	2,016	0,260	2,000	0,311	6,02	2,011	0,300	2,011	0,321	6,02	2,071	0,275	2,071
3	0,376	6,00	1,866	0,330	1,890	0,413	5,97	1,827	0,380	1,870	0,389	5,99	1,965	0,340	1,965
4	0,443	5,91	1,619	0,450	1,730	0,499	5,88	1,683	0,499	1,683	0,447	5,90	1,767	0,447	1,767
5	0,639	5,85	1,484	0,639	1,484	0,670	5,83	1,411	0,670	1,411	0,625	5,85	1,468	0,620	1,468
6	0,890	5,88	1,027	0,890	1,027	0,983	5,86	0,895	0,983	0,895	0,885	5,87	1,040	0,885	1,040
7	1,200	5,95	0,457	1,200	0,457	1,340	5,95	0,295	1,340	0,295	1,324	5,93	0,472	1,324	0,472
8	1,624	6,10	0,000	1,624	0,000	1,505	6,19	0,000	1,505	0,000	1,495	6,21	0,000	1,495	0,040
9	1,505	6,36	0,000	1,505	0,000	1,536	6,47	0,000	1,536	0,000	1,541	6,54	0,000	1,541	0,010
	W29 - Replicata 1					W29 - Replicata 2					W29 - Replicata 3				
Tempo (h)	MS (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	Linha MS (g/L)	Linha Gli (g/L)	MS (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	Linha MS (g/L)	Linha Gli (g/L)	MS (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	Linha MS (g/L)	Linha Gli (g/L)
0	0,157	5,99	2,253	0,157	2,253	0,137	6,00	2,241	0,137	2,241	0,115	5,98	2,433	0,115	2,433
1	0,155	5,98	2,273	0,160	2,253	0,161	5,97	2,107	0,161	2,180	0,134	5,98	2,166	0,134	2,166
2	0,195	5,97	2,292	0,180	2,230	0,183	5,97	2,097	0,183	2,090	0,151	5,97	1,987	0,151	1,987
3	0,228	5,96	2,139	0,220	2,150	0,223	5,94	2,001	0,223	2,000	0,177	5,97	1,832	0,177	1,832
4	0,285	5,95	1,941	0,285	1,950	0,296	5,95	1,859	0,296	1,859	0,226	5,95	1,806	0,226	1,806
5	0,378	5,94	1,047	0,378	1,700	0,404	5,94	1,814	0,404	1,650	0,293	5,95	1,708	0,293	1,740
6	0,509	5,93	1,618	0,509	1,350	0,546	5,93	1,398	0,546	1,398	0,405	5,93	1,525	0,405	1,525
7	0,696	5,92	1,725	0,696	0,850	0,707	5,90	1,046	0,707	1,046	0,568	5,92	1,239	0,568	1,130
8	0,906	5,90	0,167	0,906	0,167	0,911	5,88	0,581	0,911	0,581	0,768	5,92	0,544	0,768	0,600
9	1,092	5,91	0,000	1,092	0,000	1,118	6,01	0,040	1,118	0,040	0,981	5,91	0,514	0,981	0,200
10	1,199	6,32	0,000	1,199	0,000	1,211	6,48	0,000	1,211	0,000	1,110	6,03	0,000	1,110	0,000

**Tabela 25 - Dados experimentais para as cinéticas de crescimento de linhagens de *Y. lipolytica* realizadas em meio MDBU (2,5 g/L iniciais de glicerol), 30 °C e 200 rpm (continuação)**

Tempo (h)	CCT 5443 - Replicata 1					CCT 5443- Replicata 2					CCT 5443 - Replicata 3				
	MS (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	Linha MS (g/L)	Linha Gli (g/L)	MS (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	Linha MS (g/L)	Linha Gli (g/L)	MS (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	Linha MS (g/L)	Linha Gli (g/L)
0	0,197	5,93	2,089	0,197	2,089	0,129	5,94	2,059	0,129	2,100	0,177	5,93	1,894	0,177	1,900
1	0,150	5,91	2,038	0,198	2,038	0,149	5,92	1,968	0,149	2,070	0,192	5,89	1,938	0,190	1,894
2	0,210	5,92	1,831	0,220	1,900	0,185	5,87	1,897	0,185	2,000	0,238	5,86	2,117	0,220	1,840
3	0,296	5,90	1,640	0,296	1,670	0,237	5,89	1,886	0,237	1,890	0,291	5,88	1,707	0,280	1,720
4	0,609	5,96	1,286	0,450	1,380	0,348	5,88	1,288	0,320	1,720	0,414	5,86	1,508	0,380	1,540
5	0,647	5,86	1,007	0,647	1,000	0,444	5,87	1,411	0,444	1,500	0,525	5,84	1,325	0,525	1,280
6	0,853	5,85	0,431	0,830	0,450	0,611	5,85	1,186	0,611	1,180	0,715	5,83	0,920	0,715	0,850
7	0,876	6,09	0,000	0,890	0,000	0,724	5,83	0,613	0,724	0,613	0,852	5,78	0,237	0,852	0,300
8	0,885	6,45	0,000	0,885	0,000	0,809	5,86	0,000	0,809	0,000	0,876	6,12	0,000	0,920	0,000
9						0,875	6,29	0,000	0,875	0,000	0,933	6,38	0,000	0,933	0,000
Tempo (h)	CCT 7401 - Replicata 1					CCT 7401 - Replicata 2					CCT 7401 - Replicata 3				
	MS (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	Linha MS (g/L)	Linha Gli (g/L)	MS (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	Linha MS (g/L)	Linha Gli (g/L)	MS (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	Linha MS (g/L)	Linha Gli (g/L)
0	0,149	5,94	2,025	0,149	2,025	0,190	5,95	2,021	0,190	2,021	0,196	5,93	1,443	0,196	2,030
1	0,137	5,91	2,010	0,149	2,020	0,194	5,90	1,967	0,194	1,967	0,198	5,91	2,023	0,198	2,023
2	0,150	5,90	2,036	0,155	2,000	0,196	5,90	1,923	0,196	1,930	0,206	5,90	---	0,206	2,000
3	0,170	5,87	1,964	0,160	1,970	0,210	5,87	1,908	0,205	1,908	0,224	5,89	1,958	0,220	1,970
4	0,185	5,89	1,921	0,170	1,930	0,219	5,86	1,860	0,210	1,880	0,246	5,88	1,814	0,240	1,930
5	0,191	5,88	1,844	0,186	1,879	0,225	5,87	1,836	0,225	1,836	0,265	5,86	1,834	0,265	1,880
6	0,209	5,87	1,804	0,200	1,820	0,238	5,86	1,777	0,238	1,777	0,304	5,86	1,797	0,300	1,797
7	0,234	5,85	1,740	0,220	1,750	0,258	5,84	1,713	0,258	1,713	0,356	5,84	1,659	0,340	1,690
8	0,249	5,85	1,727	0,249	1,670	0,271	5,83	1,598	0,280	1,630	0,390	5,82	1,491	0,390	1,560
9	0,285	5,82	1,252	0,285	1,578	0,318	5,81	1,489	0,318	1,520	0,452	5,81	1,322	0,452	1,400
10	0,337	5,84	1,649	0,337	1,460	0,386	5,83	1,360	0,380	1,360	0,538	5,79	1,191	0,530	1,191
11	0,390	5,83	1,349	0,400	1,290	0,463	5,79	---	0,463	1,150	0,628	5,78	0,957	0,628	0,900
12	0,486	5,82	1,221	0,490	1,000	0,577	5,82	0,867	0,577	0,867	0,737	5,78	0,509	0,740	0,509

**Tabela 25 - Dados experimentais para as cinéticas de crescimento de linhagens de *Y. lipolytica* realizadas em meio MDBU (2,5 g/L iniciais de glicerol), 30 °C e 200 rpm (continuação)**

Tempo (h)	CCT 7401 - Replicata 1					CCT 7401 - Replicata 2					CCT 7401 - Replicata 3				
	MS (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	Linha MS (g/L)	Linha Gli (g/L)	MS (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	Linha MS (g/L)	Linha Gli (g/L)	MS (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	Linha MS (g/L)	Linha Gli (g/L)
13	0,611	5,8	0,000	0,611	0,000	0,722	5,73	0,467	0,722	0,467	0,856	5,85	0,000	0,856	0,000
14	0,731	5,78	0,000	0,731	0,000	0,835	5,75	0,000	0,835	0,000	0,907	6,41	0,000	0,907	0,000
15	0,839	5,77	0,000	0,839	0,000	0,866	6,30	0,000	0,866	0,000					

