PROGRAMA EQ-ANP

Processamento, Gestão e Meio Ambiente na Indústria do Petróleo e Gás Natural

Seleção de cepas de *Yarrowia lipolytica* para a produção de bio-óleo

Rodrigo Soares Lopes

Dissertação de Mestrado

Orientadores

Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc.
Etel Kameda, D.Sc.

Setembro de 2014

SELEÇÃO DE CEPAS DE *YARROWIA LIPOLYTICA* PARA A PRODUÇÃO DE BIO-ÓLEO

Rodrigo Soares Lopes

Dissertação submetida ao Corpo Docente do Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências

Aprovada por:

_____
Prof[a]. Maria Alice Zarur Coelho, D. Sc.
(orientador – presidente da banca)

_____
Etel Kameda, D.Sc.
(orientador)

_____
Ana Iraidy Santa Brígida, D.Sc.

_____
Marta Antunes Pereira Langone, D.Sc.

_____
Priscilla Filomena Fonseca Amaral, D.Sc.

Rio de Janeiro, R.J. – Brasil

Setembro de 2014

Lopes, Rodrigo Soares.

Seleção de Cepas de *Yarrowia lipolytica* para a Produção de Bio-Óleo / Rodrigo Soares Lopes. – Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2014.

60 p.

(Dissertação) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2014.

Orientadores: Maria Alice Zarur Coelho e Etel Kameda

1. *Yarrowia lipolytica*. 2. Bio-óleo 3. Leveduras oleaginosas 4. Tese. (Mestrado – UFRJ/EQ). 5. Maria Alice Zarur Coelho e Etel Kameda.

I. Título.

Dedico esta dissertação aos meus pais Antônio e Filomena e à Emanoele Araujo, pessoas que sempre estiveram ao meu lado, pelo carinho, apoio e motivação que foram e são imprescindíveis em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, por iluminar meu caminho e guiar minha vida, tornando possível a realização desse trabalho. Obrigado Senhor, por me conceder forças e motivação em todos os momentos difíceis.

Aos meus pais Antônio e Filomena por contribuírem diretamente na minha formação profissional e pessoal, por me proporcionarem um ambiente familiar de muito respeito, por terem incentivado e financiado meus estudos e me ensinado seus valores e princípios.

À Emanoele por me estar sempre ao meu lado e me motivar nos momentos que eu mais precisava.

À profa. Maria Alice e Etel Kameda pela orientação, paciência, conselhos, incentivo, apoio e pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Ao grupo BIOSE por todos os ensinamentos e por estarem sempre dispostos a ajudar.

À profa. Mônica Lomeli do laboratório de Bioquímica de Leveduras no CCS-UFRJ por disponibilizar o uso de equipamentos e reagentes fundamentais para execução dos experimentos.

A todos os professores e funcionários da Escola de Química, que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho.

Ao apoio financeiro da **Agência Nacional do Petróleo** – ANP – e da **Financiadora de Estudos e Projetos** – FINEP – por meio do Programa de Recursos Humanos da ANP para o Setor de Petróleo e Gás – PRH-ANP/MCT, em particular ao **PRH 13**, da Escola de Química - Processamento, Gestão e Meio Ambiente na Indústria do Petróleo e Gás Natural.

.

Resumo da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química/UFRJ como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Ciências, com ênfase na área de Petróleo e Gás Natural.

SELEÇÃO DE CEPAS DE *YARROWIA LIPOLYTICA* PARA A PRODUÇÃO DE BIO-ÓLEO

Rodrigo Soares Lopes
Agosto, 2014

Orientadores: Prof. Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc.
Etel Kameda, D.Sc.

Devido à alta demanda de energia no mundo industrializado e aos problemas ambientais é altamente recomendável o uso de biocombustível. Uma expansão significativa da indústria do biodiesel resultará na geração de grandes quantidades de glicerina bruta. Uma forma alternativa de reaproveitamento do glicerol pode ser a sua biotransformação a óleo microbiano. Como a estrutura e composição destes óleos são semelhantes aos óleos vegetais comuns, tais lipídeos podem contribuir para suprir a crescente demanda por óleo para produção de biodiesel. *Yarrowia lipolytica* é uma espécie de levedura capaz de acumular o óleo microbiano e já foi demonstrado que é possível utilizar glicerol como fonte de carbono. No presente trabalho foram avaliadas seis linhagens de *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682, IMUFRJ 50678, IMUFRJ 51670T, IMUFRJ52301, W29 e PO1g) para a seleção da que apresenta melhor desempenho na produção de lipídeos em meio contendo glicerina, extrato de levedura e sais inorgânicos (KH_2PO_4, Na_2HPO_4, $MgSO_4.7H_2O$, $CaCl_2.2H_2O$, $FeCl_3.6H_2O$, $ZnSO_4.7H_2O$ e $MnSO4.H_2O$). Tais micro-organismos foram crescidos em Erlenmeyer de 500 mL com 200 mL de meio de produção de óleo sob agitação de 250 rpm a 28ºC. Em todos os experimentos foram feitas amostragens diariamente até 240 horas para determinação da concentração celular, do índice de corpúsculo lipídico (ICL) e pH. A quantificação dos lipídeos acumulados foi feita através da sonda fluorimétrica Bodipy. Primeiramente foi realizado um experimento preliminar para verificar a possibilidade do uso dos sais inorgânicos em uma concentração cinco vezes menor em comparação com o meio de produção de lipídeos de referência. Verificou-se que os valores de ICL foram equivalentes nas duas configurações de sais. Posteriormente foi realizada a seleção de linhagens de *Yarrowia lipolytica*, constatando-se que a cepa W29 obteve a maior produção de lipídeos, atingindo um valor de 13648 de ICL em 192 horas. A cinética de produção de biomassa apresentou um perfil de crescimento celular semelhante para todas as cepas com o máximo de lipídeos na fase estacionária de crescimento. Em relação ao pH, constatou-se em todas as cepas uma queda no primeiro dia da fermentação e permaneceu praticamente constante até o final do experimento. Após selecionar a linhagem W29, um planejamento experimental de Plackett-Burman foi realizado para avaliar a influência dos sais inorgânicos do meio de produção de lipídeos no acúmulo lipídico e na produção de biomassa. $FeCl_3$ foi o único sal que não apresentou significância estatística e nenhum sal inorgânico foi significativo para resposta de biomassa. A glicerina bruta foi usada para se obter biomassa de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 substituindo a glicose como fonte de carbono. Após 72 horas de cultivo, foi possível gerar 5,3 g/L de biomassa.

Abstract of a Dissertation presented to Pos-Graduation Program in Chemical and Biochemical Process Technology - EQ/UFRJ as partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science with emphasis on Petroleum and Natural Gas.

SELECTION OF *YARROWIA LIPOLYTICA* STRAINS FOR BIO-OIL PRODUCTION

Rodrigo Soares Lopes
August, 2014

Supervisors: Prof. Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc.
Etel Kameda, D.Sc.

Due to high demand of energy in the industrialized world and the environmental problems caused by fossil fuels it is highly recommended the use of biofuel. A significant expansion of the biodiesel industry will result in the generation of large amounts of crude glycerine. An alternative way of recovering glycerol can be attributed to its biotransformation in microbial oil. By the structure and composition of these oils are similar to common vegetable oils, such lipids can contribute to cover the growing demand for oil for biodiesel production. *Yarrowia lipolytica* is a yeast species capable of accumulating microbial oil and it has been shown that it is possible to use glycerol as a carbon source for the culture. In this study six strains of *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682, IMUFRJ 50678, IMUFRJ 51670T, IMUFRJ52301, W29 e PO1g) were evaluated for selecting the most performing in the production of lipids in medium containing crude glycerin, yeast extract and inorganic salts (KH_2PO_4, Na_2HPO_4, $MgSO_4.7H_2O$, $CaCl_2.2H_2O$, $FeCl_3.6H_2O$, $ZnSO_4.7H_2O$ e $MnSO4.H_2O$). These microorganisms were grown in 500 mL Erlenmeyer flask with 200 mL of production oil medium under agitation of 250 rpm at 28ºC. In all assays, samples were taken daily up to 240 hours to determine cell concentration, lipid body index (LBI), and pH. Quantification of accumulated lipids was performed by fluorescence probe Bodipy. First, a preliminary experiment was conducted to verify the possibility of use a concentration of inorganic salts five times lower compared to the reference lipid production. It has been found LBI similar values in both configurations of salts. Afterwards, the selection of *Yarrowia lipolytica* strains was performed, finding that the W29 strain had the highest production of lipids, reaching a value of 13648.76 LBI in 192 hours. Kinetics of biomass production showed a similar cell growth profile for all strains with maximum lipids in the stationary phase growth. Regarding pH, it was observed for all strains a decrease on the fermentation first day and it remained almost constant until the end of the experiment. After selecting W29 strain, an experimental Plackett-Burman design was performed to evaluate the influence of inorganic salts in lipid accumulation and biomass production. $FeCl_3$ was the only salt that presented no statistically significant to lipid accumulation response, and no inorganic salt was significant to biomass response. Crude glycerin was used to obtain, *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 biomass by replacing glucose as carbon source. After 72 hours of cultivate, it was possible to generate 5.3 g/L of biomass.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO 1
II. OBJETIVOS 3
III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 4
III.1. BIODIESEL 4
III.2. GLICEROL 9
III.3. ÓLEOS MICROBIANOS COMO MATÉRIA PRIMA PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL ... 13
III.4. MICRO-ORGANISMOS OLEAGINOSOS 14
III.5. YARROWIA LIPOLYTICA 17
III.6. BIOQUÍMICA DO ACÚMULO DE LIPÍDEOS 20
III.6.1. Via de novo 20
III.6.2. Via ex novo 24
III.6.3. Degradação do lipídeo de reserva 26
IV. METODOLOGIA 28
IV.1. MATERIAIS 28
IV.2. EQUIPAMENTOS 29
IV.3. MICRO-ORGANISMOS E MANUTENÇÃO DAS CULTURAS 29
IV.4. PREPARO DO INÓCULO 30
IV.5. DETERMINAÇÃO DO pH 30
IV.6. DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR 30
IV.7. ANÁLISE DE ÍNDICE LIPÍDICO 31
IV.7.1. Fixação celular 31
IV.7.2. Determinação do Índice de Corpúsculo Lipídico (ICL), ... 32
IV.8. EXPERIMENTOS PRELIMINARES 34
IV.9. USO DA GLICERINA BRUTA NO INÓCULO 35
IV.10. SELEÇÃO DE CEPAS 36
IV.11. ESTUDO DA INFLUÊNCIA DOS SAIS DO MEIO DE CULTIVO NO ACÚMULO DE LIPÍDEOS 36
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO 39
V.1. EXPERIMENTOS PRELIMINARES. 39
V.2. SELEÇÃO DE CEPAS POTENCIALMENTE ACUMULADORAS DE LIPÍDEOS 39
V.3. USO DE GLICEROL COMO FONTE DE CARBONO NO MEIO DO PRÉ-INÓCULO 45
V.4. ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DOS SAIS DO MEIO DE PRODUÇÃO NA SÍNTESE DE LIPÍDEOS E DE BIOMASSA 46
VI. CONCLUSÕES 51
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 53

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela III. 1: Propriedades físico-química do glicerol. 10

Tabela III. 2: Sumário de alguns estudos realizados para a produção de vários metabólitos por *Yarrowia lipolytica* utilizando glicerol como fonte de carbono 19

Tabela IV. 1: Composição dos meios de cultivo de produção de lipídeos. 35

Tabela IV. 2: Matriz do planejamento Plackett-Burmann 37

Tabela IV. 3: Níveis codificados e reais das variáveis estudadas 37

Tabela V. 1: Produtividade do acúmulo de lipídeo nos pontos onde ocorre o máximo de ICL 42

Tabela V. 2: Matriz do delineamento Plackett-Burman com os valores codificados e respostas em ICL e biomassa. 47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura III. 1: Reação global..... Error! Bookmark not defined.
Figura III. 2: Reação de transesterificação envolvendo as três reações consecutivas e reversíveis de formação dos esteres..... 7
Figura III. 3: Estrutura do glicerol..... 9
Figura III. 4: Aplicações do glicerol no setor industrial..... 11
Figura III. 5: Corpúsculo lipídico em *Yarrowia lipolytica*...... 16
Figura III. 6: Etapas que conduzem à biossíntese "de novo" de lipídeos em micro-organismos oleaginosos que crescem sob condições limitadas no nitrogênio..... 22
Figura III. 7: Etapas do metabolismo de glicerol..... 23
Figura III. 8: Equação global da produção de ácido graxo...... 23
Figura III. 9: Formação de TAG intracelular através da via de acilação do α-glicerol fosfato..... 24

Figura IV. 1: Representação da recuperação de fluorescência. A fluorescência do BODIPY é inibida em solução pelo KI e recuperada quando as células são adicionadas. O BODIPY se junta ao corpúsculo lípidico no interior da célula, no qual o inibidor é excluido..... 32
Figura IV. 2: Esquematização do ensaio de quantificação de lipídeo pelo Índice de Corpúsculo Lipídico..... 33
Figura IV. 3: Exemplificação de como é obtido o ICL a partir do coeficiente angular da curva de fluorescência por concentração de células...... 34

Figura V. 1: Cinética do acumulo lipídico e do pH no meio de cultura (A) e produção de biomassa (B) da cepa de Y. lipolytica IMUFRJ 50682. As barras de erro correspondem ao desvio padrão da análise...... 40
Figura V. 2: Cinética do acumulo lipídico e do pH no meio de cultura (A) e produção de biomassa (B) da cepa de Y. lipolytica IMUFRJ 50678. As barras de erro correspondem ao desvio padrão da análise...... 40
Figura V. 3: Cinética do acumulo lipídico e do pH no meio de cultura (A) e produção de biomassa (B) da cepa *de Y. lipolytica* IMUFRJ 51670T. As barras de erro correspondem ao desvio padrão da análise...... 40
Figura V. 4: Cinética do acumulo lipídico e do pH no meio de cultura (A) e produção de biomassa (B) da cepa de Y. lipolytica IMUFRJ 52301. As barras de erro correspondem ao desvio padrão da análise...... 41
Figura V. 5: Cinética do acumulo lipídico e do pH no meio de cultura (A) e produção de biomassa (B) da cepa *de Y. lipolytica* W29. As barras de erro correspondem ao desvio padrão da análise...... 41
Figura V. 6: Cinética do acumulo lipídico e do pH no meio de cultura (A) e produção de biomassa (B) da cepa *de Y. lipolytica* Po1g. As barras de erro correspondem ao desvio padrão da análise...... 41
Figura V. 7: Cinética de produção de biomassa de *Y.lipolytica* IMUFRJ50682 crescidas ao utilizar glicerol bruto como fonte de carbono (2,04% p/v), extrato de levedura (1% p/v) e peptona (2% p/v)..... 45
Figura V. 8: Diagrama de Pareto dos efeitos dos fatores estudados sobre o ICL no experimento de delineamento experimental de Plackett-Burman...... 48
Figura V. 9: Diagrama de Pareto dos efeitos dos fatores estudados sobre a produção de biomassa no experimento de delineamento experimental de Plackett-Burman...... 50

I. INTRODUÇÃO

Em razão das limitações oriundas das fontes de energia fósseis e das crescentes preocupações ambientais, tem sido dada uma grande atenção, nos últimos anos, às fontes alternativas de energia. O desenvolvimento de energias alternativas é inevitável para o crescimento econômico sustentável na sociedade. Dessa forma, tem aumentado a demanda por biocombustíveis. Como exemplo, pode-se citar o etanol e o biodiesel produzidos a partir de matérias-primas renováveis, como a cana-de-açúcar, materiais lignocelulósicos, vegetais oleaginosos, gordura animal, dentre outras. A utilização destes permite uma redução das emissões de monóxido de carbono, quando comparados a combustíveis derivados do petróleo (LIN *et al.*, 2011).

O biodiesel é um combustível alternativo ao diesel de petróleo e é definido, principalmente, como éster metílico ou etílico de ácido graxo (abreviado como FAME ou FAEE, do inglês *fatty acid methyl ester* e *fatty acid ethyl ester*) resultado da transesterificação de óleos vegetais ou gordura animal com álcoois de cadeia curta na presença de um catalisador. Nesse processo, além do FAME, glicerol também é gerado como subproduto. O produto final obtido pode ser utilizado puro, ou misturado ao diesel em diferentes proporções e já vem sendo utilizado em muitos países como combustível para vários tipos de motores a diesel e óleo para aquecimento (SALVI e PANWAR, 2012).

O Brasil se destaca no panorama mundial do biodiesel devido à sua grande diversidade em grãos, de onde é extraído o óleo vegetal, e à criação de animais bovinos, que fornecem gordura animal. Até o ano de 2010, já havia sido realizada a substituição de todo diesel consumido no Brasil pelo B5 (composto de 5% de biodiesel e 95% de diesel). Estima-se que, até 2021, o B20 (composto de 20% de biodiesel e 80% de diesel) seja introduzido no mercado de combustíveis brasileiro (POUSA *et al.*, 2007).

Uma expansão significativa da indústria do biodiesel resultaria na geração de grandes quantidades de glicerol, sendo que para cada tonelada de biodiesel obtido, são gerados 100 Kg de glicerol, onde esse excedente provocaria efeitos adversos à economia do biodiesel (BOWKER *et al.*, 2008). Neste contexto, teme-se que o excesso de glicerol produzido possa ser descartado de maneira errada no meio ambiente (COSTA, 2008). Sendo assim, têm-se buscado alternativas para a utilização do excedente de glicerol, sendo a bioconversão de glicerol por via fermentativa uma alternativa que agrega valor à produtividade da indústria de biodiesel (SILVA *et al.*,

2009). Uma forma alternativa de valorização de glicerol pode ser através da sua utilização como fonte de energia para produção de óleo microbiano por micro-organismos oleaginosos (PAPANIKOLAOUS *et al.*, 2008).

Tais micro-organismos referidos como oleaginosos são aqueles capazes de armazenar grandes quantidades de lipídeos em corpúsculos intracelulares na forma de triacilgliceróis. Pela estrutura e composição desses óleos serem semelhantes aos de óleos vegetais comuns, tais lipídeos poderiam contribuir para cobrir a crescente demanda de óleos (RATLEDGE C, 2002).