Onde: --- não detectado pelo equipamento

Fonte: elaborada pelo autor

**Tabela 26 - Dados experimentais para as cinéticas de crescimento de linhagens de *R. toulouides* realizadas em meio MDBU (2,5 g/L iniciais de glicerol), 30 °C e 200 rpm**

Tempo (h)	CCT 0783 - Replicata 1					CCT 0783 - Replicata 2					CCT 0783 - Replicata 3				
	MS (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	Linha MS (g/L)	Linha Gli (g/L)	MS (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	Linha MS (g/L)	Linha Gli (g/L)	MS (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	Linha MS (g/L)	Linha Gli (g/L)
0	0,157	6,10	2,316	0,157	2,316	0,147	6,07	2,264	0,147	2,400	0,144	6,06	2,401	0,144	2,401
1	0,162	6,15	2,254	0,162	2,280	0,164	6,14	2,299	0,164	2,390	0,187	6,14	2,266	0,170	2,266
2	0,176	6,21	2,244	0,176	2,250	0,181	6,20	2,364	0,181	2,364	0,196	6,20	2,248	0,190	2,248
3	0,190	6,30	2,201	0,190	2,220	0,199	6,29	2,290	0,199	2,320	0,209	6,30	2,247	0,205	2,247
4	0,205	6,38	2,106	0,205	2,190	0,215	6,38	2,211	0,215	2,275	0,224	6,48	2,191	0,224	2,230
5	0,220	6,47	2,138	0,220	2,150	0,231	6,49	2,214	0,231	2,220	0,246	6,48	2,192	0,246	2,192
6	0,233	6,56	2,045	0,240	2,110	0,246	6,56	2,126	0,246	2,170	0,270	6,59	2,106	0,270	2,150
7	0,258	6,64	2,055	0,258	2,070	0,265	6,65	2,060	0,265	2,120	0,294	6,67	2,093	0,294	2,093
8	0,284	6,73	2,012	0,277	2,020	0,294	6,75	2,057	0,294	2,070	0,316	6,73	2,067	0,316	2,040
9	0,297	6,81	1,955	0,297	1,980	0,316	6,82	1,836	0,316	2,020	0,335	6,84	1,989	0,335	1,989
10	0,314	6,91	1,934	0,320	1,934	0,336	6,93	1,938	0,336	1,960	0,353	6,94	1,932	0,360	1,945
11	0,343	6,98	1,859	0,343	1,880	0,361	7,00	1,892	0,361	1,892	0,384	7,02	1,885	0,384	1,890
12	0,355	7,07	1,757	0,370	1,830	0,376	7,12	1,787	0,388	1,820	0,395	7,12	1,851	0,415	1,851
13	0,395	7,16	1,769	0,395	1,780	0,412	7,18	1,686	0,412	1,750	0,443	7,20	1,790	0,443	1,790
14	0,405	7,25	1,737	0,405	1,737	0,422	7,32	1,755	0,422	1,700	0,450	7,32	1,706	0,450	1,706

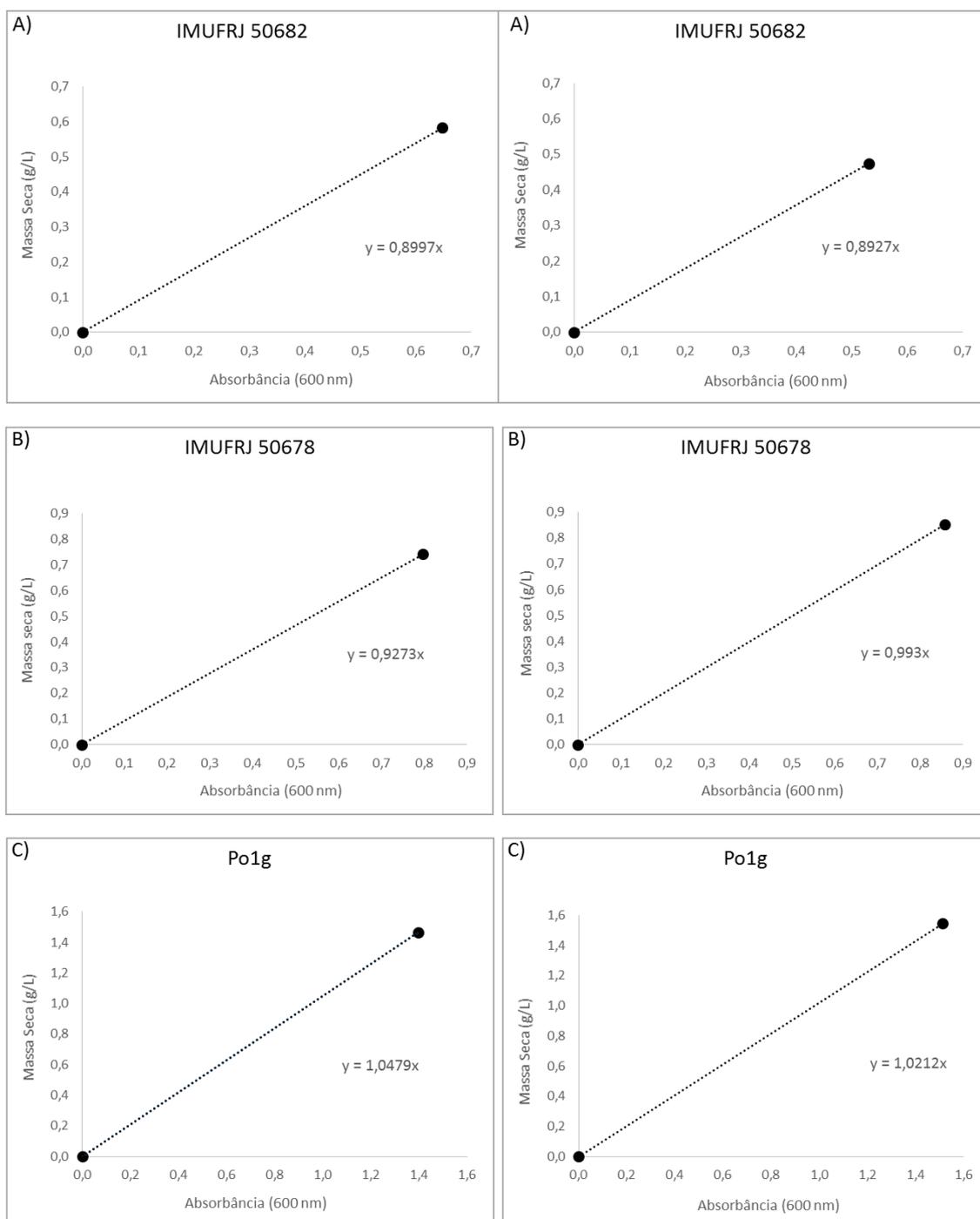
**Tabela 26 - Dados experimentais para as cinéticas de crescimento de linhagens de *R. toulouides* realizadas em meio MDBU (2,5 g/L iniciais de glicerol), 30 °C e 200 rpm (continuação)**

Tempo (h)	Rt 10 - Replicata 1					Rt 10 - Replicata 2					Rt 10 - Replicata 3				
	MS (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	Linha MS (g/L)	Linha Gli (g/L)	MS (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	Linha MS (g/L)	Linha Gli (g/L)	MS (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	Linha MS (g/L)	Linha Gli (g/L)
0	0,158	6,06	2,326	0,158	2,326	0,164	6,06	2,503	0,148	2,503	0,189	6,06	2,320	0,180	2,320
1	0,194	6,15	2,242	0,187	2,290	0,148	6,11	2,297	0,148	2,430	0,184	6,14	2,270	0,184	2,270
2	0,211	6,23	2,238	0,211	2,250	0,167	6,19	2,351	0,160	2,370	0,205	6,20	---	0,200	2,260
3	0,231	6,35	2,211	0,231	2,211	0,188	6,30	2,320	0,180	2,320	0,224	6,30	2,239	0,224	2,239
4	0,254	6,46	2,161	0,254	2,161	0,198	6,41	2,251	0,198	2,270	0,241	6,48	2,212	0,241	2,212
5	0,281	6,56	2,271	0,281	2,120	0,228	6,49	2,231	0,220	2,231	0,278	6,48	2,148	0,264	2,180
6	0,306	6,65	2,076	0,306	2,076	0,237	6,58	2,186	0,237	2,186	0,288	6,59	2,187	0,288	2,150
7	0,330	6,75	2,039	0,330	2,039	0,252	6,66	2,211	0,260	2,150	0,316	6,67	2,100	0,316	2,110
8	0,351	6,83	2,016	0,360	2,009	0,276	6,72	2,139	0,276	2,110	0,334	6,79	2,049	0,334	2,070
9	0,371	6,91	1,973	0,380	1,973	0,287	6,79	2,081	0,287	2,081	0,351	6,87	2,039	0,351	2,039
10	0,391	7,01	1,921	0,391	1,921	0,292	6,88	2,053	0,300	2,053	0,365	6,96	1,992	0,365	1,992
11	0,417	7,09	1,844	0,417	1,844	0,318	6,97	2,028	0,318	2,028	0,388	7,03	1,914	0,388	1,914