A levedura *Yarrowia lipolytica* é uma das espécies de leveduras "não convencionais" mais estudadas devido a sua capacidade de gerar produtos de grande interesse industrial, e entre esses produtos destaca-se o lipídeo intracelular. Além disso, é possível a utilização de glicerol como fonte de carbono para o cultivo de tal levedura (PAPANIKOLAOUS *et al.*, 2002).

Visto o grande potencial desta levedura na produção de lipídeos e sua capacidade de utilizar glicerol como fonte de carbono, o presente estudo busca selecionar cepas de *Yarrowia lipolytica* que sejam boas produtoras de lipídeos intracelulares utilizando glicerol bruto no meio de cultivo, além de estudar a influência dos sais do meio de cultivo da cepa selecionada, permitindo assim a obtenção de um processo integrado de produção de biodiesel.

II. OBJETIVOS

O trabalho tem como objetivo selecionar cepa(s) de *Yarrowia lipolytica* que acumule(m) elevado teor lipídico ao utilizar glicerol bruto como fonte de carbono e de energia, bem como estudar a influência dos sais no meio de cultivo através de um planejamento experimental.

Os objetivos específicos foram:

1) Analisar a cinética de acúmulo de lipídeo e de produção de biomassa das seis cepas estudadas em frascos de Erlenmeyer agitados utilizando glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel como fonte de carbono.
2) Selecionar cepa(s) de *Yarrowia lipolytica* que seja(m) mais promissora(s) em relação ao acúmulo de lipídeo, utilizando uma técnica fluorimétrica de quantificação de lipídeos.
3) Testar a substituição da glicose do meio de cultivo YPD pelo glicerol bruto como fonte de carbono para produção do pré-inóculo.
4) Estudar a influência dos sais do meio de cultivo no acúmulo de óleo intracelular para a cepa selecionada através da ferramenta do planejamento experimental de Plackett–Burman.

III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

III.1. Biodiesel

A energia tem sido através da história a base do desenvolvimento das civilizações. É crescente a necessidade energética para a produção de alimentos, bens de consumo, serviços, produção, lazer e para promover os desenvolvimentos econômicos, sociais e culturais (SANTOS, 2008).

Contudo, estas fontes de energia são conhecidamente poluidoras e o constante aumento da demanda por fontes de energia, as mudanças climáticas causadas pelo aquecimento global e o esgotamento das reservas de petróleo de fácil extração, junto a um desenvolvimento socioeconômico intenso, principalmente nos países subdesenvolvidos, têm incentivado a utilização de compostos renováveis, que possam substituir, mesmo que parcialmente, os combustíveis de origem fóssil (FERRARI *et al.*, 2005).

Os atuais esforços a favor da redução da poluição ambiental e a crise energética têm estimulado a produção de biocombustíveis. A economia global tem mantido o seu crescimento e a demanda por energia limpa e recursos renováveis encontra-se em contínuo aumento. A utilização dos biocombustíveis, em geral apresenta vários benefícios (DEMIRBAS, 2007).

Neste contexto, os óleos vegetais e gorduras animais transesterificados aparecem como potencial alternativa para substituição do óleo diesel em motores de ignição por compressão, sendo o seu uso testado no final do século XX, produzindo resultados satisfatórios no próprio motor a diesel (PINTO *et al.*, 2005). O combustível obtido do processo de transesterificação dos óleos é denominado de biodiesel. Esta possibilidade de emprego de combustíveis de origem agrícola em motores de ciclo diesel é bastante atrativa tendo em vista ser uma fonte renovável de energia (HALIM *et al.*, 2011).

De acordo com a Resolução nº 7 de 19 de março de 2008 da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), o biodiesel é definido como um combustível composto de alquil-ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de óleo vegetal ou gordura animal conforme a especificação contida no Regulamento Técnico ANP nº. 42/2004, que integra a referida resolução (ANP, 2004). A Lei nº 11.097, publicada em 13 de janeiro de 2005, introduziu o biodiesel na matriz energética

brasileira e ampliou a competência administrativa da ANP e esta assumiu a atribuição de regular e fiscalizar as atividades relativas à produção, controle de qualidade, distribuição, revenda e comercialização do biodiesel e da mistura óleo diesel/biodiesel.

Economicamente, para que o biodiesel tenha um papel ativo no mercado de energia, sendo mais do que um aditivo, o mesmo precisa ser produzido em um custo mais baixo e atender às especificações brasileiras e internacionais (QUINTELLA *et al.*, 2009). Nesse caso, alguns aspectos importantes como o aumento da eficiência do processo de produção, uso de matérias-primas de baixo custo, desenvolvimento de um catalisador de custo efetivo e a utilização sustentável das terras na agricultura, devem ser considerados (LIN *et al.*, 2001).

O biodiesel é um combustível limpo, do ponto de vista ambiental, uma vez que é renovável e menos poluente. Quando queimado no motor a diesel, libera 50% menos material particulado e 98% menos enxofre que o diesel de petróleo, o que não provoca a emissão de (SO_2 e SO_3), poluentes danosos à qualidade do ar e responsáveis pela chamada chuva ácida. Devido às propriedades físico-químicas semelhantes ao diesel de petróleo, pode ser usado diretamente em motores convencionais, necessitando de mínimas modificações para operar. Também pode ser usado puro ou em mistura, uma vez que se mistura facilmente com o diesel de petróleo, tornando-se um aditivo e não requer armazenamento especial (ARANDA *et al.*, 2003).

O biodiesel é um combustível derivado de fontes renováveis como óleos vegetais e gorduras animais. No caso das fontes de óleos vegetais, existem diferentes espécies de oleaginosas no Brasil das quais se podem produzir o biodiesel, entre elas a mamona, dendê, girassol, babaçu, soja e algodão (MNE, 2007).

A principal tecnologia para obtenção de biodiesel é a transesterificação alcalina homogênea de óleos e gorduras. Nessa reação, óleos ou gorduras, que são compostos basicamente de tri-ésteres da glicerina com ácidos graxos, são misturados ao metanol ou etanol e na presença de um catalisador, fornece uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos e glicerina (SUAREZ *et al.*, 2009). A reação pode ser representada pela equação ilustrada na Figura III.1a.

A reação é reversível e por essa razão utiliza-se excesso de álcool para direcionar o equilíbrio da reação para o lado do produto. Na primeira etapa ocorre a conversão do triglicerídeo para diglicerídeo, seguido pela conversão do diglicerídeo para monoglicerídeo e do monoglicerídeo para glicerol, fornecendo uma molécula de

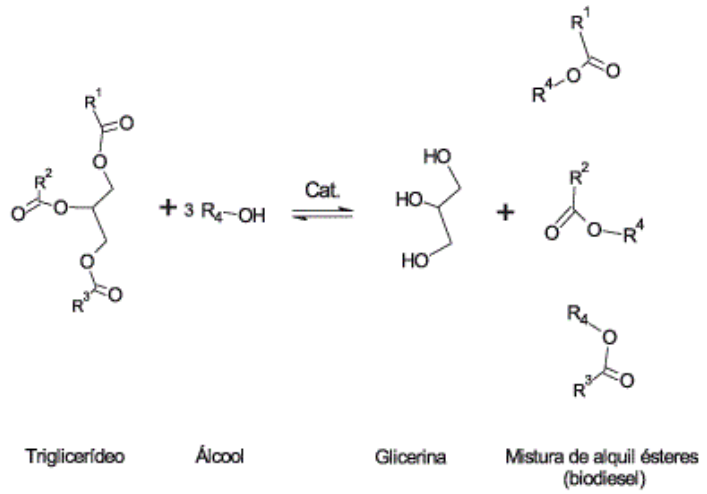
éster de cada glicerídeo a cada etapa (Figura III.1b) (GANASAN, RAJENDRAN, THANGAVELU, 2009)

A razão molar entre álcool e triglicerídeo é um dos parâmetros que mais afeta o rendimento de uma reação de transesterificação. Embora a razão molar estequiométrica seja 3:1, razões molares maiores normalmente são utilizadas a fim de promover melhores conversões em menor tempo. (BALAT, BALAT, 2008).

Quanto ao tipo de catalisador, o processo comercial mais utilizado para a produção do biodiesel é a transesterificação química que utiliza catalisadores alcalinos (hidróxido de sódio ou potássio) que apresentam custo relativamente baixo (AKOH *et al.*, 2007).

Após a reação de transesterificação que converte a matéria graxa em ésteres (biodiesel), a massa reacional final é constituída de duas fases, separáveis por decantação e/ou centrifugação. A fase mais pesada é composta de glicerina bruta, impregnada dos excessos utilizados de álcool, água e de impurezas inerentes à matéria-prima. A fase menos densa é constituída de uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos, conforme a natureza do álcool originalmente adotado, também impregnado de álcool e de impurezas (SBRT, 2007).

(a)



(b)

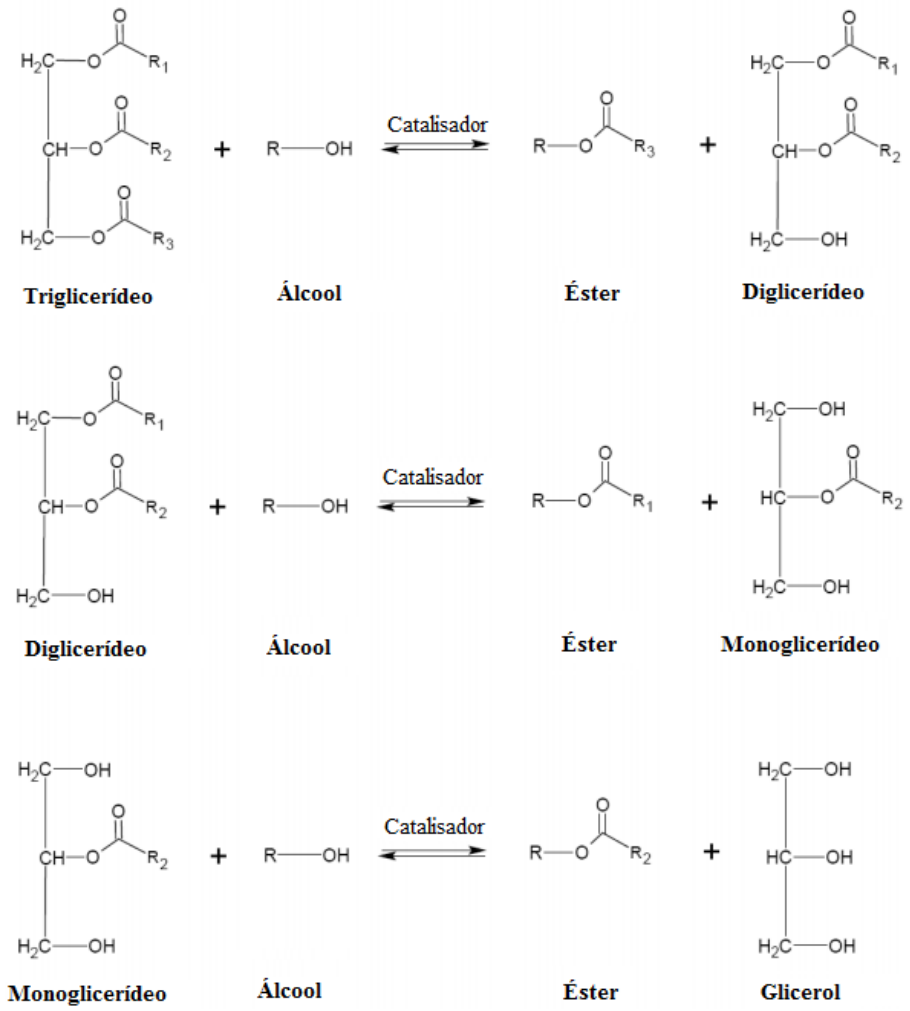


Figura III. 1: – (a) Reação global. (b) Reação de transesterificação envolvendo as três reações consecutivas e reversíveis de formação dos esteres.

A União Europeia é o maior produtor de biodiesel do mundo, produzindo cerca de 10,3 milhões de litros de biodiesel em 2013, e em termos de volume, representa cerca de 70% do total do mercado de biocombustíveis nos transportes. O governo garante incentivo fiscal aos produtores, além de promover leis específicas para o produto, visando melhoria das condições ambientais através da utilização de fontes de energia mais limpas. A tributação dos combustíveis de petróleo na Europa, inclusive do óleo diesel mineral, é extremamente alta, garantindo a competitividade do biodiesel no mercado. No mercado internacional, o biodiesel produzido tem sido usado em veículos de passeio, transporte de estrada e *off-road*, frotas cativas, transporte público e geração de eletricidade. O maior país produtor de biodiesel é a Alemanha, responsável por cerca de 42% da produção mundial. Sua produção é feita a partir da colza, produto utilizado principalmente para nitrogenação do solo. A extração do óleo gera farelo proteico destinado à ração animal. O óleo é distribuído de forma pura, isento de mistura ou aditivos, para a rede de abastecimento de combustíveis compostas por cerca de 700 postos (BIODIESELBR, 2010).

No Brasil, a produção e comercialização de biodiesel possuem importantes vantagens devido à grande disponibilidade de matéria-prima para sua obtenção e ao crescimento contínuo da indústria de óleos vegetais e etanol (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Segundo o boletim mensal de biodiesel de novembro de 2013, existem 67 plantas produtoras de biodiesel autorizadas pela ANP para operação no País, correspondendo a uma capacidade total autorizada de 22.619,06 m^3/dia. Destas 67 plantas, 65 possuem autorização para comercialização do biodiesel produzido, correspondendo a 21.715,04 m^3/dia de capacidade autorizada para comercialização. As matérias-primas utilizadas para a produção de biodiesel no Brasil compreendem principalmente, o óleo de soja com aproximadamente 70% da produção, seguido da gordura animal (22 %), óleo de algodão (2 %) e outros materiais graxos (3 %). De acordo com a resolução nº6 de 16 de setembro de 2009 (ANP, 2009), já está em uso desde janeiro de 2010 a adição de cinco por cento, em volume, de biodiesel ao óleo diesel, conhecido como B5. A Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) estimou que essa mistura trouxesse ao país uma economia da ordem de US$ 1,4 bilhão por ano devido à queda das importações de diesel e redução de 3% da emissão de dióxido de carbono (CO_2) em decorrência da queima do combustível no país (BIODIESELBR, 2010)

No entanto, com o aumento crescente da produção do biodiesel, existe uma grande preocupação com a problemática da assimilação da grande quantidade de glicerol pelo mercado mundial. Este cenário indica que a viabilização comercial do biodiesel passa pelo consumo deste volume extra de glicerol que está sendo gerado, buscando aplicações de larga escala e agregando valor à cadeia produtiva (ARRUDA, RODRIGUES e FELIPE, 2007), sendo de urgência encontrar formas alternativas para converter este substrato em produtos de valor agregado.

III.2. Glicerol

Glicerol é o nome comum do composto orgânico 1,2,3-propanotriol (Figura III.2), o qual está presente em diferentes espécies, incluindo protistas unicelulares e mamíferos. No entanto, é difícil encontrarmos o glicerol na sua forma "livre" nesses organismos, pois geralmente se encontra como um triglicerídeo combinado como, por exemplo, a ácidos graxos como os ácidos oleico, palmítico e esteárico(ARRUDA *et al.*, 2006).

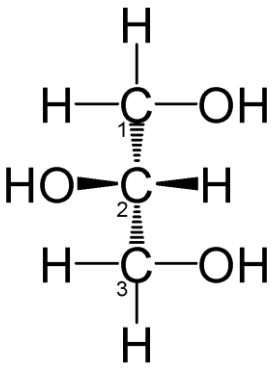


Figura III. 2: Estrutura do glicerol.

Dentre as características físico-químicas do glicerol (Tabela III.1) destacam-se as propriedades de ser um líquido oleoso, incolor, viscoso e de sabor doce, solúvel em água e álcool em todas as proporções e pouco solúvel em éter, acetato de etila e dioxano e insolúvel em hidrocarbonetos (LÓPES *et al.*, 1999).

Vários níveis e designações de glicerina estão disponíveis comercialmente. Eles diferem um pouco em seu conteúdo de glicerol e em outras características, tais como

cor, odor e impurezas. O termo glicerol aplica-se somente ao componente químico puro 1,2,3-propanotriol. O termo glicerina aplica-se aos produtos comerciais purificados, normalmente, contendo pelo menos 95% de glicerol. A chamada glicerina loira é normalmente utilizada para designar a glicerina oriunda dos processos de produção do biodiesel onde a fase glicerinosa sofreu um tratamento ácido para neutralização do catalisador e remoção de ácidos graxos eventualmente formados no processo. Em geral, esta glicerina contém cerca de 80% de glicerol, além de água, metanol e sais dissolvidos (MOTA *et al.*, 2009).

Tabela III. 1: Propriedades físico-química do glicerol (SIDS, 2002).

Propriedade	Valor/Expressão
Forma física	Líquido
Pureza	95-99,5%
Densidade (20°C)	1,26hg/m³
Viscosidade (20°C)	1410mPa
Ponto de fusão	18°C
Ponto de ebulição (1013 hPa)	290°C
Ponto de inflamação	160°C
Calor específico (25°C)	2,435 J/mol
Calor de evaporação 55°C	88,12 J/mol
Condutividade térmica	0,28W/(m.K)
Calor de formação	667,8 KJ/mol
Tensão superficial (20°C)	63,4mN/m
pH (Solução)	Neutra

Devido à combinação de propriedades físico-químicas como não toxicidade, ausência de cor e odor, o glicerol é uma substância com grande variedade de aplicações.

Na indústria de alimentos, o glicerol é utilizado como aditivo alimentar em função de suas propriedades estabilizantes, aintioxidantes sequestrantes, emulsificantes e umectantes (ARRUDA *et al.*, 2007). Como produto farmacêutico sua aplicação deve-se à sua alta viscosidade, o que permite a sua utilização em xaropes. Também, é considerado como um agente crioprotetor em micro-organismos, pois não permite a formação de cristais de gelo na célula, mantendo a estabilidade da parede celular e viabilidade da mesma durante o processo de congelamento para sua conservação. A Figura III.3 apresenta algumas das aplicações do glicerol em alguns setores industriais (ARRUDA, 2006).