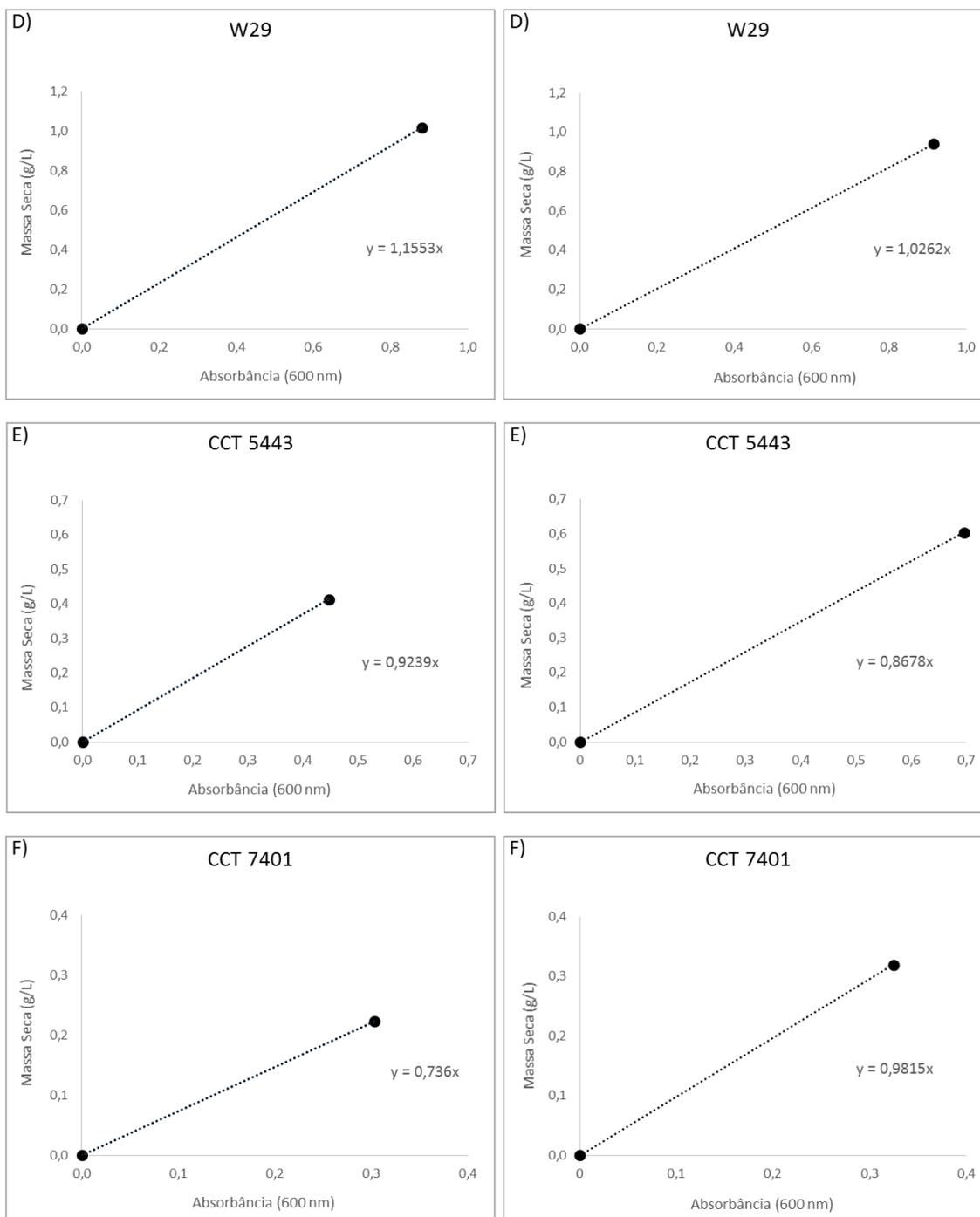
Onde: --- não detectado pelo equipamento

Fonte: elaborada pelo autor

**Figura 32 - Curvas de calibração para obtenção do fator de conversão de Abs<sub>600</sub> em massa seca (g/L), conforme detalhado no item 4.12.2 (Curva de calibração para conversão de absorvância em massa seca) de linhagens de *Y. lipolytica* cultivadas em meio MDBU (2,5 g/L iniciais de glicerol), a 30 °C e 200 rpm. A) IMUFRJ 50682. B) IMUFRJ 50678. C) Po1g. D) W29. E) CCT 5443. F) CCT 7401**

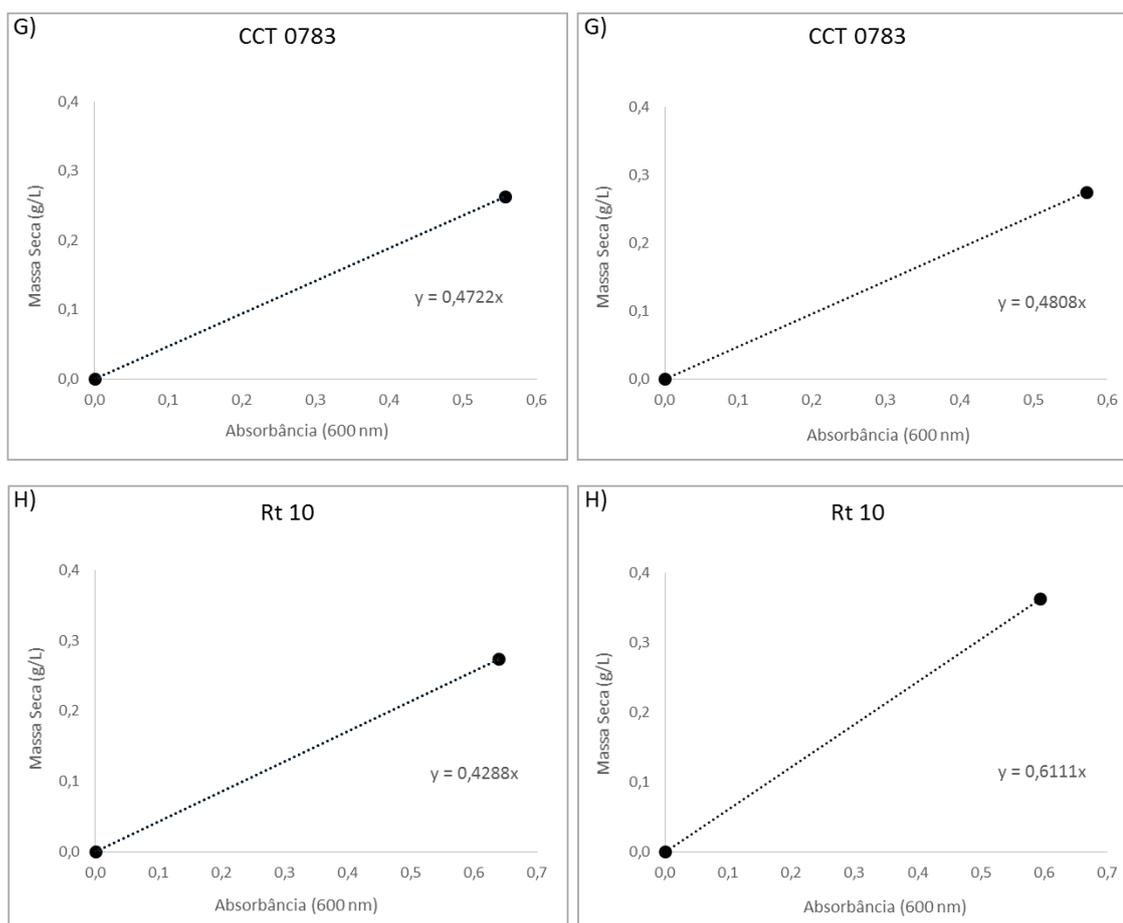


**Figura 32 - Curvas de calibração para obtenção do fator de conversão de Abs<sub>600</sub> em massa seca (g/L), conforme detalhado no item 4.12.2 (Curva de calibração para conversão de absorvância em massa seca) de linhagens de *Y. lipolytica* cultivadas em meio MDBU (2,5 g/L iniciais de glicerol), a 30 °C e 200 rpm. A) IMUFRJ 50682. B) IMUFRJ 50678. C) Po1g. D) W29. E) CCT 5443. F) CCT 7401 (continuação)**



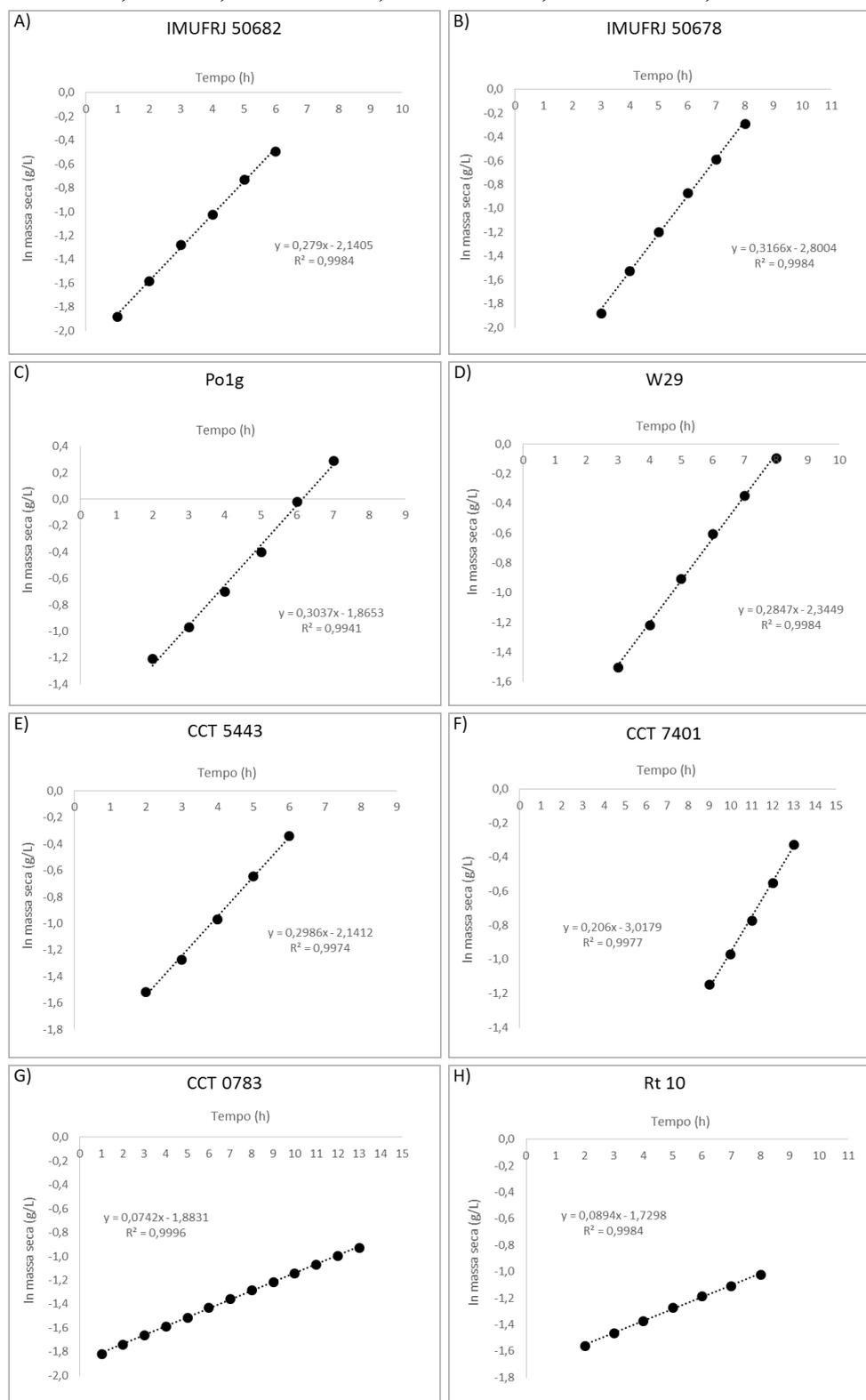
Fonte: elaborada pelo autor

**Figura 33 - Curvas de calibração para obtenção do fator de conversão de Abs<sub>600</sub> em massa seca (g/L), conforme detalhado no item 4.12.2 (Curva de calibração para conversão de absorvância em massa seca) de linhagens de *R. toruloides* cultivadas em meio MDBU (2,5 g/L iniciais de glicerol), a 30 °C e 200 rpm. G) CCT 0783. H) Rt 10**



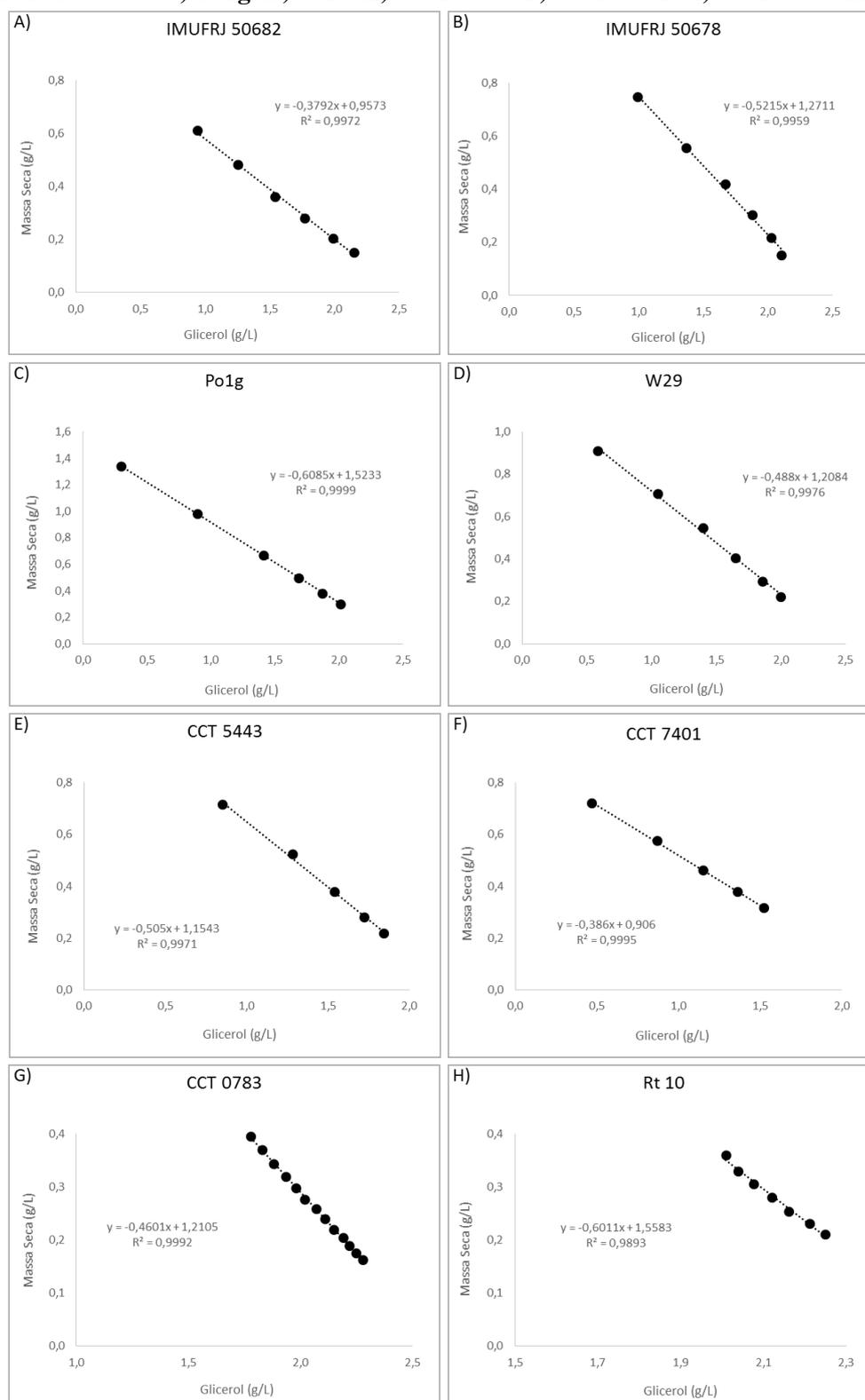
Fonte: elaborada pelo autor

**Figura 34 - Regressão linear, de uma replicata representativa, para obtenção da velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ), conforme detalhado no item 4.13.1 (Cálculo dos parâmetros fisiológicos) de linhagens de *Y. lipolytica* e *R. toruloides* cultivadas em meio MDBU (2,5 g/L iniciais de glicerol), a 30 °C e 200 rpm. A) IMUFRJ 50682. B) IMUFRJ 50678. C) Po1g. D) W29. E) CCT 5443. F) CCT 7401. G) CCT 0783. H) Rt 10**