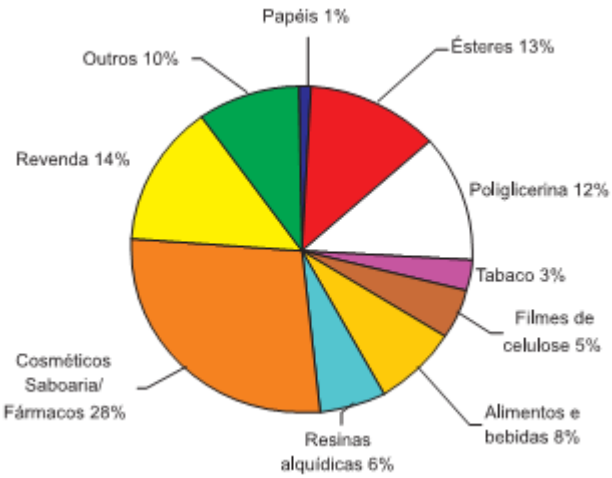


Figura III. 3: Aplicações do glicerol no setor industrial (ARRUDA *et al.*, 2007).

Este produto, em sua forma pura, como já foi descrito, possui inúmeras aplicações nas industriais farmacêuticas, alimentícias e cosméticas. No entanto, os resíduos de glicerol precisam de purificação adicional, a fim de ser utilizado em tais aplicações industriais. Segundo GLACONCHEMIE (2008), a introdução de diferentes etapas para a purificação e o custo tornam a sua utilização menos viável economicamente, visto que os custos de implantação de uma fábrica para purificação da glicerina bruta são maiores que os necessários para instalação da própria planta de produção do biodiesel. Além disso, o faturamento obtido com a purificação de todos os componentes presentes na glicerina bruta gera apenas de 10 a 15% do volume de negócios do biodiesel. Fábricas com capacidade de produção menor que 50.000 a 70.000 t/ano de biodiesel, em geral, não conseguem cobrir os custos de produção, investimento e capital com a venda da glicerina refinada.

No caso do biodiesel, dependendo da matéria-prima utilizada para sua produção, o resíduo de glicerol obtido tem vários compostos químicos considerados contaminantes que lhe conferem um baixo valor. Os contaminantes mais comuns são o metanol e o sabão, bem como os compostos de fósforo, potássio, cálcio, silício, sódio e zinco em quantidades diferentes, além de água, sais, ésteres, álcool e óleo residual (RYWINSKA *et al.*, 2012). Na tentativa de diminuir os futuros problemas derivados da acumulação de glicerol bruto e para tornar a produção de biodiesel mais competitiva, é necessário buscar alternativas para o uso desse resíduo gerado nesta produção (ABAD, 2012).

Uma das formas de valorização do glicerol é sua bioconversão a produtos de interesse industrial, aonde tem sido utilizado com sucesso como uma única fonte de carbono para a produção de alguns produtos de valor agregado por várias bactérias,

leveduras, fungos filamentosos e microalgas, sob condições aeróbicas e anaeróbicas. A substituição de uma fonte de carbono tradicional, como a glicose, para fontes menos onerosas tem um impacto positivo na economia do bioprocesso. A redução do custo dos meios de crescimento com o mínimo de efeitos indesejáveis é fundamental para uma potencial aplicação industrial. Neste cenário, o glicerol bruto como um subproduto industrial disponível em grandes quantidades parece ser uma utilização ideal (DA SILVA *et al.*, 2009).

Entretanto, o principal problema para a utilização de glicerol residual em processos fermentativos é a grande quantidade de sais de cloro presentes, oriundos da produção de biodiesel via catálise básica, o qual pode inibir o crescimento microbiano e diminuir a formação de produtos. Por outro lado, o glicerol residual contém elementos nutricionais como fósforo, magnésio, cálcio, enxofre, nitrogênio e sódio que são possíveis de serem utilizados pelos micro-organismos para o seu crescimento durante os processos fermentativos (ITO *et al.*, 2005).

A conversão microbiológica do glicerol a vários produtos e sua utilização como fonte de carbono para o crescimento microbiano, tem sido foco de diversos estudos. Atualmente a principal técnica de valorização biotecnológica de glicerol residual é sua biotransformação a 1, 3-propanodiol, um composto de grande importancia para a indústria têxtil e química. Além do propanodiol, o glicerol também tem sido utilizado como substrato para produção por micro-organismos de outros metabolitos de importância industrial, tais como enzimas, proteínas unicelulares, etanol, pigmentos, biossurfactantes, ácidos orgânicos e óleos pelos micro-organismos oleaginosos (PAPANIKOLAOU e AGGELIS, 2009).

III.3. Óleos microbianos como matéria prima para produção de biodiesel

A crescente demanda do biodiesel de 1ª geração (FAMEs decorrentes da transesterificação principalmente de óleos vegetais) leva à necessidade da descoberta de fontes não convencionais de óleos, que poderiam ser posteriormente convertidos em biodiesel. Os micro-organismos oleaginosos são considerados como potenciais candidatos para a produção deste lípideo que iria resultar na geração do chamado biodiesel de 2ª geração, produzidos a partir dos micro-organismos oleaginosos crescidos em resíduos agro-industriais, como lodo de esgoto, hidrolisados de hemiceluloses, glicerol residual, etc, ou o biodiesel de 3ª geração derivado de lipídeos produzidos por microalgas oleaginosas, com o carbono sendo obtido pelo seqüestro de CO_2 atmosférico (PAPANIKOLAOU e AGGELIS, 2011). Isso devido à necessidade de atender o rápido crescimento da produção de tal biocombustivel, e também por apresentar vantagens se comparado aos óleos vegetais (CHRISTOPHE *et al.* 2012).

Nesse contexto, alguns problemas vêm sendo relatados quanto à utilização de fontes oleaginosas para a síntese de biodiesel. Um dos gargalos identificados é o uso do solo para a agroindústria das oleaginosas de modo a atender a demanda interna e de exportação de biocombustíveis, além de competir com a indústria de alimentos para culturas oleaginosas. O outro é referente ao consumo de água doce, que já começa a preocupar, tendo em vista o desequilíbrio do ciclo hidrológico, sendo consumidas centenas de litros de água para cada quilo de grão de culturas oleaginosas (BRANDINI, 2011).

Além disso, um grande revés na comercialização do biodiesel é o seu alto custo de produção comparado com o diesel convencional, representando 60 a 95% do custo global do combustível se a matéria-prima é composta de óleos vegetais. É esperado que os óleos microbianos sejam economicamente rentáveis como matéria prima para a produção de biodiesel se forem obtidos a partir de substratos a base de resíduos com baixo ou nenhum valor agregado (CHRISTOPHE *et al.*, 2012).

Assim, a busca de outras matérias-primas tem se intensificado e evoluído muito nos últimos anos. Portanto, é necessário explorar novas matérias-primas que (1) entregue benefícios ambientais superiores em comparação aos materiais fossilizados, (2) sejam economicamente competitivas, (3) possam ser produzidas em quantidades suficientes para atender às demandas de energia, (4) proporcionem um ganho líquido de energia sobre as fontes de energia utilizadas para produzi-lo, e (5) não compitam com a

produção alimentar. O óleo microbiano se encaixa nesses requisitos e, portanto, muita atenção tem sido dada para a exploração de óleos microbianos.

Os micro-organismos têm algumas vantagens sobre os vegetais para produção de lipídeos, tais como ciclos de vida curtos, menor demanda no espaço, independência de sazonalidade e clima, facilidade de escalonamento, além de não necessitar de terra arável e não competir com a produção de alimentos (SUBRAMANIAM *et al.*, 2010).

III.4. Micro-organismos oleaginosos

Todos os micro-organismos sintetizam lipídeos para as funções essenciais de suas estruturas membranosas. No entanto, alguns deles podem acumular e armazenar mais de 20% do seu peso seco em lipídeos, sendo chamados de "organismos oleaginosos". Sob determinadas condições de cultivo, este valor pode aumentar até 70% da sua biomassa (RATLEDGE e WYNN, 2002).

Os micro-organismos oleaginosos (leveduras, bolores, e algas) são considerados como potenciais candidatos para a produção de lipídeos que iria resultar na chamada segunda geração de biodiesel. Especificamente as leveduras oleaginosas, com a sua forma unicelular, são considerados como os mais adequados organismos que têm sido utilizados como ferramentas na compreensão de vários fenómenos da bioquímica lipídica (PAPANIKOLAOU e AGGELIS, 2011).

Uma grande variedade de substratos tem sido utilizada como fonte de carbono para os micro-organismos oleaginosos, tais como açúcares ou resíduos enriquecidos em açúcar, polissacarídeos, N-acetilglucosamina, hidrolisados de vários produtos ou subprodutos, óleos vegetais, ácidos graxos livres, subprodutos ou resíduos graxos, n-alcanos, etanol, glicerol e ácidos orgânicos (PAPANIKOLAOU e AGGELIS, 2011).

A ocorrência de lipídeos, como compostos de reserva, é difundida entre vários organismos, como em fungos, plantas e animais, e bactérias. A capacidade de acumulação de lipídeos é determinada pela constituição genética, sendo que os teores máximos de lipídeos atingíveis podem variar enormemente entre espécies e até entre cepas individuais. De acordo com diferentes micro-organismos e condições de cultura (tais como temperatura, pH, tempo de cultura, etc), o conteúdo e a composição do óleo são variáveis (ROSSI *et al.*, 2011).

Entre os micro-organismos heterotróficos, as leveduras, sendo unicelulares, desprovidas de endotoxinas, passíveis de melhoramento genético e apropriadas para fermentação em larga escala, são particularmente atraentes para o desenvolvimento de abordagens biotecnológicas (BEOPOULOS, NICAUD e GAILLARDIN, 2011).

As espécies de leveduras oleaginosas mais conhecidas incluem os gêneros de *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Rhizopus*, *Trichosporon* e *Yarrowia*. Em média estas leveduras acumulam 40% lipídeos em sua biomassa, entretanto em condições de limitação de nutrientes, elas podem acumular até 70% de lipídeos. No entanto, o conteúdo e perfil lipídico diferem entre espécies. *Yarrowia lipolytica* acumula lipídeos para os níveis mais baixos do que outras espécies de oleaginosas, mas é a única levedura conhecida por ser capaz de acumular uma porcentagem elevada de ácido linoleico (BEOPOULOS *et al.*, 2009).

Os lipídeos microbianos são compostos principalmente de triacilgliceróis (TAGs), mas também podem ser encontrados ácidos graxos livres, outros lipídeos neutros (tais como monoacilgliceróis, diacilgliceróis), esteróis e frações polares (por exemplo, fosfolipídeos, esfingolipídeos, glicolipídeos) (FAKAS *et al.*, 2009).

A formação de lipídeos começa durante a fase exponencial tardia e continua durante a fase estacionária (RASCHKE e KNORR, 2009). O mesmo se inicia quando um elemento do meio torna-se limitante e a fonte de carbono está presente em excesso. Muitos elementos podem induzir acúmulo de lipídeos. A limitação de nitrogênio é geralmente utilizada nos estudos de acumulação de lipídeos em micro-organismos, sendo a condição mais fácil de controlar e é geralmente o tipo mais eficiente de limitação para induzir a acumulação de lipídeos em micro-organismos. Durante a fase de crescimento, o fluxo de carbono é distribuído entre os quatro *pools* macromoleculares (polissacarídeos, lipídeos, ácidos nucleicos e proteínas). O nitrogênio é essencial para a síntese de proteína e de ácido nucleico que são necessários para a proliferação celular. No entanto, em condições de limitação de nitrogênio, a taxa de crescimento diminui rapidamente, ao passo que a taxa de assimilação de carbono diminui de forma mais gradual. Isto resulta na canalização preferencial do fluxo de carbono para a síntese de lipídeos (RYWINSKA *et al.*, 2012).

As moléculas de armazenamento se acumulam em um compartimento especializado da célula conhecido como corpúsculos lipídicos (CL) (Figura III.4). Tais compartimentos consistem de um núcleo lipídico envolto em uma monocamada de

fosfolipídios, dentro das quais muitas proteínas com diversas atividades bioquímicas são incorporadas. Várias destas proteínas metabolizam lipídeos e, portanto, o CL provavelmente desempenha um papel fundamental não só no armazenamento de lipídeos, mas também na biossíntese, no metabolismo e na degradação de lipídeos. A formação e a função do CL estão intimamente ligadas à síntese de TAG e de esteril ésteres (ZWEYTICK *et al.*, 2000)

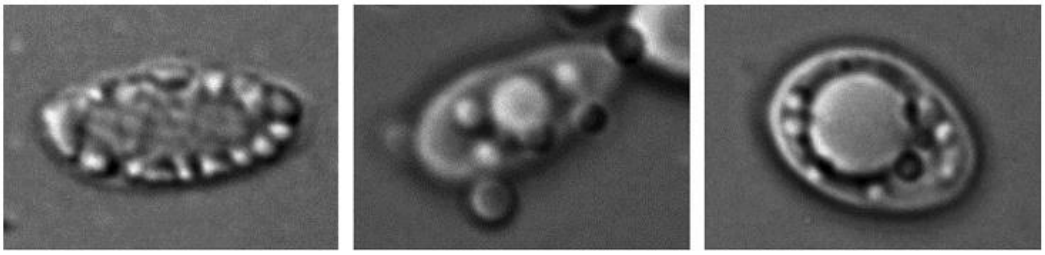


Figura III. 4: Corpúsculo lipídico em *Yarrowia lipolytica* (FICKERS., *et al.*, 2005).

Se micro-organismos não oleaginosos são colocados no mesmo meio de limitação de nutrientes, a proliferação celular também tende cessar, e é mantido o fluxo de carbono para a célula, mas, neste caso, o carbono é convertido em vários polissacarídeos, incluindo glicogênio, glucanas e mananas. Isso é devido à ausência do aporte enzimático responsável pelo acúmulo de lipídeo (BEOPOULOS *et al.*, 2009).

Durante a transição entre a fase de crescimento (produção de biomassa) e a fase de acúmulo de lipídeos (diminuição da taxa de crescimento, devido à limitação de nutrientes e ao desvio do excesso de carbono para a produção de lipídeos), algumas vias são reprimidas (síntese de ácido nucleico e proteínas), ao passo que outras são induzidas (síntese de ácidos graxos e triglicerídeos). Além disso, durante a fase de acumulação, precursores (acetil-CoA, malonil-CoA e glicerol) e energia (ATP, NADPH) são necessários para a síntese de lípidos (RATLEDGE, 2002).

III.5. Yarrowia lipolytica

A levedura *Yarrowia lipolytica*, espécie utilizada no estudo, é uma das leveduras "não convencionais" mais estudadas, que atualmente é usada como modelo para o estudo de diversas áreas como acumulação de lipídeos, secreção de proteínas, biogênese de peroxissomos, dimorfismo, degradação de substratos hidrofóbicos, etc (FICKERS, 2004).

É um micro-organismo considerado não-patogênico. A maioria das cepas é incapaz de crescer acima de 32°C, é estritamente aeróbio, eucariótico, do reino Fungi, sendo taxonomicamente pertencente à classe dos Hemiascomicetos e à família *Dipodascacea*, e é normalmente isolada de ambientes ricos em substratos hidrofóbicos incluindo alcanos, óleos, gorduras e ácidos graxos. É possível de ser isolada a partir de produtos ricos em lipídeos e proteínas, tais como queijos e salsichas. A levedura *Yarrowia lipolytica* é uma das espécies predominantes em queijos Camembert, sendo frequentemente encontrado em concentrações superiores a 10^6-10^7 UFC. Tal levedura também pode ser isolada do solo, esgotos e ambientes poluídos. Esta ocorrência de *Yarrowia lipolytica* correlaciona-se aos mecanismos sofisticados desenvolvidos para o uso de tais substratos hidrofóbicos como fonte de carbono através de suas atividades extracelulares lipolíticas e proteolíticas, e também com o seu forte crescimento a 5-10ºC (BARTH e GAILLARDIN, 1997 e FICKERS, 2004).

O sequenciamento do seu genoma revelou que o organismo está distantemente relacionado com a convencional levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que particularmente, apresenta uma ampliação de famílias de proteínas e genes envolvidos na utilização dos substratos hidrofóbicos (COELHO *et al.*, 2010).

A maioria dos isolados são haplóides, ainda que diplóides estáveis também existam, podendo ser induzidas a formar ascos. Na natureza, as leveduras crescem como uma mistura de gemulação, pseudo-hifas e hifas septadas verdadeiras. A transição dimórfica da forma de levedura para hifas (ou vice versa) pode ser facilmente induzida *in vitro* através da modificação de pH e temperatura, fonte de carbono e de nitrogênio ou na presença de compostos específicos em meios de cultura (RYWINSKA, 2012).

O genoma de *Yarrowia lipolytica* foi sequenciado há onze anos e as características incomuns mais importantes deste genoma são: o tamanho (20,5 Mbps, o dobro do tamanho do genoma de *S. cerevisiae*), relativamente elevado teor de G+C (49%), estrutura atípica dos centrómeros cromossomiais e origens de replicação, um elevado

número de genes de RNAt, 6449 genes codificadores de proteínas (uma ORF por 3 kpb), e 1083 íntrons (RYWINSKA, 2013).

Previamente, algumas nomeações foram dadas à atualmente conhecida *Yarrowia lipolytica*, como por exemplo, *Candida lipolytica, Endomycopsis lipolytica e Saccharomycopsis lipolytica*. Ela tem sido o único táxon conhecido no gênero *Yarrowia*, mas recentemente algumas espécies de *Candida*, incluindo *Candida deformans, Candida galli* e *Candida yakushimensis* foram propostos como novos membros do clado *Yarrowia* (KURTZMAN, 2005). Além disso, a cariotipagem e análises de RAPD-PCR revelam uma variabilidade significativa do genoma de cepas de *Yarrowia lipolytica* provenientes de diferentes regiões geográficas (NAUMOVA, 2010).