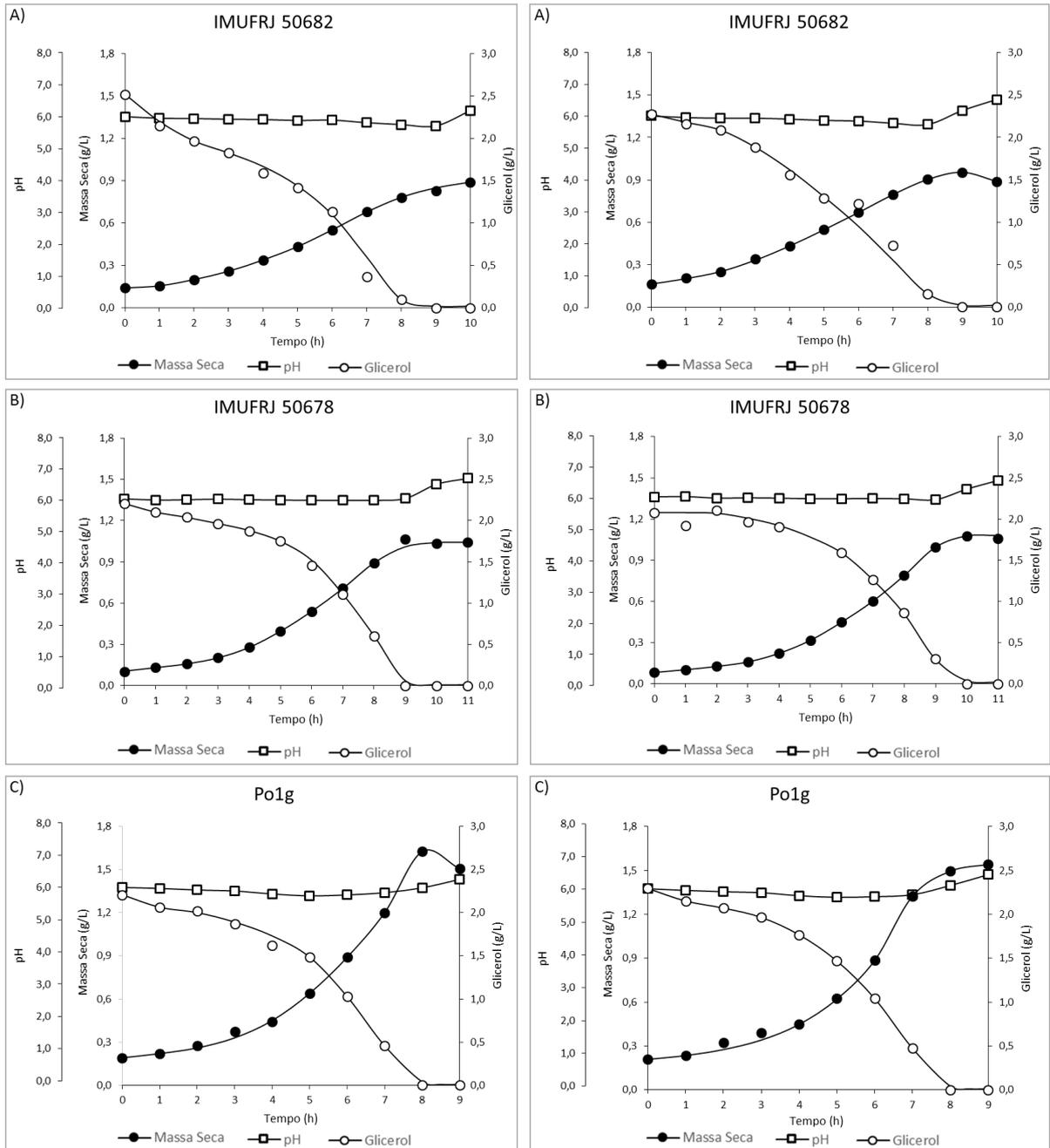
Fonte: elaborada pelo autor

**Figura 35 - Regressão linear, de uma replicata representativa, para obtenção do fator de conversão de substrato em biomassa na fase exponencial ( $Y_{X/S}^{exp}$ ), conforme detalhado no item 4.13.1 (Cálculo dos parâmetros fisiológicos) de linhagens de *Y. lipolytica* e *R. toruloides* cultivadas em meio MDBU (2,5 g/L iniciais de glicerol), a 30 °C e 200 rpm. A) IMUFRJ 50682. B) IMUFRJ 50678. C) Po1g. D) W29. E) CCT 5443. F) CCT 7401. G) CCT 0783. H) Rt 10**

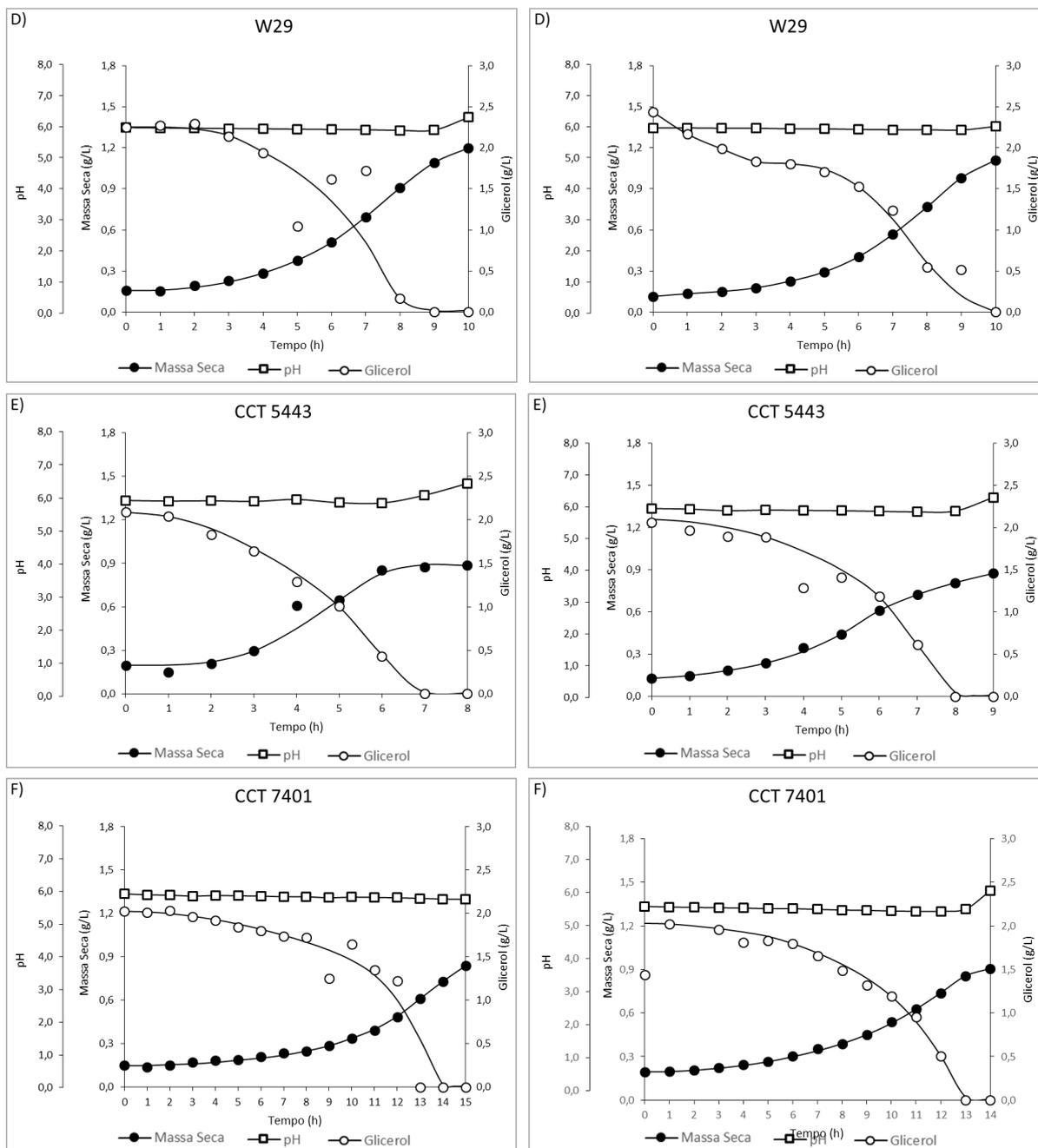


Fonte: elaborada pelo autor

**Figura 36 - Cinéticas de crescimento de linhagens de *Y. lipolytica* realizadas em meio MDBU (2,5 g/L iniciais de glicerol), a 30 °C e 200 rpm, conforme detalhado no item 4.7 (Cultivos para cinéticas de crescimento). A) IMUFRJ 50682. B) IMUFRJ 50678. C) Po1g. D) W29 E) CCT 5443. F) CCT 7401**

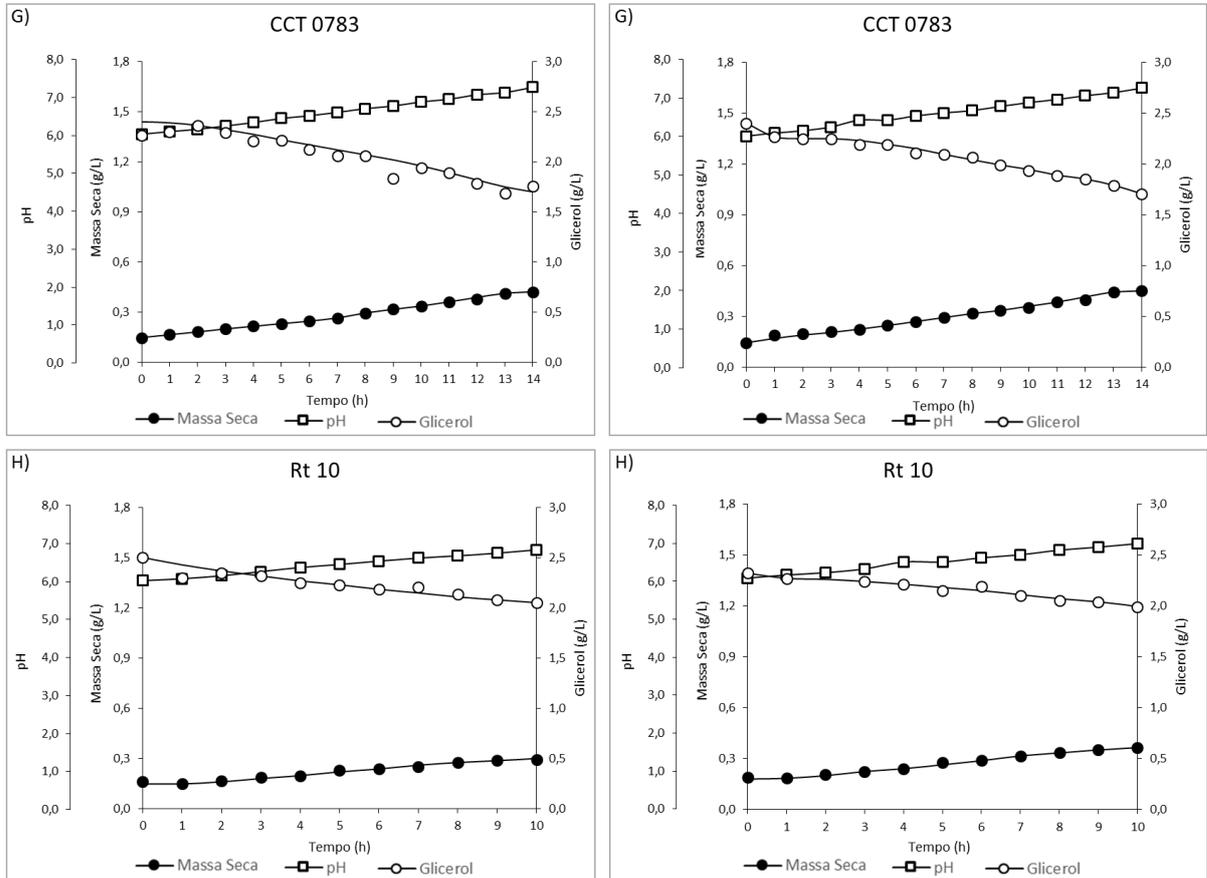


**Figura 36 – Cinéticas de crescimento de linhagens de *Y. lipolytica* realizadas em meio MDBU (2,5 g/L iniciais de glicerol), a 30 °C e 200 rpm, conforme detalhado no item 4.7 (Cultivos para cinéticas de crescimento). A) IMUFRJ 50682. B) IMUFRJ 50678. C) Po1g. D) W29 E) CCT 5443. F) CCT 7401 (continuação)**



Fonte: elaborada pelo autor

**Figura 37 - Cinéticas de crescimento de linhagens de *R. toruloides* realizadas em meio MDBU (2,5 g/L iniciais de glicerol), a 30 °C e 200 rpm, conforme detalhado no item 4.7 (Cultivos para cinéticas de crescimento). G) CCT 0783. H) Rt 10**



Fonte: elaborada pelo autor

Tabela 27 - Dados experimentais para cultivos de acúmulo de lipídeos para todas as linhagens estudadas

	<i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682					<i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50678				
Replicata	MS (g/L)	pH final	Glicerol residual(g/L)	Lip glip/L	% Lipídeos (m/m)	MS (g/L)	pH final	Glicerol residual(g/L)	Lip glip/L	% Lipídeos (m/m)
1	1,63	2,73	11,32	0,76	46,63	9,31	1,95	20,23	1,00	10,74
2	0,80	2,79	16,83	0,65	81,25	3,56	2,15	23,91	0,46	12,92
3	1,60	2,89	24,84	0,80	50,00	8,90	1,96	21,40	1,00	11,24
	<i>Y. lipolytica</i> Po1g					<i>Y. lipolytica</i> W29				
Replicata	MS (g/L)	pH final	Glicerol residual(g/L)	Lip glip/L	% Lipídeos (m/m)	MS (g/L)	pH final	Glicerol residual(g/L)	Lip glip/L	% Lipídeos (m/m)
1	8,10	2,39	12,00	1,41	17,41	10,42	1,95	17,55	1,74	16,70
2	3,10	4,22	38,70	0,83	26,77	10,86	1,91	17,84	1,68	15,47
3	7,28	2,43	12,25	1,43	19,64	10,51	1,90	17,88	1,73	16,46
	<i>Y. lipolytica</i> CCT 5443					<i>Y. lipolytica</i> CCT 7401				
Replicata	MS (g/L)	pH final	Glicerol residual(g/L)	Lip glip/L	% Lipídeos (m/m)	MS (g/L)	pH final	Glicerol residual(g/L)	Lip glip/L	% Lipídeos (m/m)
1	11,50	3,01	0,00	4,18	36,35	11,70	1,94	16,52	1,44	12,31
2	14,66	3,04	0,00	4,24	28,92	2,83	3,94	36,86	0,90	31,80
3	12,34	3,09	0,00	2,98	24,15	2,55	3,52	37,27	0,74	29,02
	<i>R. toruloides</i> CCT 0783					<i>R. toruloides</i> Rt 10				
Replicata	MS (g/L)	pH final	Glicerol residual(g/L)	Lip glip/L	% Lipídeos (m/m)	MS (g/L)	pH final	Glicerol residual(g/L)	Lip glip/L	% Lipídeos (m/m)
1	15,56	3,83	15,06	4,59	29,50	20,26	3,86	0,00	6,69	33,02
2	11,91	4,05	23,14	3,09	25,94	19,78	3,54	1,18	7,75	39,18
3	15,40	3,57	13,56	5,03	32,66	21,52	3,66	0,99	7,54	35,04

Fonte: elaborada pelo autor

**Tabela 28 - Resultados obtidos por diversos autores em cultivos com linhagens de *Y. lipolytica* ou *R. toruloides* (já descritos no item 5 Resultados e discussões)**

<b>Linhagem</b>	<b>Condições de cultivo</b>	<b>Parâmetros obtidos</b>	<b>Referência</b>
<i>Y. lipolytica</i> NRRL YB-423 (= CCT 7401)	Meio definido Fosfato de amônio dibásico 12,4 g/L Frasco agitado (batelada) 30 °C / 180 rpm Glicerol bruto 40 g/L	$\mu_{\text{máx}} = 0,18 \text{ h}^{-1}$	Santos et al. (2013)
	Meio complexo Sulfato de amônio 0,5 g/L Extrato de levedura 0,5 g/L Frasco agitado (batelada) 28 °C / 185 rpm		
	Glicerol puro 30 g/L	$\mu_{\text{máx}} = 0,25 \text{ h}^{-1}$	
	Glicerol bruto 30 g/L	$\mu_{\text{máx}} = 0,14 \text{ h}^{-1}$	
<i>Y. lipolytica</i> NRRL Y-1095 (= CCT 5443)	Meio complexo Sulfato de amônio 0,5 g/L Extrato de levedura 0,5 g/L Frasco agitado (batelada) 28 °C / 185 rpm		Santos et al. (2013)
	Glicerol puro 30 g/L	$\mu_{\text{máx}} = 0,13 \text{ h}^{-1}$	
	Glicerol bruto 30 g/L	$\mu_{\text{máx}} = 0,15 \text{ h}^{-1}$	
<i>Y. lipolytica</i> IBT 446	Meio definido Sulfato de amônio 5 g/L Biorreator (batelada) 30 °C / 600 rpm		Workman, Holt e Thykaer (2013)
	Glicose 20 g/L	$\mu_{\text{máx}} = 0,24 \text{ h}^{-1}$	
	Glicerol 20 g/L	$\mu_{\text{máx}} = 0,30 \text{ h}^{-1}$	
	Glicerol 45 g/L	$\mu_{\text{máx}} = 0,32 \text{ h}^{-1}$	
	Glicose e glicerol 10 g/L cada	$\mu_{\text{máx}} = 0,38 \text{ h}^{-1}$	