Essa levedura é diferente dos modelos celulares mais estudados – *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* (consideradas leveduras "convencionais") – em relação à fisiologia, genética e biologia molecular e, portanto, pertence ao grupo das leveduras "não-convencionais", sendo a espécie mais estudada desse grupo devido a sua capacidade de gerar produtos de grande interesse industrial como lipases, aromas, ácidos orgânicos, proteínas e óleos microbianos (PAPANIKOLAOU *et al.*, 2002). Alguns estudos demonstrando a importância da levedura *Yarrowia lipolytica* na síntese de produtos industriais ao utilizar glicerol como fonte de carbono estão descritos na Tabela III.2.

Tabela III. 2: Sumário de alguns estudos realizados para a produção de vários metabólitos por *Yarrowia lipolytica* utilizando glicerol como fonte de carbono (RYWINSKA, 2013)

Substrato	Produto	Referência
Glicerol puro	Ácido alfa-cetoglutárico	YU *et al.* (2012)
	Ácido cítrico e invertase	LAZAR *et al*. (2011)
	Ácido pirúvico	MORGUNOV *et al.* (2004)
	Ácido succínico	YUZBASHEV *et al.* (2010)
	α-Amilase	CHANG *et al.* (1997)
	Lipase	LEE *et al.* (2007)
	Biosurfactante	FONTES *et al.* (2010)
Glicerol residual	Ácido cítrico	RYWINSKA *et al.* (2010)
	Ácido cítrico e Eritritol	RIMOWICS *et al.* (2010)
	Eritritol	RIMOWICS *et al.* (2009)
	Manitol	TOMASZEWSKA *et al.* (2012)
	Manitol e Ácido acético	CHATZIFRAGKOU *et al.* (2011)
	Ácido graxo poliinsaturado	SCOTT *et al.* (2011)
	Lipídeos	PAPANICOLAOU *et al.* (2002)
	Biomassa	TACCARI *et al.* (2012)

O primeiro interesse por esta levedura foi observado no final da década de 1960, devido à sua capacidade de utilizar n-parafina como fonte de carbono para a produção de proteínas celulares (*single-cell protein*), assim como ácido cítrico e ácido 2-cetoglutárico. Isto resultou em um amplo conhecimento de seu cultivo em fermentadores de grande escala (RYWINSKA, 2013) (FICKERS, 2004). A levedura *Yarrowia lipolytica* foi classificada como “Geralmente Reconhecido como Seguro” para a produção de ácido cítrico pela Agencia Norte-Americana de Medicamentos e Produtos Alimentares (COELHO *et al.*, 2010).

Yarrowia lipolytica também é conhecida como uma espécie secretora de enzimas. As estirpes pertencentes a essa espécie secretam principalmente proteases, lipases e RNases. Os genes que codificam proteínas secretadas contribuíram para desenvolver ferramentas da engenharia genética. Mais de 40 proteínas de diferentes origens foram expressas com sucesso. Nos últimos anos, as expressões bem sucedidas dos seguintes genes exógenos foram relatadas: tirosinase, epóxido hidrolase, esterase termoestável e invertase (CASAREGOLA *et al.*, 2000).

Em relação à produção de lipídeos pela levedura, em alguns casos, em vez de acumular de lipídeos ou simultaneamente a isso, *Yarrowia lipolytica* também pode secretar ácido cítrico para o meio de cultura. É interessante notar que muitas

publicações confirmaram que o aumento da produção de ácido cítrico por cepas da levedura ocorre apenas em meios limitados em nitrogênio nos quais o pH é superior a 4,5 (RYWINSKA, 2013).

Em um estudo realizado por MAKRI *et al.* (2010) foram identificados 3 fases distintas do metabolismo de *Y. lipolytica* crescida em meio contendo glicerol como fonte de carbono: produção de biomassa, fase lipogênica e produção de ácido cítrico.

Sob condições limitadas de nitrogênio em meio utilizando glicerol, os lipídeos da levedura *Yarrowia lipolytica* foram representados principalmente por ácidos oléico, linoléico, palmítico e ácido palmitoléico (MAKRI *et al.*, 2010).

III.6. Bioquímica do acúmulo de lipídeos

Os lipídeos podem ser acumulados através de duas vias diferentes: (1) síntese "de novo", envolvendo a produção, em condições definidas, de precursores de ácidos graxos, como o acetil e malonil-CoA e sua integração na via biossintética de armazenamento de lipídeos quando os micro-organismos são crescidos em meios que contenham fonte de carbono não hidrofóbicos e (2) a via de acumulação "ex novo", envolvendo a absorção de ácidos graxos, óleos e triacilgliceróis (TAG) a partir do meio de cultura e a sua acumulação na forma inalterada ou modificada dentro da célula. Esta via exige a hidrólise do substrato hidrofóbico (HS), o transporte dos ácidos graxos liberados dentro da célula, a sua re-montagem em TAG e frações de esteril éster (SE) e sua acumulação dentro do CL (BEOPOULOS *et al.*, 2009).

III.6.1. Via de novo

O acúmulo de lipídeos celulares "de novo" é um processo bioquímico anabólico em que, em virtude da série de reações de β-oxidação, o acetil-CoA produzido pelo metabolismo celular intermediário, gera ácidos graxos. Os ácidos graxos são então esterificados com glicerol gerando lipídios estruturais (fosfolipídios, esfingolipídios, etc) e de reserva (principalmente TAGs). Com a exceção de celulose e metanol, um número elevado de fontes de carbono tem sido considerado como substratos para a biossíntese "de novo" de lipídeo a partir de micro-organismos oleaginosos. Meios à

base de açúcares simples, como glicose e frutose, lactose, sacarose, soro de leite, melaço, além do glicerol, têm sido utilizados. Além disso, a utilização de substratos à base de açúcares complexos em comparação com a glicose tais como polissacarídeos (amido e pectina) tem sido estudada. Embora os substratos acima sejam metabolizados da mesma forma, em alguns casos, a composição de ácidos graxos produzidos apresentam diferenças notáveis.

Em uma série de investigações, foi demonstrado que os micro-organismos oleaginosos não possuem um sistema hiperativo de biossíntese de ácidos graxos, mas são capazes de produzir em quantidades significativas, acetil-CoA, a unidade básica da biossíntese de ácido graxo. Assim, a bioquímica da síntese de novo de lipídeos, pode ser dividida em duas partes distintas: o metabolismo celular intermediário e a biossíntese de TAG.

O micro-organismo oleaginoso começa a acumular lipídeo quando um componente do meio de cultivo, como o nitrogênio, torna-se limitante. O mesmo irá provocar uma rápida diminuição na concentração da adenosina mono fosfato (AMP), em virtude da AMP desaminase que é ativada pela exaustão de tal componente no meio. Tal reação irá gerar inosina monofostato (IMP) e amônio. O amônio irá servir como fonte de nitrogênio complementar, necessário para a síntese de material celular depois da limitação extracelular de nitrogênio.

A diminuição excessiva da concentração da AMP altera a função do ciclo de Krebs, uma vez que a enzima isocitrato desidrogenase, que é responsável pela transformação do ácido isocítrico em ácido α-cetoglutarato, perderá sua atividade, pois a mesma é ativada alostericamente pelo AMP intracelular.

Com a inativação da enzima isocitrato desidrogenase, irá haver o bloqueio do ciclo de Krebs no nível do isocitrato, proporcionando o seu acúmulo na mitocôndria. Este ácido é encontrado em equilíbrio com o citrato (reação catalisada pela isocitrato aconitase). Quando a concentração intramitocondrial de ácido cítrico alcança valores críticos, o citrato entra no citoplasma em troca com o malato, mediado pelo ciclo citrato/malato.

Esta reação providencia grandes quantidades de acetil-CoA para a síntese de acido graxo. O acetil-CoA é fornecido pela clivagem do citrato vindo da mitocôndria pela ATP citrato liase (ATP-CL), enzima chave para o processo de acúmulo de lipídeo,

formando o acetil-CoA e oxalacetato. A ATP-CL é um complexo enzimático que é considerado o fator mais importante a ter em conta a produção de lipídeos dos vários micro-organismos, estando ausente nas células microbianas não oleaginosas (RATLEDGE, 1988).

O produto líquido da ação de ATP-CL, portanto, é o acetil-CoA, que vai ser adicionalmente convertido em ácidos graxos intracelulares. Se complexo enzimático ATP-CL não existe, a exaustão de nitrogênio leva no acúmulo de ácido cítrico no interior do citoplasma. Neste caso, o ácido cítrico será excretado para o meio de cultura ou irá provocar a inibição da 6-fosfofrutoquinase, tendo como resultado a acumulação intracelular de polissacarídeos. Devido à semelhança bioquímica significativa entre a acumulação intracelular "de novo" de lipídeos e a secreção extracelular e na produção de ácido cítrico, nos últimos anos, as leveduras foram divididas e classificadas por vários autores como sendo acumuladoras de lipídeo ou produtoras de ácido cítrico. A série de reações descritas acima pode ser resumida da seguinte forma:

Figura III. 5: Etapas que conduzem à biossíntese "de novo" de lipídeos em micro-organismos oleaginosos que crescem sob condições limitadas no nitrogênio (DAVIES e HOLDSWORTH 1992, adaptado)

No caso da utilização de glicerol como fonte de carbono, o mesmo passa pela célula microbiana por difusão facilitada e é assimilado por fosforilação, no qual as

enzimas glicerol quinase e NAD^+ glicerol 3-fosfato desidrogenase são implicadas na sua metabolização, gerando diidroxiacetona 3-fosfato que entrará na via de Embden, Meyerhof and Parnas (EMP) e formará o piruvato (MAKRI, FAKAS e AGGELIS, 2010) (Figura III.6).

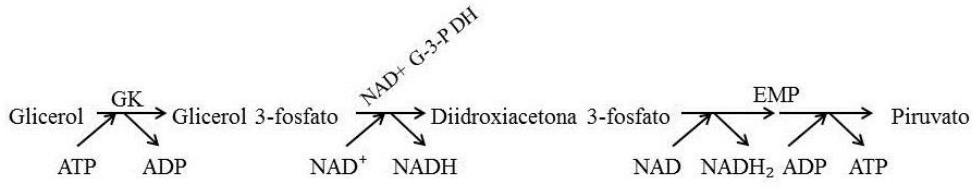


Figura III. 6: Etapas do metabolismo de glicerol

Além de acetil-CoA, a síntese do ácido graxo livre requer um suprimento contínuo de malonil-CoA e NADPH. O malonil-CoA pode ser gerado pela enzima acetil-CoA carboxilase, que irá atuar sobre a molécula de ácido cítrico. Em leveduras, tal enzima sofre ativação alostérica em função da concentração do citrato. O NADPH é requerido para a função da enzima ácido graxo sintase (AGS). Pensa-se que a concentração de NADPH é controlada pela atividade da enzima málica, gerando NAPH a partir de malato e NADP+. Após a geração de malonil-CoA e NAPDH, a biossíntese de ácidos graxos é realizada com o auxílio do complexo multi-enzimático ácido graxo sintetase (AGS). A síntese de ácido graxo livre pode ser resumida pela utilização do acetil-CoA como a unidade biossintética inicial (ou *primer*) e do malonil-CoA como a unidade de alongamento, através do fornecimento de dois átomos de carbono em cada etapa de formação. A série reacional pode ser resumida da seguinte forma (DAVIES e HOLDSWORTH, 1992):

$$\text{Acetil-CoA}+7\text{malonil-CoA}+14\text{NADPH} \longrightarrow \text{Ácido palmítico}+7CO_2+14\text{NADP}+8\text{CoASH}+6H_2O$$

Figura III. 7: Equação global da produção de ácido graxo.

Nesta via metabólica, os ácidos graxos livres gerados, são ativados pela coenzima A e são, subsequentemente, usados para a acilação do esqueleto de glicerol para sintetizar os TAGs. Na primeira etapa de montagem dos TAGs, glicerol-3-fosfato

(G-3-P), oriundo do glicerol pela ação da enzima glicerol quinase, é acilado por G-3-P aciltranferase (GAT) na posição sn-1, para se obter 1-acil-G-3-P (ácido lisofosfatídico - LPA), o qual é então adicionalmente acilado pelo ácido lisofosfatídico aciltransferase (também chamada 1-acil-G-3-P-aciltransferase - AGAT) na posição sn-2, para se obter o ácido fosfatídico (PA). A via é seguida pela desfosforilação de PA pelo ácido fosfatídico fosfoidrolase (PAP) para liberar diacilglicerol (DAG). Na etapa final, o DAG é acilado, ou por uma via dependente de acil-CoA (aonde o terceiro grupo acil é fornecido pelo acil-CoA através da enzima diacilglicerol aciltransferase) ou por uma via independente de acil-CoA (sendo fornecido por glicerolfosfolipídios pela diacilglicerol aciltransferase) para produzir os TAGs (PAPANIKOLAOU e AGGELIS, 2011; BEOPOULOS *et al.*, 2009; CHRISTOPHE *et al.*, 2012; ROSSI *et al.*, 2011).

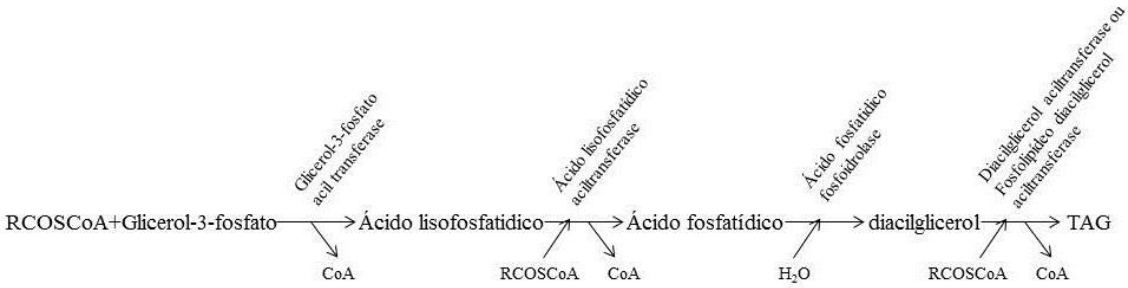


Figura III. 8: Formação de TAG intracelular através da via de acilação do α-glicerol fosfato (RATLEDGE, 1997).

III.6.2. Via ex novo

Um número limitado de leveduras são registadas por serem capazes de crescer em substratos hidrofóbicos (SH) e ao mesmo tempo acumular quantidades significativas de lipídeos. Estas leveduras pertencem aos gêneros *Torulopsis* (*T. versatilis*, *Torulopsis* sp.), *Candida* (*C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *Yarrowia* (C.) *lipolytica*), *Trichosporon*, *Geortichum* e às espécies *Pichia methanolica*, *Apiotrichum curvatun* e *Rhodosporidium toruloides* (PAPANIKOLAOU e AGGELIS, 2011).

O catabolismo dos SH, tais como alcanos e triglicerídeos, é um metabolismo complexo que envolve várias vias metabólicas que ocorrem em diferentes compartimentos celulares. O micro-organismo *Yarrowia lipolytica* tem sido utilizado

como um sistema modelo para estudar os mecanismos envolvidos na degradação de SH. Tal levedura desenvolveu estratégias elaboradas e mecanismos de adaptação para o uso eficiente de tais compostos, possuindo várias famílias multigênicas que atuam nesse metabolismo. Essa adaptação foi dada pelo: (1) desenvolvimento de genes que codificam agentes tensoativos para a solubilização dos substratos; (2) modificação da superfície celular pela formação de protuberâncias, que parecem estar ligadas ao aumento da característica apolar da parede celular e que facilitam a aderência das gotas hidrofóbicas, maximizando assim o contato célula-substrato; (3) pelo desenvolvimento de mecanismos de transporte complexos para a incorporação destes compostos na célula e (4) pela produção de várias lipases (extracelulares, ligados à membrana e intracelulares) que vão realizar a hidrolise do SH em ácidos graxos livres e glicerol (FICKERS., *et al.*, 2005).

Os ácidos graxos liberados pela atividade lipolítica devem então ser transportados para dentro da célula. Em concentrações mais elevadas, os mesmos são difundidos livremente pela membrana, porém em menores quantidades é necessário o auxílio de um transportador transmembranar (KOHLWEIN e PALTAUF, 1984).

No caso dos alcanos, apesar de muitos esforços, os princípios básicos de sua entrada na célula ainda não foram elucidados. A maioria dos resultados apoia a ideia de que a absorção de alcanos por células de levedura é um processo de difusão passiva, o qual é facilitado pelas propriedades hidrofóbicas especiais e estruturas da célula de levedura. Estas observações levaram à hipótese de que os alcanos ligados às protuberâncias na superfície da levedura devem migrar por meio de canais através da membrana plasmática para o retículo endoplasmático (ER), aonde lá será oxidado em ácidos graxos (FICKERS, *et al.*, 2005).

Logo, o metabolismo dos SH é finalizado quando os ácidos graxos interiorizados são degradados no peroxissomo pela via da beta-oxidação, gerando acetil-CoA que irá ser incorporado no ciclo de Krebs ou ainda no ciclo do glioxilato, gerando glicose.

Além disso, em condições de excesso de SH e dependendo das condições ambientais, as células de levedura são capazes de mobilizar os ácidos graxos livres para o armazenamento na forma de triglicerídeos (TAG) e esteril ésteres (STE) nos corpúsculos lipídicos e ao mesmo tempo podem modificar a composição dessas substâncias graxas utilizando-as como substrato. Os fenômenos que controlam a composição de ácidos graxos são a taxa específica de incorporação de cadeias alifáticas

de substrato no interior das células microbianas e as alterações intracelulares de ácidos graxos definidos pelas capacidades enzimáticas do micro-organismo (BEOPOULOS *et al.* 2009)..

Existem diferenças bioquímicas entre a biossíntese de lipídeos de novo e ex novo; no último caso, a acumulação de lipídeos ocorre simultaneamente com o crescimento celular, sendo totalmente independente da exaustão de nitrogênio do meio de cultura. Quando gorduras ou outros materiais hidrofóbicos são utilizados como a única fonte de carbono e energia, o acúmulo de reserva de lipídeos é um processo acoplado ao crescimento, na qual o lipídeo é acumulado simultaneamente com a formação de material celular na presença nitrogênio assimilável no meio de cultura (PAPANIKOLAOU e AGGELIS, 2011).