**Tabela 28 - Resultados obtidos por diversos autores em cultivos com linhagens de *Y. lipolytica* ou *R. toruloides* (já descritos no item 5 Resultados e discussões) (continuação)**

	Meio definido Ureia 3 g/L Frasco agitado (batelada) 28 °C / 200 rpm		
<i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682	Glicose 2,5 g/L	$\mu_{\text{máx}} = 0,35 \text{ h}^{-1}$ $Y_{X/S}^{\text{exp}} = 0,32 \text{ (g MS).(g S)}^{-1}$ $r_s = 1,10 \text{ (g S).(g MS. h)}^{-1}$	Oliveira (2014)
	Glicerol 2,5 g/L	$\mu_{\text{máx}} = 0,46 \text{ h}^{-1}$ $Y_{X/S}^{\text{exp}} = 0,48 \text{ (g MS).(g S)}^{-1}$ $r_s = 0,96 \text{ (g S).(g MS. h)}^{-1}$	
<i>Y. lipolytica</i> W29	Glicose 2,5 g/L	$\mu_{\text{máx}} = 0,27 \text{ h}^{-1}$ $Y_{X/S}^{\text{exp}} = 0,35 \text{ (g MS).(g S)}^{-1}$ $r_s = 0,76 \text{ (g S).(g MS. h)}^{-1}$	
	Glicerol 2,5 g/L	$\mu_{\text{máx}} = 0,36 \text{ h}^{-1}$ $Y_{X/S}^{\text{exp}} = 0,51 \text{ (g MS).(g S)}^{-1}$ $r_s = 0,71 \text{ (g S).(g MS. h)}^{-1}$	
<i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682	Meio definido Ureia 3 g/L		Bacciotti (2015)
	Frasco agitado (batelada) 28 °C / 250 rpm Glicerol 20,5 g/L	$\mu_{\text{máx}} = 0,36 \text{ h}^{-1}$ $Y_{X/S}^{\text{exp}} = 0,58 \text{ (g MS).(g S)}^{-1}$	
	Biorreator (batelada) Anti-espumante 28 °C / 100 rpm / 1 vvm Glicerol 5,1 g/L	$\mu_{\text{máx}} = 0,34 \text{ h}^{-1}$ $Y_{X/S}^{\text{exp}} = 0,55 \text{ (g MS).(g S)}^{-1}$	

**Tabela 28 - Resultados obtidos por diversos autores em cultivos com linhagens de *Y. lipolytica* ou *R. toruloides* (já descritos no item 5 Resultados e discussões) (continuação)**

<i>Y. lipolytica</i> W29	Meio definido Ureia 3 g/L		Bacciotti (2015)
	Frasco agitado (batelada) 28 °C / 250 rpm Glicerol 20,5 g/L	$\mu_{\text{máx}} = 0,34 \text{ h}^{-1}$ $Y_{X/S}^{\text{exp}} = 0,71 \text{ (g MS).(g S)}^{-1}$	
	Biorreator (batelada) Anti-espumante 28 °C / 100 rpm / 1 vvm Glicerol 5,1 g/L	$\mu_{\text{máx}} = 0,37 \text{ h}^{-1}$ $Y_{X/S}^{\text{exp}} = 0,59 \text{ (g MS).(g S)}^{-1}$	
<i>Y. lipolytica</i> LGAM S(7)1	Meio complexo Sulfato de amônio 0,5 g/L Extrato de levedura 0,5 g/L Frasco agitado (batelada) 28 °C / 185 rpm		Papanikolaou et al. (2002)
	Glicerol puro 32 g/L	$\mu_{\text{máx}} = 0,2 \text{ h}^{-1}$ $Y_{X/S} = 0,23 \text{ (g MS).(g S)}^{-1}$	
	Glicerol bruto 32 g/L	$\mu_{\text{máx}} = 0,2 \text{ h}^{-1}$ $Y_{X/S} = 0,24 \text{ (g MS).(g S)}^{-1}$	
<i>Y. lipolytica</i> ACA-DC 50109	Meio complexo Sulfato de amônio 0,5 g/L Extrato de levedura 0,5 g/L Frasco agitado (batelada) 28 °C Glicerol bruto 20,5 a 164 g/L	$\mu_{\text{máx}} = 0,16 \text{ a } 0,21 \text{ h}^{-1}$	Papanikolaou et al. (2008)

**Tabela 28 - Resultados obtidos por diversos autores em cultivos com linhagens de *Y. lipolytica* ou *R. toruloides* (já descritos no item 5 Resultados e discussões) (continuação)**

<i>Y. lipolytica</i> ACA-YC 5033	Meio complexo Extrato de levedura 0,5 g/L Frasco agitado (batelada) 28 °C / 180 rpm		André et al. (2009)
	Glicerol bruto 70 g/L	$\mu_{\text{máx}} = 0,14 \text{ h}^{-1}$	
	Glicerol bruto 90 g/L	$\mu_{\text{máx}} = 0,12 \text{ h}^{-1}$	
	Glicerol bruto 120 g/L	$\mu_{\text{máx}} = 0,06 \text{ h}^{-1}$	
<i>Y. lipolytica</i> S5, S6, S9, S10, S11, S12, S17 e S21	Meio complexo Extrato de levedura 1 g/L Bacto-peptona 0,75 g/L Biorreator (batelada) 30 °C / 550 rpm Glicerol puro 25 g/L	$Y_{X/S} = 0,28 \text{ a } 0,56 \text{ (g MS).(g S)}^{-1}$	Juszczuk et al. (2013)
<i>Y. lipolytica</i> LFMB 20	Meio complexo Extrato de levedura 0,5 g/L Biorreator (batelada) 28 °C / 180 rpm / 90 h Glicerol bruto 30 g/L	[X] = 8,2 g/L [Lip] = 0,61 g/L %Lip = 7,4% $Y_{Lip/S} = 0,024 \text{ g Lip/g S}$	André et al. (2009)
<i>Y. lipolytica</i> ACA-DC 50109	Meio complexo Extrato de levedura 0,5 g/L Sulfato de amônio 0,5 g/L Antifoam A (1,85 mL) Biorreator (batelada) 28 °C / Oxigênio dissolvido 30%		Makri, Fakas e Aggelis (2010)
	Glicerol puro 27,8 g/L	[X] = 4,68 g/L %Lip = 22,3% $Y_{Lip/S} = 0,08 \text{ g Lip/g S}$	
	Glicerol puro 104,9 g/L	[X] = 78,29 g/L %Lip = 20,41% $Y_{Lip/S} = 0,05 \text{ g Lip/g S}$	

**Tabela 28 - Resultados obtidos por diversos autores em cultivos com linhagens de *Y. lipolytica* ou *R. toruloides* (já descritos no item 5 Resultados e discussões) (continuação)**

<i>Y. lipolytica</i> QU21	Meio definido Sulfato de amônio 0,1% Frasco agitado (batelada) 28 °C / 150 rpm / 4 dias		Poli et al. (2014)
	Glicerol puro 100 g/L	[X] = 4,92 g/L [Lip] = 1,48 g/L %Lip = 30,1% $Y_{Lip/S} = 0,07$ g Lip/g S	
	Glicerol bruto 83 g/L	[X] = 6,7 g/L [Lip] = 1,27 g/L %Lip = 18,9% $Y_{Lip/S} = 0,06$ g Lip/g S	
<i>R. toruloides</i> CCT 0783	Meio complexo Extrato de levedura 2 g/L Sulfato de amônio 0,4 g/L Biorreator (batelada) 28 °C / 500 rpm / 1 vvm / 95 h Xilose 65 g/L Glicose 5 g/L	%Lip = 42%	Bonturi (2015)
<i>R. toruloides</i> DSMZ 4444	Meio complexo Extrato de levedura 0,5 g/L Sulfato de amônio 0,5 g/L Biorreator (batelada) Oxigênio dissolvido 50% Glicerol puro 75 g/L	$\mu_{m\acute{a}x} = 0,12$ h <sup>-1</sup> $Y_{Lip/S} = 0,27$ g Lip/g S $P_{Lip} = 0,06$ g Lip/L.h	Bommareddy et al. (2015)

**Tabela 28 - Resultados obtidos por diversos autores em cultivos com linhagens de *Y. lipolytica* ou *R. toruloides* (já descritos no item 5 Resultados e discussões) (continuação)**

	Meio complexo Peptona 0,75 g/L Extrato de levedura 0,5 g/L Frasco agitado (batelada) 28 °C / 180 rpm Glicerol bruto 30 g/L		
<i>Y. lipolytica</i> ACA YC 5029	22 h de cultivo	[X] = 3,1 g/L [Lip] = 0,28 g/L %Lip = 9,0%	Tchakouteu et al. (2015)
	95 h de cultivo	[X] = 5,5 g/L [Lip] = 0,21 g/L %Lip = 3,8%	
<i>Y. lipolytica</i> ACA YC 5033	26 h de cultivo	[X] = 4,1 g/L [Lip] = 0,86 g/L %Lip = 20,9%	
	190 h de cultivo	[X] = 6,1 g/L [Lip] = 0,27 g/L %Lip = 4,4%	
<i>R. toruloides</i> DSM 4444	168 h de cultivo	[X] = 8,9 g/L [Lip] = 2,22 g/L %Lip = 24,9%	
<i>R. toruloides</i> NRRL Y-27012	92 h de cultivo	[X] = 11 g/L [Lip] = 2,83 g/L %Lip = 25,7%	

**Tabela 28 - Resultados obtidos por diversos autores em cultivos com linhagens de *Y. lipolytica* ou *R. toruloides* (já descritos no item 5 Resultados e discussões) (continuação)**

<i>R. toruloides</i> Y4	Meio complexo 7g Sulfato de amônio 0,4 g/L Biorreator (batelada) 30 °C / 1200 rpm		Kiran, Trzcinski e Webb (2013)
	Glicerol puro 100 g/L Autolisado de farelo de colza (300 mg/L de N)	$\mu_{\text{máx}} = 0,085 \text{ h}^{-1}$	
	Glicerol puro 100 g/L Extrato de levedura	[X] = 35,3 g/L [Lip] = 16,2 g/L %Lip = 46% $Y_{\text{Lip/S}} = 0,26 \text{ g Lip/g S}$	
	Glicerol puro 200 g/L Extrato de levedura	[X] = 16,2 g/L [Lip] = 8,6 g/L %Lip = 53,1% $Y_{\text{Lip/S}} = 0,23 \text{ g Lip/g S}$	
	Glicerol puro 300 g/L Extrato de levedura	[X] = 4,0 g/L [Lip] = 2,0 g/L %Lip = 50,6% $Y_{\text{Lip/S}} = 0,16 \text{ g Lip/g S}$	
	Glicerol bruto 100 g/L Extrato de levedura	[X] = 19,3 g/L [Lip] = 8,9 g/L %Lip = 43% $Y_{\text{Lip/S}} = 0,08 \text{ g Lip/g S}$	

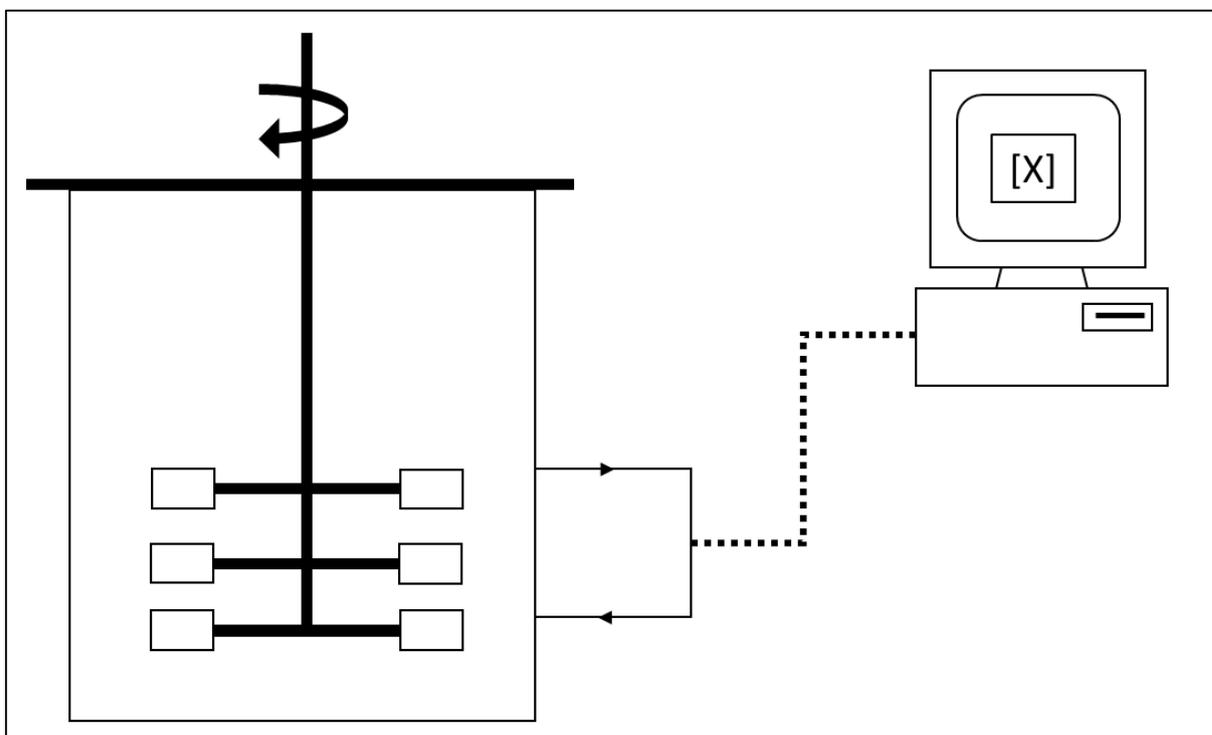
Parâmetros obtidos representam a concentração máxima alcançada ao longo do experimento ou concentração atingida no tempo de cultivo descrito

Onde: [X] concentração de biomassa; [Lip] concentração de lipídeos; %Lip porcentagem de lipídeos

Fonte: elaborada pela autora

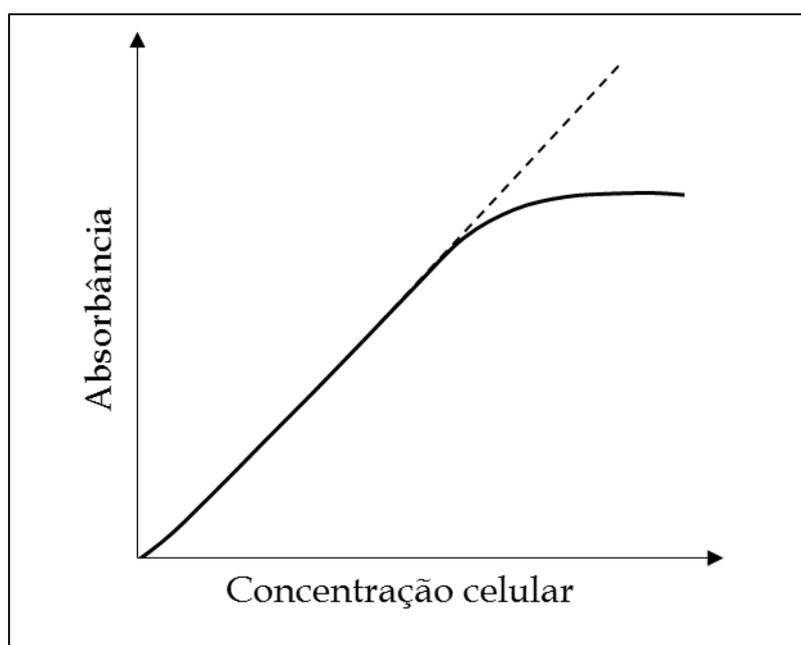
## ANEXOS

**Figura 38 - Desenho esquemático de um biorreator funcionando em modo batelada, equipado com amostrador automatizado e contínuo, tipo *loop*, para estimar a concentração celular *on line***



Fonte: elaborada pela autora

**Figura 39 - Gráfico genérico mostrando o desvio da linearidade ocorrido entre absorvância medida e a concentração celular**



Fonte: elaborada pela autora