Quando as gorduras são utilizadas como a única fonte de carbono e de energia, não há qualquer biossíntese “de novo” de lipídeos a partir do acetil-CoA, desde que a ácido graxo sintetase (FAS) e a ATP-citrato liase (ACL) são fortemente inibidas pela presença de cadeias alifáticas exógenas. Portanto, a presença de materiais hidrofóbicos no meio de cultura deve ser geralmente incompatível com a biogénese “de novo” dos lipídeos, mesmo se glicose ou outros materiais hidrofílicos estiverem presentes no meio e forem co-metabolizados com os ácidos graxos exógenos (PAPANIKOLAOU e AGGELIS, 2011).

III.6.3. Degradação do lipídeo de reserva

Após a exaustão ou diminuição da taxa de captação da fonte de carbono do meio de cultura os micro-organismos oleaginosos, de uma regra geral, consomem suas próprias reservas lipídicas. Vários estudos foram realizados para este fim usando leveduras oleaginosas, fungos e bactérias e, sob várias condições ambientais, a degradação e sintese dos materiais lipofílicos anteriormente produzidos foi conduzida simultaneamente com a biossíntese de novos compostos livre de lipídeos.

A utilização de TAG e de estéril-ésteres (STEs) (os principais compostos lipídicos encontrados no CL) requer a ação de um sistema de lipases e hidrolases intracelulares que serão responsáveis pela clivagem dos ésteres e produção de ácidos graxos que serão posteriormente catabolizados pelo processo da beta oxidação,

produzindo acetil-CoA que será posteriormente convertido pelos ciclos de Krebs e do glioxilato.

A presença de lipases e hidrolases de STE é um pré-requisito para que o início do *turnover* de lipídeos de armazenamento aconteça, e ao mesmo tempo, são necessárias condições de esgotamento de carbono. Outra característica é que tal fenómeno de degradação lipídica é independente do tipo de fonte de carbono assimilável, uma vez que tal *turnover* é observado, tanto no mecanismo “de novo” de acúmulo de lipídeo, quando no “ex novo” (HOLDAWORTH e RATLEDGE, 1988; PAPANIKOLAOU e AGGELIS, 2011).

IV. METODOLOGIA

IV.1. Materiais

Os componentes dos meios de cultivo e reagentes utilizados neste trabalho encontram-se listados abaixo.

- KH_2PO_4 – VETEC – RJ, Brasil
- Na_2HPO_4 - VETEC – RJ, Brasil
- $MgSO_4.7H_2O$ - VETEC – RJ, Brasil
- $CaCl_2$ – MERCK – RJ, Brasil
- $FeCl_3$ – MERCK – RJ, Brasil
- $ZnSO_4.7H_2O$ - REAGEN – RJ, Brasil
- $MnSO_4.H_2O$ - REAGEN – RJ, Brasil
- EXTRATO DE LEVEDURA - VETEC – RJ, Brasil
- PEPTONA - OXOID – Hampshire, UK
- GLICOSE - VETEC – RJ, Brasil
- AGAR-AGAR - VETEC – RJ, Brasil
- IODETO DE POTÁSSIL - VETEC – RJ, Brasil
- FORMALDEÍDO - VETEC – RJ, Brasil
- BODIPY® 493/509 (4,4-difluoro-3a,4a,-diaza-s-indaceno) - LIFE TECHNOLOGIES – Califórnia, US

O glicerol bruto (glicerina loira residual) utilizado, gentilmente fornecido pelo CENPES/PETROBRAS, é proveniente de uma planta piloto de produção de biodiesel a partir de uma transesterificação alcalina (KOH) de óleo de soja com metanol e apresenta pureza de 82%.

IV.2. Equipamentos

Os equipamentos utilizados no trabalho foram:

- Autoclave vertical Prismatec modelo CS;
- Balança analítica Adventure
- pHmetro Digimed DM-22
- Capela de fluxo laminar equipada com luz UV – Bioflux II A1 90 AC;
- Capela de exaustão de gases Quimis modelo Q216-11
- Centrífuga Eppendorf modelo Centrifuge5804R
- Espectrofotômetro Bell modelo SP 2000 UV
- Estufa bacteriológica Novatécnica
- Incubador com agitação Tecnal TE-420
- Leitor de placas SHIMADZU
- Ultrafreezer CodLab modelo CL120-800
- Vórtex IKA modelo MS2 Minishaker

IV.3. Micro-organismos e manutenção das culturas

Seis cepas de *Yarrowia lipolytica* foram avaliadas quanto à potencialidade de acúmulo de lipídeo a partir do glicerol bruto, a saber: IMUFRJ 50682, IMUFRJ 50678, IMUFRJ 51670T, IMUFRJ52301 (selecionadas de um estuário da Baía de Guanabara no Rio de Janeiro, Brasil (HAGLER e MENDONÇA-HAGLER, 1981) e identificada pelo Instituto de Microbiologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro) W29 (ATCC® 20460) e PO1g (modificada geneticamente a partir da linhagem W29 sendo desprovida de atividade proteolítica). As culturas estoque foram mantidas a 4ºC em tubos contendo meio YPD (*Yeast Peptone Dextrose*) sólido: extrato de levedura 10 $g.L^{-1}$; peptona 20 $g.L^{-1}$; glicose 20 $g.L^{-1}$; ágar 30 $g.L^{-1}$, e repicadas a cada seis meses. Após o repique os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 28 ºC por dois dias e em seguida estocadas sob refrigeração.

IV.4. Preparo do inóculo

O inóculo foi obtido a partir dos tubos de meio YPD sólido contendo as células preservadas (descrito no item 4.3). De forma estéril e com o auxílio de uma alça de platina as células eram inoculadas em um frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio YPD (extrato de levedura 10 $g.L^{-1}$; peptona 20 $g.L^{-1}$; glicose 20 $g.L^{-1}$), previamente esterilizado por autoclavação por 15 minutos a 121ºC e 1 atm. O frasco foi mantido em um incubador com agitação a 160 rpm. Após 72 horas, absorvância a 570 nm de uma amostra do meio foi determinada, e seguida um volume do caldo suficiente para obter-se uma concentração inicial de células de aproximadamente 1,0 g/L foi centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos em tubos estéreis. O *pellet* de células foi adicionado no meio de produção de lipídeos dos experimentos posteriores.

IV.5. Determinação do pH

O pH das amostras foi determinado utilizando-se um pHmetro Digimed DM-22 a temperatura ambiente (25°C).

IV.6. Determinação do crescimento celular

O crescimento celular foi determinado através de medidas de absorvância em Espectrofotômetro Bell modelo SP 2000 UV a 570 nm. Os valores foram convertidos para $g.L^{-1}$ de biomassa utilizando um fator de conversão obtido pela curva de peso seco (Figura 4.1). A obtenção da curva peso seco *versus* absorvância é feita utilizando uma suspensão de células em solução salina (água destilada com 0,9% (p/v) NaCl). Uma amostra desta suspensão (10 mL) é retirada e filtrada em papel de filtro Millipore 0,45 μm (previamente pesado). O papel junto com as células é seco em luz de infravermelho por 30 minutos e, em seguida, pesado. Da mesma suspensão de células são feitas diferentes diluições de modo a obterem-se concentrações celulares distintas e, então, o valor de absorvância para cada concentração é obtida em espectrofotômetro a 570 nm. Os valores de concentração celular ($g.L^{-1}$) e seus valores correspondentes de absorvância foram plotados em um gráfico (Figura IV.1).

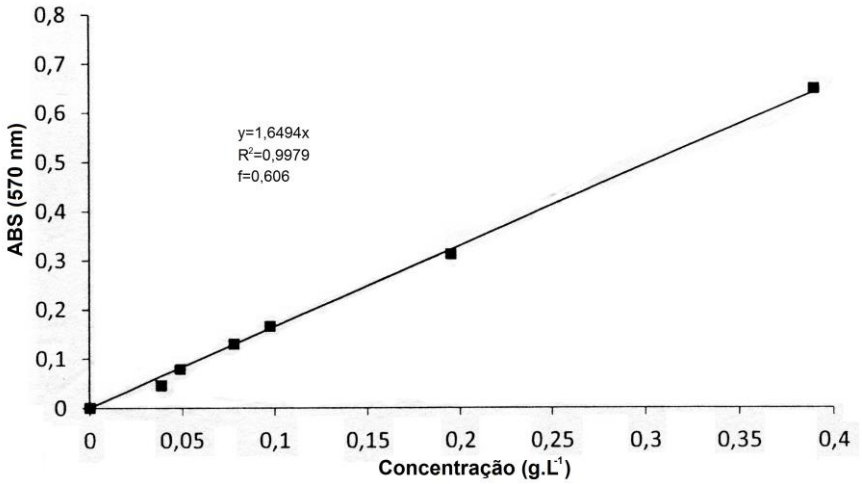


Figura IV.1. Curva de peso seco para quantificação do crescimento celular de *Yarrowia lipolytica* através de medidas de absorvância em Espectrofotômetro Bell modelo SP 2000 UV.

IV.7. Análise de índice lipídico

Para quantificar a intensidade de lipídeos intracelulares presente nas leveduras, foi utilizado o método fluorimétrico de MORAIS *et al.* (2010) empregando o corante lipofílico fluorescente BODIPY® (4,4-difluoro-3a,4a,-diaza-s-indaceno). A descrição se segue abaixo.

IV.7.1.Fixação celular

As amostras retiradas do cultivo foram fixadas adicionando 1/9 do volume de formaldeído e incubadas por 15 minutos. Em seguida, as células foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos, e então lavadas com água destilada com posterior centrifugação. As células foram novamente suspensas em água destilada e ajustadas para 5 $D.O._{600\ nm}$/mL.

IV.7.2.Determinação do Índice de Corpúsculo Lipídico (ICL)

O teor do corpúsculo lipídico (CL) foi determinado pela recuperação da fluorescência neutralizada do BODIPY após a adição das células fixadas. A neutralização é realizada para perseverar a fluorescência da sonda e permitir que a emissão detectada seja apenas das sondas que estejam ligadas aos corpúsculos lipídicos. Isso é feito utilizando um neutralizador hidrofílico que impede a emissão de fluorescência do BODIPY quando o mesmo está presente em solução, permitindo que a emissão ocorra apenas quando o fluoróforo é localizado no interior do corpúsculo lipídico (Figura IV.2). O neutralizador utilizado foi o iodeto de potássio (KI).

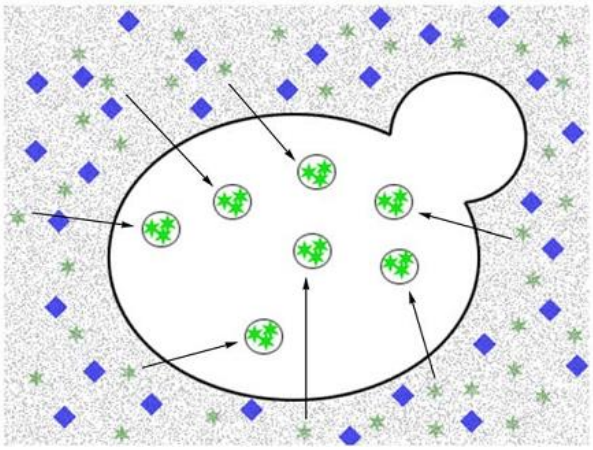


Figura IV. 1: Representação da recuperação de fluorescência. A fluorescência do BODIPY é inibida em solução pelo KI e recuperada quando as células são adicionadas. O BODIPY se junta ao corpúsculo lípidico no interior da célula, no qual o inibidor é excluido (MORAIS *et al.*, 2010).

Inicialmente, as configurações fluorímetro foram ajustadas para 480 nm de excitação, 510 nm de emissão e corte de filtro a 495 nm. Concomitante a cada leitura de fluorescência, foi determinada a quantidade de células medindo a absorvância a 600 nm. Assim sendo, 200 µL de tampão de leitura neutralizado contendo 5 µM de BODIPY e 500 mM de KI são adicionados na placa de leitura de 96 poços preta de fundo claro e a leitura deste branco do tampão foi realizada. Em seguida, 5 µL de uma suspensão de células previamente fixadas e com a DO ajustada são adicionados em cada poço e é feita a leitura. Cada uma das amostras foi lida quatro vezes a cada adição subsequente de alíquotas de 5 µL da suspensão de células no mesmo poço (Figura IV.3).

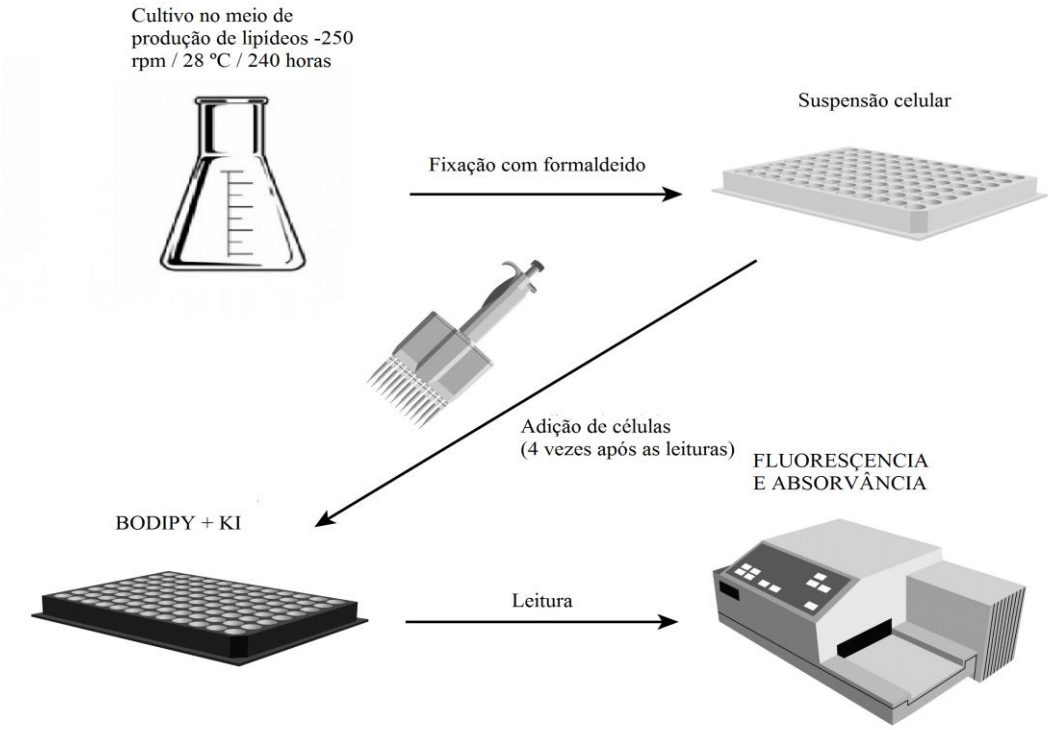


Figura IV. 2: Esquematização do ensaio de quantificação de lipídeo pelo Índice de Corpúsculo Lipídico (adaptado de MORAIS *et al.*, 2010)

A qualidade dos dados foi analisada através da avaliação da linearidade das medições em comparação com a concentração de células. O coeficiente angular da curva de fluorescência por concentração de células foi determinado e denotado o Indice de Corpúsculo Lipídico (ICL), exemplificado pela Figura IV.4. Se $R^2 < 0,9$, os dados eram descartados.

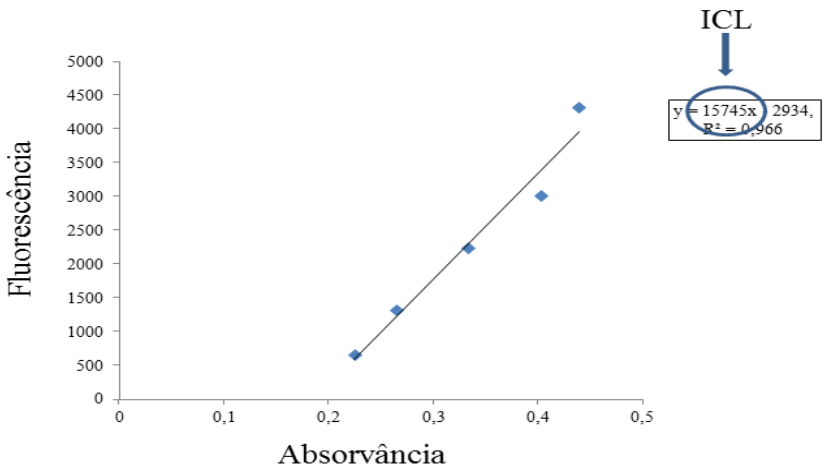


Figura IV. 3: Exemplificação de como é obtido o ICL a partir do coeficiente angular da curva de fluorescência por concentração de células.

IV.8. Experimentos preliminares

Em um estudo anterior realizado por SANTOS *et al.* (2012), foi determinada uma composição adequada do meio de produção de lipídeos utilizando a cepa *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 (Tabela IV.1). A fim de utilizar um meio de cultivo com menores concentrações de sais, o meio foi modificado empiricamente, reduzindo a concentração dos sais presente no caldo para um valor cinco vezes menor que o utilizado originalmente (Tabela IV.1). O acúmulo de lipídeos entre o meio descrito por SANTOS *et al.* (2012) e o meio modificado foi comparado. A concentração de glicerol resíduo utilizado nesse e nos experimentos seguintes foi de 50 g/L.

Tabela IV. 1: Composição dos meios de cultivo de produção de lipídeos.

Componente	Concentrações ($g.L^{-1}$)	
	Neste trabalho	SANTOS *et al.* (2012)
Glicerol	50	50
Extrato de levedura	0,1	0,1
KH_2PO_4	1,4	7,0
Na_2HPO_4	0,5	2,5
$MgSO_4.7H_2O$	0,3	1,5
$CaCl_2.2H_2O$	0,04	0,2
$FeCl_3.6H_2O$	0,018	0,15
$ZnSO_4.7H_2O$	0,004	0,02
$MnSO_4.H_2O$	0,012	0,06

1 $g.L^{-1}$ de biomassa de *Yarrowia lipolítica* obtido no inóculo foi adicionado de modo estéril em 200 mL do meio de produção de lipídeos previamente esterilizado em frasco Erlenmeyer de 500mL em triplicata. Os mesmos eram mantidos em incubador rotatório a 250 rpm e 28 ºC por 240 horas. Diariamente, amostragens eram realizadas para verificar o pH do caldo, quantificar biomassa e o acúmulo de lipídeos.

IV.9. Uso da glicerina bruta no inóculo

Visando observar a viabilidade da utilização da glicerina bruta como fonte de carbono no meio do inóculo, a glicose do meio YPD foi substituída por 20,4 $g.L^{-1}$ de glicerol bruto, mantendo a mesma proporção de carbono nas composição do meio. A cepa utilizada nesse estudo foi a *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682.

IV.10. Seleção de cepas

Após selecionar o meio de cultivo de produção de lipídeos (item IV.8), este foi utilizado no crescimento das 6 cepas de *Yarrowia lipolítica* previamente citadas (item IV.3) para comparar o acúmulo de lipídeos.

IV.11. Estudo da influência dos sais do meio de cultivo no acúmulo de lipídeos

Para verificar a influência dos sais do meio em relação ao acúmulo de lipídeos intracelulares foi adotado o método de Plackett-Burman

Quando se precisa testar um grande número de fatores para identificar quais deles são relevantes, ou seja, quais tem mais influência sobre as variáveis de interesse, pode-se empregar um delineamento que permite testar o maior número de efeitos desses fatores com o menor número possível de experimentos, como o Plackett-Burman. Este tipo de experimento é chamado de "experimento de filtragem" ou "*screening experiment*" e permite a escolha das variáveis que são importantes na análise e descartar as que não têm influência na resposta que se pretende estudar (MATEUS; BARBIN; CONAGIN, 2000).

Para seleção das variáveis significativas foram estudadas como variáveis independentes as concentrações de KH_2PO_4, Na_2HPO_4, $MgSO_4.7H_2O$, $CaCl_2.2H_2O$, $FeCl_3.6H_2O$, $ZnSO_4.7H_2O$ e MnSO4.H_2O, sendo testadas em diferentes níveis com doze ensaios mais três repetições no ponto central, de acordo com a Tabela IV.2. As concentrações das variáveis independentes estudadas estão apresentadas na Tabela IV.3.

Tabela IV. 2: Matriz do planejamento Plackett-Burmann

	KH_2PO_4	$NaHPO_4$	$MgSO_4.7H_2O$	$CaCl_2.2H_2O$	$FeCl_3$	$ZnSO_4.H_2O$	$MnSO_4.H_2O$
1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1
2	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1
3	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1
4	+1	-1	+1	+1	-1	1	-1
5	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1
6	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1
7	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1
8	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1
9	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
10	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1
11	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
13	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0

Tabela IV. 3: Níveis codificados e reais das variáveis estudadas

	Níveis ($g.L^{-1}$)		
Variáveis	-1	0	1
KH_2PO_4	1,4	4,2	7
Na_2HPO_4	0,5	1,5	2,5
$MgSO_4.7H_2O$	0,3	0,9	1,5
$CaCl_2.2H_2O$	0,04	0,12	0,2
$FeCl_3.6H_2O$	0,018	0,084	0,15
$ZnSO_4.7H_2O$	0,004	0,012	0,02
$MnSO_4.H_2O$	0,012	0,36	0,06

Os ensaios foram conduzidos em frascos Erlenmeyers de 500mL com as concentrações de glicerol e extrato de levedura já descritas e suplementados com as sete variáveis do planejamento nas suas respectivas concentrações +1, 0 e -1. Posteriormente este foi autoclavado por 15 minutos a 121ºC e 1 atm e adicionado o inóculo, conforme previamente descrito no item IV.4. O cultivo foi realizado a 28ºC em incubadores com agitação a 250 rpm por 240 horas. Após a incubação, foi feita a quantificação da biomassa e a análise do Índice de Corpúsculos Lipídicos, sendo estas as variáveis respostas do planejamento. Os resultados foram tratados com o programa STATISTICA v.10.

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

V.1. Experimentos preliminares.

O meio de cultivo utilizado em todos os experimentos de produção de lipídeo teve sua concentração de sais alterada em relação ao meio de cultivo já modificado por SANTOS *et al.* (2012), onde tal estudo resultou em um meio mineral não tamponado com modificações da concentração de glicerol e extrato de levedura e remoção da fonte inorgânica de nitrogênio (sulfato de amônio) em relação ao meio de cultivo original desenvolvido por PAPANIKOLAOU *et al.* (2002). A mudança aqui proposta foi a redução dos sete sais para uma concentração cinco vezes menor que a original. Tal alteração foi realizada de forma empírica a fim de diminuir os custos da produção.

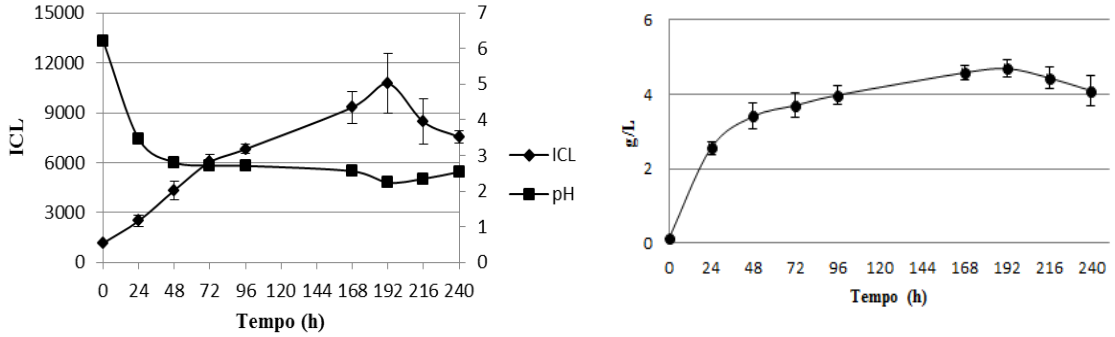
O trabalho realizado por SANTOS *et al.* (2012) apresentou um resultado de fluorêscencia para lipídeos (ICL) de 4628 ao utilizar a cepa IMUFRJ 50682 em 54 horas de fermentação empregando o meio de cultivo com os sais na seguinte quantidade em $g.L^{-1}$: KH_2PO_4: 12; Na_2HPO_4.: 12; $MgSO_4.7H_2O$: 1,5; $CaCl_2.2H_2O$: 0,2; $FeCl_3.6H_2O$: 0,15; $ZnSO_4.7H_2O$: 0,02; $MnSO_4.H_2O$: 0,06, além de glicerol 50 $g.L^{-1}$ e extrato de levedura 0,1 $g.L^{-1}$.

No presente estudo, diminuindo a quantidade dos sete sais acima citados para um valor cinco vezes menor e mantendo a concentração de glicerol (50 g/L) e extrato de levedura (0,1g/L) foram obtidos valores de ICL de 4332 e 6038 em 48 e 72 horas respectivamente, utilizando a mesma linhagem de *Y. lipolytica*. Portanto, aparentemente a diminuição da concentração dos sais do meio não afetou o acúmulo de lipídeos pela levedura.

V.2. Seleção de cepas potencialmente acumuladoras de lipídeos

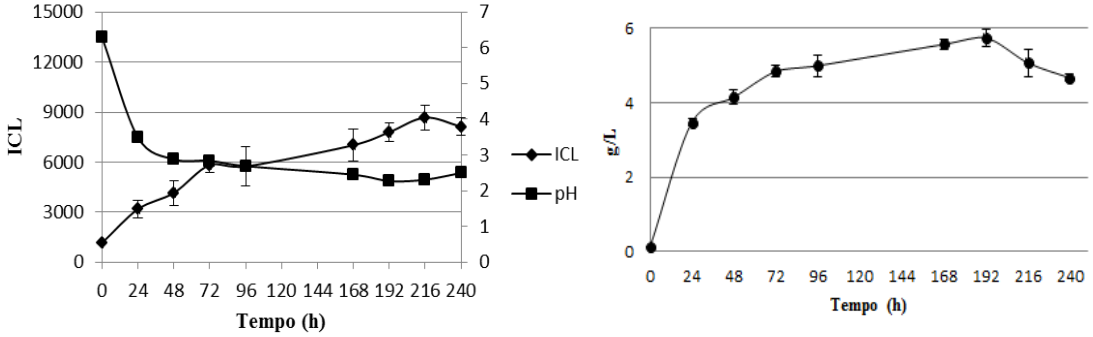
A partir do experimento preliminar de redução da concentração dos sais foi definido o meio de cultivo a ser usado nos ensaios de escolha das cepas produtoras de lipídeos (item IV.8, Tabela IV.1) e as condições de cultivo foram 200mL de meio reacional (frasco de 500mL) sob agitação de 250 rpm em 28°C. Esta etapa consistiu tanto na seleção das linhagens de *Y. lipolytica* mais promissoras quanto ao acúmulo de lipídeo e a relação desse fenômeno com a multiplicação celular e a variação de pH do

meio de cultivo. Os resultados podem ser verificados nas Figuras V.1. a V.6, e na Tabela V.1.



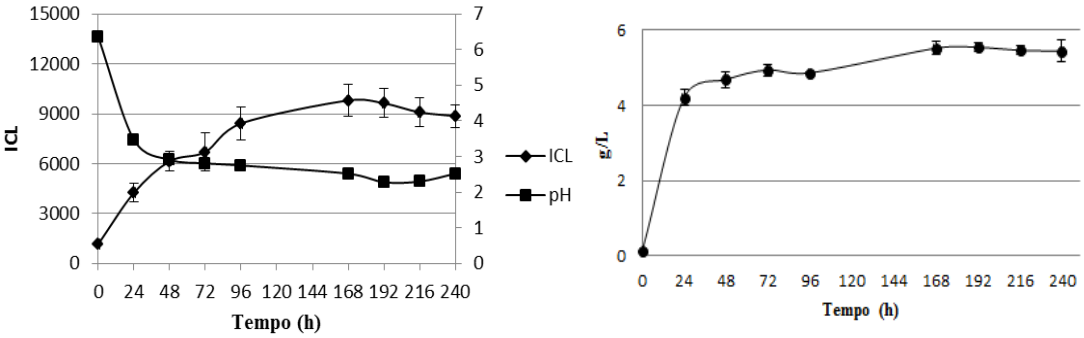
(A) **(B)**

Figura V. 1: Cinética do acumulo lipídico e do pH no meio de cultura (A) e concentração de biomassa (B) da cepa de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682. As barras de erro correspondem ao desvio padrão da análise.



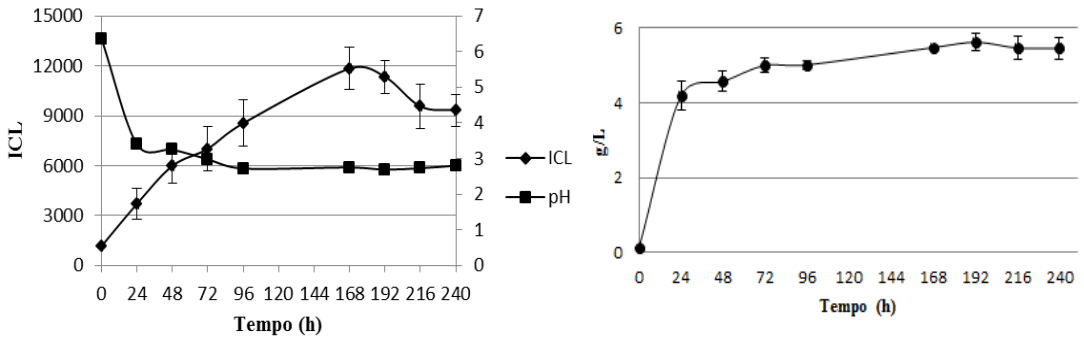
(A) **(B)**

Figura V. 2: Cinética do acumulo lipídico e do pH no meio de cultura (A) e concentração de biomassa (B) da cepa de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50678. As barras de erro correspondem ao desvio padrão da análise.



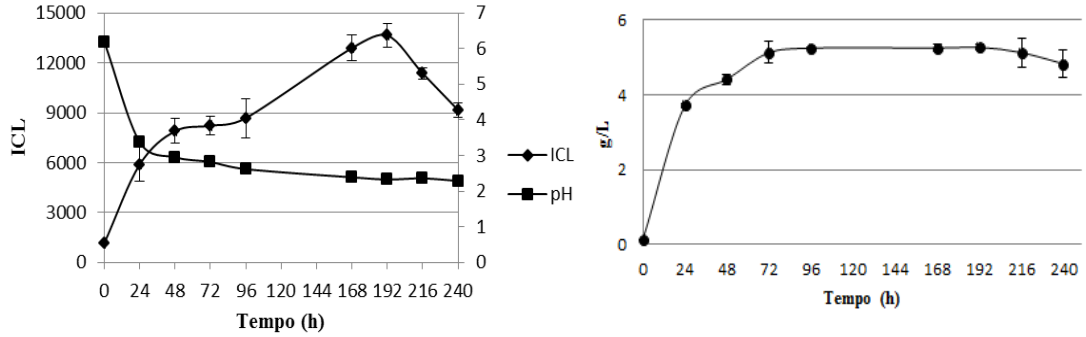
(A) **(B)**

Figura V. 3: Cinética do acumulo lipídico e do pH no meio de cultura (A) e concentração de biomassa (B) da cepa *de Y. lipolytica* IMUFRJ 51670T. As barras de erro correspondem ao desvio padrão da análise.



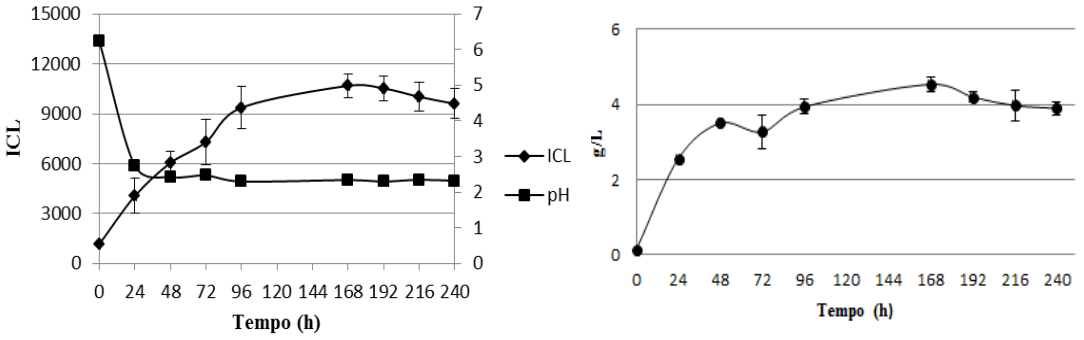
(A) **(B)**

Figura V. 4: Cinética do acumulo lipídico e do pH no meio de cultura (A) e concentração de biomassa (B) da cepa de *Y. lipolytica* IMUFRJ 52301. As barras de erro correspondem ao desvio padrão da análise.



(A) **(B)**

Figura V. 5: Cinética do acumulo lipídico e do pH no meio de cultura (A) e concentração de biomassa (B) da cepa *de Y. lipolytica* W29. As barras de erro correspondem ao desvio padrão da análise.



(A) **(B)**

Figura V. 6: Cinética do acumulo lipídico e do pH no meio de cultura (A) e concentração de biomassa (B) da cepa *de Y. lipolytica* Po1g. As barras de erro correspondem ao desvio padrão da análise.

Tabela V. 1: Produtividade do acúmulo de lipídeo nos pontos onde ocorre o máximo de ICL

Cepa	Produtividade ($ICL.h^{-1}$)	ICL	biomassa ($g.L^{-1}$)
50682	56,01	10754	4,69
50678	40,14	8670	5,07
51670T	58,34	9801	5,52
52301	70,44	11835	5,48
W29	71,09	13649	5,27
P01g	54,82	10526	4,20

Através das Figuras que apresentam a cinética do processo, observa-se um acúmulo lipídico crescente em quase todo tempo experimental. O ponto máximo pode ser verificado entre o tempo de 150 e 190 horas em praticamente quase todas as cepas, sendo que apenas a IMUFRJ50678 teve seu pico de acúmulo em 216 horas. Logo após o pico de acúmulo de óleo, observa-se uma queda na concentração do mesmo.

A linhagem que apresentou o melhor desempenho no que se diz respeito ao armazenamento lipídico foi *Y. lipolytica* W29, seguida da IMUFRJ 52301, ocorrendo o valor máximo de fluorescência em 192 horas e 168 horas de experimento, alcançando um valor de ICL de 13648,76 e 11340,52 respectivamente. Isso pode ser confirmado pelos dados produtividade na Tabela V.1, em que observa-se que a cepa W29 apresentou maior produtividade de acúmulo lipídico em 192 horas alcançando 71,09 $ICL.h^{-1}$, seguida pela cepa IMUFRJ 52301 que atingiu 70,44 $ICL.h^{-1}$ em 168 horas. A cepa que teve o pior desempenho foi a IMUFRJ 50678 que alcançou 40,14 $ICL.h^{-1.}$ Por apresentar maiores valores de ICL e produtividade, a cepa W29 foi a escolhida para ser utilizada nos experimentos subsequentes.

A cepa *Y. lipolytica* W29 (ATCC® 20460™ ou CBS7504 ou CLIB89) foi originalmente isolada por Gaillardin a partir de esgotos parisienses (GAILLARDIN, 1996), sendo hoje em dia amplamente estudada e caracterizada na literatura, utilizada especialmente em estudos de engenharia metabólica para a formação de produtos de maior valor agregado (LIU & ALPER, 2014).

Nas Figuras de produção de biomassa verifica-se um perfil de crescimento celular semelhante com todas as cepas, aonde é constatada a transição da fase de crescimento exponencial e o início da fase estacionária em 48 horas de experimento.

Nos últimos dias de cultivo, algumas das cepas já começam a apresentar uma tendência à queda no valor de biomassa (Figuras V.1B, V.2B e V.6B) que pode ser justificada por lise celular em razão da possível escassez dos componentes nutricionais do meio ou mesmo pela influencia de uma diminuição no volume celular. Dentre as seis linhagens estudadas, IMUFRJ50682 e Po1g foram as que apresentaram os menores valores de biomassa, alcançando valores máximos de 4,6g.L^{-1} e 4,5g.L^{-1} em 192 e 168 horas respectivamente.

Durante as 240 horas de experimento, também foi verificada a diminuição do pH no meio de cultura. Os gráficos (Figuras V.1 a V.6, letras A) mostram os valores de pH, aonde houve uma queda brusca logo no primeiro dia de amostragem, efeito esse observado para todas as cepas estudadas. Após esta queda inicial, o pH permaneceu praticamente constante até o final do experimento. É possível que a produção de outros metabólitos, como ácidos orgânicos (RYWINSKA *et al.*, 2013), seja a causa da redução do pH do meio.

Segundo BEOPOULOS *et al*. (2009), a transição do crescimento celular para o acúmulo de lipídios geralmente ocorre quando o excesso de carbono no meio está associado a uma limitação de nutrientes. Nestas condições, a levedura *Y. lipolytica* produz grandes quantidades de metabólitos secundários como o ácido cítrico, isocítrico, ácido 2-cetoglutárico e ácido pirúvico e também pode converter o carbono em triacilglicerol. Dependendo da relação carbono/nitrogênio (C/N), diferentes caminhos metabólicos podem ser observados. O primeiro corresponde à máxima taxa de crescimento com o consumo das fontes em concentrações ótimas de carbono e nitrogênio. Isto resulta numa produção máxima de biomassa. O segundo corresponde a um influxo do excesso de carbono no meio, o qual tem uma elevada relação C/N, resultando numa diminuição na produção de biomassa e altos níveis de produção de lipídeo. E o terceiro é resultado de uma relação C/N ainda maior, levando à diminuição do acúmulo de lipídios a favor da produção de metabólitos secundários. Além disso, uma quantidade substancial de lipídeo é acumulada normalmente na fase estacionária de crescimento, aonde o nitrogênio em limitação já foi consumido para o desenvolvimento da biomassa.

A partir dos resultados obtidos, pode-se verificar o pico de acúmulo lipídico alcançado em momentos tardios do experimento, justamente no momento da fase estacionária de crescimento. A escassez do nitrogênio proporciona a repressão de algumas vias metabólicas (ácido nucleico e a síntese de proteínas), ao passo que outras

vias são induzidas (ácidos graxos e síntese de triglicerídeos) (RATLEDGE, 2002). A queda acentuada do pH durante a fermentação é um indício da produção de metabólitos secundários, como ácidos orgânicos, em paralelo ao acúmulo de lipídeo, o que possivelmente o carbono oriundo do glicerol foi destinado tanto à produção de ácidos quanto à síntese de lipídeos. A relação C/N do meio de cultivo utilizado foi alta (C/N 1956:1), e todas as cepas estudas apresentaram um perfil compatível com esta configuração do meio de cultivo, segundo as afirmações de BEOPOULOS *et al.* (2009).

A relação C/N do meio de cultivo utilizado (C/N 1956:1) apresenta um valor muito maior do que os encontrados na literatura em estudos de acúmulo lipídico, aonde, por exemplo, foi demonstrado por Granger (1992) que valores excedentes de 350 da razão C/N foram prejudiciais ao acúmulo lipídico de *Rhodotorula glutinis* cultivadas em batelada ao utilizar glicose como fonte de carbono. Já PAPANIKOLAOU *et al*. (2003) alcançaram um acúmulo lipídico significante ao utilizar uma razão de C/N de 175, empregando esterarina e glicerol como co-substrato no cultivo de *Y. lipolytica*. Para o presente trabalho, a elevada relação C/N utilizada aparentemente não apresentou prejuízo durante o processo fermentativo.

Nos últimos dois pontos de amostragem (216 e 240 horas) é observado para praticamente todas as cepas (IMUFRJ50678 apenas em 240 horas) uma diminuição na quantidade de lipídeo acumulado. Supõe-se a ocorrência do consumo de suas próprias reservas, após a exaustão ou diminuição da taxa de consumo da fonte de carbono do meio de cultura. Portanto, pode-se sugerir que o acúmulo de lipídeos é dependente do influxo do substrato carbonáceo. Parece que essa regulação complexa dos níveis de C/N para um elevado acúmulo lipídico é difícil de alcançar em cultura em batelada. Em tal condição, acredita-se que o acúmulo de lipídeos é sempre acompanhado pela produção de ácido cítrico, sendo esse o fenômeno observado por PAPANIKOLAOU et al (2003).

Experimentos em frascos, realizados por PAPANIKOLAOU e AGGELIS (2001) utilizando *Y. lipolytica* LGAM S(7)1 na presença de glicerol, foram acompanhados pelo acúmulo de lipídeos restrito no interior da célula, supondo-se que o sistema enzimático envolvido em direcionar o metabolismo intracelular de ácido cítrico para a reserva de lipídeos (por exemplo ATP citrato liase) não teve plena ativação durante o cultivo.

V.3. Uso de glicerol como fonte de carbono no meio do pré-inóculo

Uma vez que a produção de biodiesel disponibiliza uma quantidade relativamente abundante de glicerol, é interessante o seu uso para além do meio de produção. Por este motivo, foi realizado paralelamente o cultivo da levedura *Y. lipolytica* para obtenção de biomassa em substituição da glicose, que é a fonte de carbono usual do meio de cultura YPD, pelo glicerol residual.

Assim sendo, foi possível observar o potencial do uso do glicerol bruto em todas as etapas do processo fermentativo. A quantidade de glicerol utilizada foi a mesma que a de glicose em relação à proporção de carbono, e a cepa utilizada foi a *Y. lipolytica* IMUFRJ50682. O resultado obtido pode ser verificado na Figura V.7.

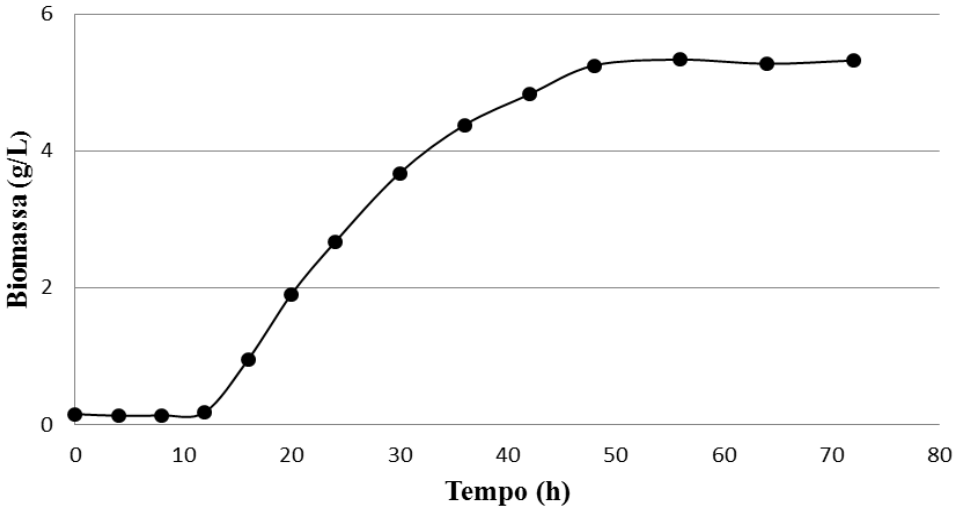


Figura V. 7: Cinética de produção de biomassa de *Y.lipolytica* IMUFRJ50682 crescidas ao utilizar glicerol bruto como fonte de carbono (2,04% p/v), extrato de levedura (1% p/v) e peptona (2% p/v)

Na da Figura V.7 pode-se visualizar as fases do crescimento microbiano. A fase lag (0-12 horas), que ocorre basicamente porque o inóculo foi proveniente de uma cultura antiga (em fase estacionária) crescida em meio sólido aonde as células encontravam-se depletadas de vários constituintes essenciais, requerendo tempo para sua biossíntese, além de necessitar um tempo de adaptação à nova fonte de carbono, como para a síntese de enzimas responsáveis pelo seu metabolismo; fase exponencial (12-48 horas), momento em que as células encontravam-se nas condições mais saudáveis e propícias ao crescimento e multiplicação; fase estacionária (48-72 horas), fase em que a taxa líquida de crescimento da população é nula, não observando aumento ou diminuição no número de células.

Os cultivos em YPD para obtenção de biomassa (72 horas de cultivo) utilizados no presente trabalho apresentaram valores de biomassa de aproximadamente 7,5 $g.L^{-1}$, já o cultivo no meio YPG testado, a biomassa alcançada foi em torno de 5,3 $g.L^{-1}$ ao fim de 72 horas.

TACCARI *et al.* (2012) demonstraram que a utilização de glicerol em culturas com *Y. lipolytica* resultou em um nível semelhante de biomassa se comparado a utilização de glicose, além de apresentar uma produção de biomassa aumentada quando a otimização do processo foi realizada. ANDRE *et al.* (2009) observaram uma faixa de concentração de biomassa de 4,2 - 8,2 $g.L^{-1}$, quando linhagens de *Y. lipolytica* foram cultivadas em meio contendo glicerol residual, e JUSZCZYK *et al.* (2013) apresentam uma faixa de 6,9 – 7,4 $g.L^{-1}$ ao se utilizar glicerol puro como fonte de carbono, sendo a quantidade de biomassa obtida no presente estudo (5,3 $g.L^{-1}$) próximo das concentrações previamente relatadas. Além disso, CHATZIFRAGKOU *et al.* (2011) testou 15 espécies de fungos quanto à capacidade de assimilar glicerol resídual e convertê-lo em produtos metabólicos de valor agregado. Dentre as espécies estudas pelo autor, foi verificado que o aumento da concentração de glicerol bruto (de 30 a 90 $g.L^{-1}$) não teve um efeito positivo sobre o crescimento a *Yarrowia lipolytica*, atingindo um nível da biomassa de 6,6 e 5,9 $g.L^{-1}$, respectivamente.

Uma vantagem que pode ser observada é viabilidade da utilização do glicerol bruto em todas as etapas do processo, inclusive na produção de biomassa.

V.4. Análise da influência dos sais do meio de produção na síntese de lipídeos e de biomassa

Após eleger a linhagem *Y. lipolytica* W29, que apresentou o melhor desempenho no que se diz respeito ao acúmulo lipídico, foi realizado um delineamento de Plackett-Burman para avaliar a influência dos sais inorgânicos na produção de lipídeos ao empregar a cepa selecionada.

A matriz com os valores codificados das variáveis independentes e os resultados do delineamento experimental de Plackett-Burman para as respostas de índice de corpúsculos lipídicos e biomassa ($g.L^{-1}$) estão representados na Tabela V.2.

Tabela V. 2: Matriz do delineamento Plackett-Burman com os valores codificados e respostas em ICL e biomassa.

Variáveis independentes*								Variáveis dependentes	
Ensaios	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	ICL	Biomassa ($g.L^{-1}$)
1	7	0,5	1,5	0,04	0,018	0,004	0,06	11322	6,62
2	7	2,5	0,3	0,2	0,018	0,004	0,012	11119	6,50
3	1,4	2,5	1,5	0,04	0,15	0,004	0,012	11668	6,22
4	7	0,5	1,5	0,2	0,018	0,02	0,012	11694	6,75
5	7	2,5	0,3	0,2	0,15	0,004	0,06	11380	6,15
6	7	2,5	1,5	0,04	0,15	0,02	0,012	11500	7,04
7	1,4	2,5	1,5	0,2	0,018	0,02	0,06	12460	6,14
8	1,4	0,5	1,5	0,2	0,15	0,004	0,06	14322	6,90
9	1,4	0,5	0,3	0,2	0,15	0,02	0,012	11038	7,05
10	7	0,5	0,3	0,04	0,15	0,02	0,06	11035	5,87
11	1,4	2,5	0,3	0,04	0,018	0,02	0,06	11324	6,54
12	1,4	0,5	0,3	0,04	0,018	0,004	0,012	12105	6,21
13	4,2	1,5	0,9	0,12	0,084	0,012	0,36	11804	6,34
14	4,2	1,5	0,9	0,12	0,084	0,012	0,36	12009	6,56
15	4,2	1,5	0,9	0,12	0,084	0,012	0,36	11912	6,50

***X_1=KH_2PO_4, X_2=$NaHPO_4$, X_3=$MgSO_4.7H_2O$, X_4=$CaCl_2.2H_2O$, X5=$FeCl_3$, X_6=$ZnSO_4.H_2O$, X_7=$MnSO_4.H_2O$**

O menor valor encontrado entre as respostas do delineamento experimental de Plackett-Burman foi de 11035 e 5,87 $g.L^{-1}$ de ICL e biomassa respectivamente, ambos observados no ensaio 10; o maior valor foi de 14322 de ICL no ensaio 8 e 7,05 g/L de biomassa no ensaio 9.

Analisando os resultados da Tabela V.2 através do software Statistica v.10 foi possível calcular o efeito das sete variáveis estudadas frente ao acúmulo de lipídeos e produção de biomassa, os quais estão apresentados nos diagramas de Pareto nas Figuras V.8 e V.9 respectivamente.

O acúmulo de lipídeos na célula geralmente exige o esgotamento de nutrientes, como nitrogênio (N), fósforo (P), zinco (Zn), ferro (Fe) ou magnésio (Mg) para permitir que o excesso de carbono seja convertido em lipídeos (HASSAN *et al.*, 1995). Além disso, ZHAO *et al.*(2008) afirmaram que uma concentração adequada de sais minerais

como componentes de meio de cultura pode melhorar o acúmulo de lipídeos. Assim sendo, é de interesse para conduzir a um aumento da produção de óleo intracelular observar a influência dos sais presentes no meio de cultivo.

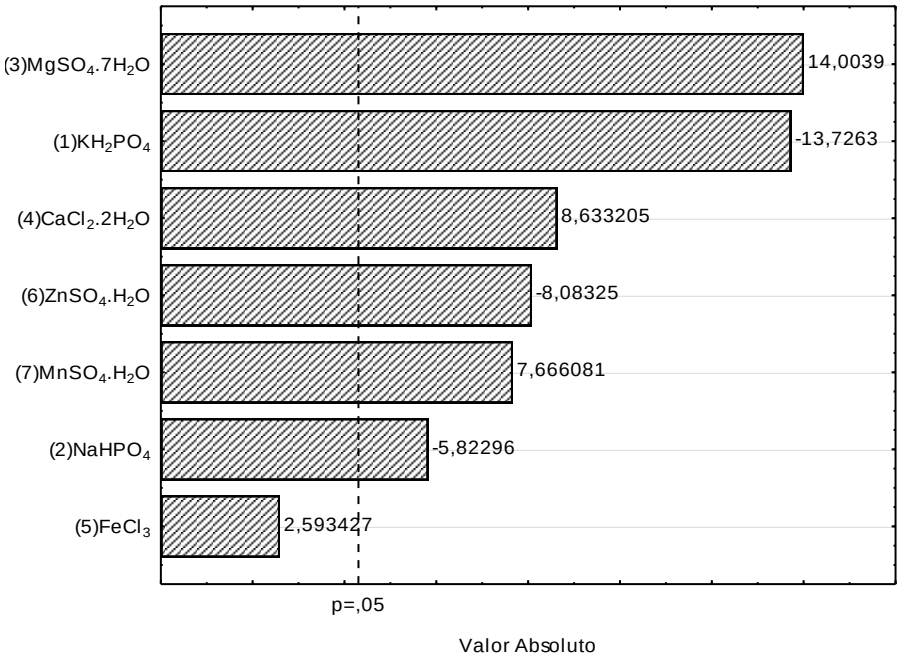


Figura V. 8: Diagrama de Pareto dos efeitos dos fatores estudados sobre a variável resposta de acúmulo lipídico (ICL) no experimento de delineamento experimental de Plackett-Burman.

No diagrama de Pareto dos efeitos das sete variáveis sobre o acúmulo de lipídeos (Figura V.8) pode-se observar que quase todas as variáveis avaliadas apresentaram efeitos estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$), sendo que apenas o sal $FeCl_3$ não apresentou significância estatística na resposta analisada.

A composição dos sais utilizados no meio de cultivo de produção de lipídeo foi originalmente descrito por PAPANIKOLAOU *et al.* (2002) sendo esse meio empregado para a produção de ácido cítrico. O sal que apresentou maior influência positiva na resposta de acúmulo de óleo foi o $MgSO_4.7H_2O$, ou seja, maiores concentrações deste sal pode levar a maior resposta na produção de óleo. Isto também foi observado por Qu *et al.* (2006), onde este sal foi eficaz para melhorar o acúmulo de lipídios quando utilizado a levedura *Lipomyces starkeyi*.

Os resultados encontrados estão de acordo com o que é apresentado na literatura, em que se relata que o magnésio tem uma participação importante na síntese de lipídeos por ser necessário para o funcionamento da enzima ácido fosfatídico fosfoidrolase

(PAP) que é responsável pela desfosforilação do ácido fosfatídico (PA) liberando diacilglicerol (DAG) que posteriormente será convertido a triacilglicerol, sendo portanto um componente chave para a síntese “de novo” de lipídeo (KOSA e RAGAUSKAS, 2011).

KRAISINTU *et al.* (2010) utilizaram uma faixa de concentração de KH_2PO_4 variando de 0,4 a 4,0 $g.L^{-1}$, onde o melhor acúmulo de lipídeo pela levedura *Rhodosporidium toruloides* após 168 horas de cultivo foi com menor concentração do sal. Este resultado foi similar a resposta encontrada aqui para *Yarrowia lipolytica*, o qual apresenta uma influência negativa em relação a este sal frente a resposta de acúmulo de óleo.

Em outro estudo realizado para avaliar a importância dos sais metálicos na produção de lipídeos, HASSAN *et al.* (1995) demonstraram que a produção de lipídeos não foi afetada pela condição limitante do ferro na cultura em batelada ao utilizar a levedura *Cryptococcus curvatus*. Tal metal foi o único componente do meio de cultura que não teve influência no acúmulo lipídico demonstrado no diagrama de pareto da Figura V.8. A ausência de efeito também foi verificada no estudo de HASSAN *et al.* (1995) no que se diz respeito ao crescimento celular.

Portanto, para a produção de lipídeos pela linhagem *Yarrowia lipolytica* W29, deve-se optar pela utilização de $MgSO_4.7H_2O$, $CaCl_2.2H_2O$ e $MnSO_4.H_2O$ nos maiores níveis, e KH_2PO_4, $NaHPO_4$, $FeCl_3$ e $ZnSO_4.H_2O$ nos menores níveis.

Já no caso da produção de biomassa, verificou-se que nenhuma das variáveis demonstrou efeito estatisticamente significativo (Figura V.9).

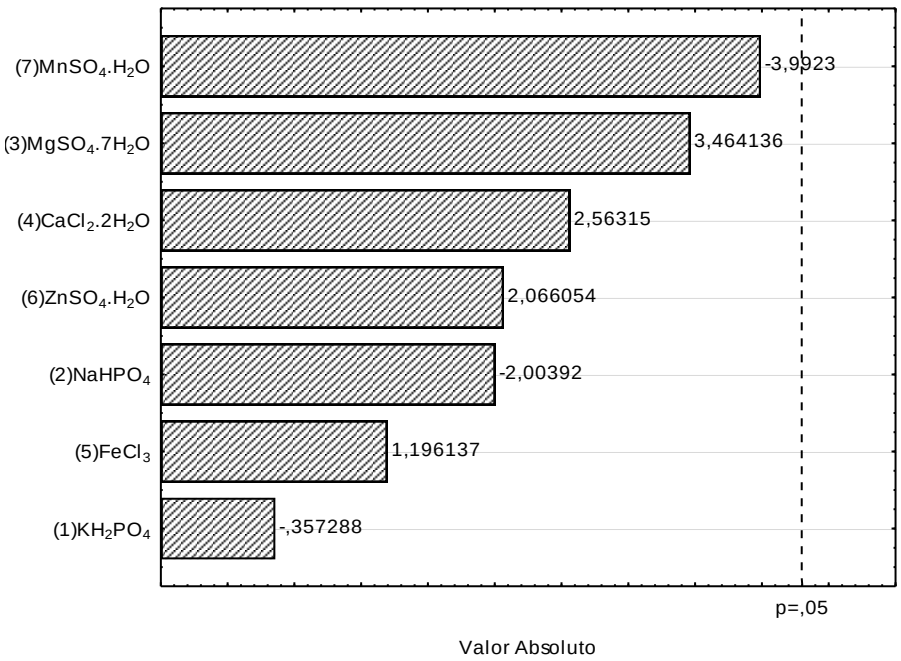


Figura V. 9: Diagrama de Pareto dos efeitos dos fatores estudados sobre a produção de biomassa no experimento de delineamento experimental de Plackett-Burman.

Uma vez que não foi observada uma influência significativamente estatística dos sais presentes no meio na produção de biomassa, pode ser entendido que o glicerol e o extrato de levedura (como fonte de nitrogênio e aminoácidos) no meio de cultivo devem ser os principais componentes responsáveis pela multiplicação celular, além de que possivelmente as enzimas responsáveis pelas principais vias de crescimento celular não são reguladas por esses íons nessas concentrações.

Segundo CRUEGER *et al.* (1990), o extrato de levedura é um excelente substrato para os micro-organismos, visto que contêm aminoácidos e peptídeos, vitaminas solúveis em água e carboidratos. Além disso, o glicerol residual pode conter elementos nutricionais como fósforo, enxofre e nitrogênio que são possíveis de serem utilizados pelos micro-organismos para o seu crescimento durante os processos fermentativos (ITO *et al.*, 2005).

Uma vantagem que pode ser observada em relação a não influência dos sais na produção de biomassa é que não irá haver um possível prejuízo dessa variável resposta mesmo modificando a concentração dos sais para uma otimização do acúmulo de lipídeos.

VI. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nesse trabalho pode-se concluir que:

- Mesmo com a redução da concentração dos sais inorgânicos do meio de produção de lipídeos em um patamar cinco vezes menor comparado ao utilizado por Santos, *et al* 2012, não foi verificado uma variação significativa de lipídeo acumulado pela levedura.

- Das seis linhagens de *Y. lipolytica* utilizada no estudo, a W29 foi a que se destacou quanto à produção de lipídeo, alcançando valores de ICL de 13648,76 em 192 horas de experimento, seguido pela cepa IMUFRJ 52301, que atingiu 11834,67 de ICL em 168 horas.

- O meio de produção de lipídeos apresentou elevada relação carbono/nitrogênio, e uma grande diminuição no pH do meio de cultura, esta podendo ser justificada pela produção de metabólitos secundários como o ácido cítrico.

- É viável o uso da glicerina como principal fonte de carbono em todo o processo desde a obtenção do inóculo até a produção de lipídeos.

- Através do delineamento de Plackett-Burman realizado para avaliar a influência dos sais presente no meio de cultivo utilizando a cepa W29, foi possível constatar que:

    - Para a resposta ICL, apenas o $FeCl_3$ não apresentou significância estatística.

    - Para a resposta biomassa, nenhuma das variáveis demonstrou efeito estatisticamente significativo.

    - Foi definido através do planejamento as concentrações ideais de sais(g/L): 1,4 KH_2PO_4, 0,5 Na_2HPO_4, 1,5 $MgSO_4.7H_2O$, 0,2 $CaCl_2.2H_2O$, 0,018 $FeCl_3.6H_2O$, 0,004 $ZnSO_4.7H_2O$ e 0,06 $MnSO4.H_2O$.

VII. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Cultivar a levedura *Y. lipolytica* W29 em meios de produção de lipídeo que apresentam diferentes e menores relações carbono/nitrogênio.

- Fazer o experimento de produção de lipídeos utilizando as células crescidas no meio de pré-inóculo YPG.

- Executar um planejamento experimental fatorial completo já utilizando a concentração selecionada dos sais e utilizando como variável os outros componentes do meio de cultura.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AKOH, C., et al. Enzymatic approach to biodieselproduction. *J Agric Food Chem*. v.55(22), p.8995-9005, 2007.

ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Resolução n.7, de 19 de março de 2008. Brasília: Diário Oficial da União, p.37-38, 2008.

ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Resolução n.6, de 16 de setembro de 2009. Brasília: Diário Oficial da União, p.37-38, 2008.

ARANDA, D., *et al*. Geração de Energia a partir de Resíduos do Lixo e Óleos Vegetais: Fontes Renováveis de Energia no Brasil. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2003.

ARRUDA, P. V.; RODRIGUES, R. C.; FELIPE, M. G. A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. *Rev Analytica*, n. 26, p.56-62, 2007.

BARTH, G., GAILLARDIN, C. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol Rev*. v.19(4), p.219-37, 1997.

BALAT, M., BALAT, H. A critical review of bio-diesel as a vehicular fuel. *Energ Convers Manage*. v49, p.2727-2741, 2008.

BEOPOULOS, A., *et al*. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Prog Lipid Res*. v.48(6), p.375-87, 2009.

BEOPOULOS, A., CHARDOT, T., NICAUD, J. Yarrowia lipolytica: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. *Biochimie*. v.91(6), p.692-696, 2009.

BEOPOULOS, A., NICAUD, J., GAILLARDIN, C. An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol*. v.90(4), p.1193-206, 2011.

BIODIESELBR.COM.BR. Biodiesel no mundo. Disponível em: http://www.biodieselbr.com/biodiesel/mundo/

BORUGADDA, V., GOUD, V. Biodiesel production from renewable feedstocks: Status and opportunities, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.16, p.4763-4784, 2012.

BOWKER, M., DAVIES, P.R., AL-MAZROAI, L.S. Photocatalytic reforming of glycerol over gold and palladium as an alternative fuel source. *Journal Catalysis Letters*, v.128, p.253-255, 2008.

CASAREGOLA. S,. *et al.* Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: Yarrowia lipolytica. *FEBS Lett*, v. 100, p.487-495, 2000.

CHANG, C., *et al.* Enhancement of rice a-amylase production in recombinant Yarrowia lipolytica.*J Ferment Bioeng*, v.84(5), p.421-442, 1997.

CHATZIFRAGKOU, A., *et al*. Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. *Energy*, v.36, p.1097–1108, 2011.

CHRISTOPHE, G., *et al*. Recent developments in microbial oils production: a possible alternative to vegetable oils for biodiesel without competition with human food?. *Braz. arch. biol. technol.* v.*55*(1), p.29-46, 2012.

COELHO, M., AMARAL, P., BELO, I. Yarrowia lipolytica: an industrial workhorse. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. p.930–944, 2010.

COSTA, R. Glicerina: o tamanho do problema. *Biodieselbr*, v.1(3), p.16-20, 2008.

DA SILVA, G., MACK, M., CONTIERO J. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol Adv*. v.27(1), p.30-9, 2008.

DEMIRBAS, A., Importance of biodiesel as transportation fuel. *Energy Policy*. V.35, p.4661-4670, 2007.

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(4), p.573–580, 2009.

FERRARI, R. A., OLIVEIRA, V. S., SCABIO, A. Biodiesel de Soja: Taxa de Conversão em Ésteres Etílicos, Caracterização Físico-química e Consumo em Gerador de Energia. *Química Nova*, v.28, p.19-23, 2005.

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

FONTES, G., *et al.* Factorial design to optimize biosurfactant production by *Yarrowia lipolytica*. J. *Biomed. Biotechnol*. p.1-8, 2010.

GAILLARDIN C., BARTH G. Yarrowia lipolytica, Nonconventional yeasts in biotechnology p.313–388. *Springer*, 1996.

GANESAN, D., RAJENDRAN, A., THANGAVELU, V. An overview on the recent advances in the transesterification of vegetable oils for biodiesel production using chemical and biocatalysts. *Rev Environ Sci Biotechnol*. v.8, p.367-394, 2009.

GLACOCHEMIE - Quo Vadis natural glycerine?. Disponível em: < http://www.glaconchemie.de/cms/upload/pdf/glaconews_englisch_0912.pdf>.

HALIM, R., DANQUAH, M., WEBLEY, P. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnology Advances*, v.30, p.709-732, 2012 .

HASSAN, M., *et al.* Influence of nitrogen and iron limitations on lipid production by Cryptococcus curvatus grown in batch and fed-batch culture, *Process Biochemistry*, v.31, p.355-361, 1996.

HOLDSWORTH, E., RATLEDGE, C. Lipid turnover in oleaginous yeasts. J Gen Microbiol. v.134, p.339–346, 1988.

ITO, T., *et al.* Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *J Biosci Bioeng*. v.100(3), p.260-5, 2005.

KRAISINTU, P., *et al.* Selection and Optimization for Lipid Production of a Newly Isolated Oleaginous Yeast, Rhodosporidium toruloides DMKU3-TK16. Kasetsart J. v.44, p.436-445. 2010

KOHLWEIN, S., PALTAUF, F. Uptake of fatty acids by the yeasts, Saccharomyces uvarum and Saccharomycopsis lipolytica. *Biochim Biophys Acta*. v.792(3), p.310-7, 1984.

KOSA, M., RAGAUSKAS, A. Lipids from heterotrophic microbes: advances in metabolism research. *Trends Biotechnol*. v.29, p.53-61, 2011.

KURTZMAN, C. New species and a new combination in the *Hyphopichia* and *Yarrowia* yeast clades. *Antonie van Leeuwenhoek* . v.88, p.121–130, 2005.

LAZAR, Z., WALCZAK, E., ROBAK M. Simultaneous production of citric acid and invertase by *Yarrowia lipolytica* SUC+ transformants. *Bioresour Technol*. v.102(13), p.6982-6989, 2011.

LEE, G,. *et al.* New finding and optimal production of a novel extracellular alkaline lipase from Yarrowia lipolytica NRRL Y-2178. *J Microbiol Biotechnol*, v.17(6), p.1054-1057, 2007.

LIN, L., *et al*. Opportunities and challenges for biodiesel fuel. *Applied Energy*. v.88, p.1020–1031, 2011.

LIU, L., ALPER, H. Draft Genome Sequence of the Oleaginous Yeast *Yarrowia lipolytica* PO1f, a Commonly Used Metabolic Engineering Host. *Genome Announc*. l v.2(4), 2014.

LÓPES, F., REVILLA, J., MUNILLA, M. Manual dos Derivados da Cana-de-Açúcar: diversificação, matérias-primas, derivados do bagaço do melaço, outros derivados, resíduos, energia. *ABIPTI*, v.5, p.393-397, 1999.

MAKRI, A., FAKAS, S., AGGELIS, G. Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeated batch cultures. Bioresour Technol. v.101(7), p.2351–2358, 2010.

MMA - MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (2006). – Identificação das Alternativas Tecnológicas de Controle, Tratamento e Reuso de Resíduos Industriais. Disponível em: < http://www.mma.gov.br/estruturas/sqa_pnla/_arquivos/item_8.pdf>.

MORAIS, B., *et al*. A new fluorescence-based method identifies protein phosphatases regulating lipid droplet metabolismo. *PLos ONE,* v.5, n.10, 2010.

MORGUNOV, I., *et al.* Pyruvic acid production by a thiamine auxotroph of Yarrowia lipolytica. *Process Biochem*. v.39(11), p.1469–1474, 2004.

MOTA, C., da SILVA, C., GONÇALVES, V. Gliceroquímica: Novos Produtos e Processos a partir da Glicerina de Produção de Biodiesel. *Quimica Nova*, v.32, p.639-649, 2009.

OLIVEIRA, L., *et al.* Analysis of the sustainability of using wastes in the Brazilian power industry, *Renewable and Sustainable Energy.* v.12, p.883-890, 2008.

PAPANIKOLAOU, S., AGGELIS, G. Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. *Bioresour Technol.* v.82(1), p.43-49, 2002.

PAPANIKOLAOU, S., *et al*. Accumulation of acocoa-butter-like lipid by Yarrowia lipolytica cultivated on agro-industrial residues. *Curr Microbiol*. v.46, p.124-30

PAPANIKOLAOU, S., *et al*. Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivative of animal fat in batch cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v.58(3), p.308–312, 2002.

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(1), p.60-71, 2008.

PAPANIKOLAOU, S., AGGELIS, G. Biotechnological valorization of biodiesel derived glycerol waste through production of single cell oil and citric acid by *Yarrowia lipolytica*. *Lipid Technol.* v.21, p.83–87, 2009.

PAPANIKOLAOU, S., AGGELIS, G. Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *Eur J Lipid Sci Technol* 113: 1031-1051, 2011.

PINTO, A., *et al*. Biodiesel: an overview. *J. Braz. Chem. Soc*., v.16, p.1313-1330, 2005.

POUSA, G., SANTOS, A., SUAREZ, P. History and policy of biodiesel in Brazil. *Energy Policy*. v.35, p.5393–5398, 2007.

QUINTELLA, C., *et al*. Cadeia do biodiesel da bancada à indústria: uma visão geral com prospecção de tarefas e oportunidades para P&D&I. *Química Nova*, v.*32*(3), p.793-808, 2009.

QU, W., *et al*. Study on the culture and fermentation conditions for the high lipid production by *Lipomyces starkeyi*. *J Liaoning Normal Univ*. v.29, p.88–92, 2006

RASCHKE, D., KNORR, D. Rapid monitoring of cell size, vitality and lipid droplet development in the oleaginous yeast *Waltomyces lipofer*. *Journal of Microbiological Methods*, v.79, p.178-183, 2009.

RATLEDGE, C. Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. *Biochemical Society Transactions*, v.30, p.1047–1050, 2002.

RATLEDGE, C, WYNN J. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Adv Appl Microbiol*. v.51 p.1-51, 2002.

RATLEDGE, C,. Biochemistry, stoichiometry, substrates and economics. em Single cell oil, Moreton, R. S., Ed. Harlow, Longmans. *London: Longman Scientific & Technical*. p.33-70, 1988.

ROSSI, M., *et al*. Getting Lipids for Biodiesel Production from Oleaginous Fungi, Biodiesel - Feedstocks and Processing Technologies, Ed. Stoytcheva, *M., InTech*. 2011.

RYMOWICZ, W., RYWINSKA, A., GLADKOWSKI, W. Simultaneous production of citric acid and erythritol from crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* Wratislavia K1. *Chem Pap*. v.62(3), p.239-246, 2008.

RYMOWICZ, W., RYWINSKA, A., MARCINIKIEWICZ, M. High yield production of erythritol from raw glycerol in fed-batch cultures *of Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Lett*, v.31, p.377-380, 2009.

RYWINSKA, A., *et al.* Glycerol as a promising substrate for *Yarrowia lipolytica* biotechnological applications. *Biomass Bioenergy*. v.66, p. 48:148–66, 2013.

RYWINSKA, A., RYMOWICZ, W., MARCINKIEWICZ, M. Valorization of raw glycerol for citric acid production by *Yarrowia lipolytica* yeast. *Electron J Biotechnol*. v.13(4), 2010.

SALVI, B., PANWAR, N. Biodiesel resources and production technologies – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. v.16(6), p.3680-3689, 2012.

SANTOS, J. BIODIESEL DE BABAÇU: Avaliação Térmica, Oxidativa e Misturas Binárias. João Pessoa, Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), 2008. Tese de Doutorado.

SANTOS, R,. *et al.* Estudo da produção de lipídio intracelular em levedura como matéria-prima alternativa na síntese de biodiesel In: COBEQ 2012, Búzios, Rio de Janeiro, Brasil, 2012.

SCOTT, S,. *et al*. Use of raw glycerol to produce oil rich in polyunsaturated fatty acids by a thraustochytrid. *Enzyme Microb Technol*. v.48(3), p.267-272, 2011.

SIDS-Screening Information Data Set. Glycerol, CAS N°: 56-81-5. SIDS Initial Assessment Report. UNEP Publications. p.26-28, 2002.

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

SUAREZ, P. *et al*. Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: desafios tecnológicos para viabilizá-los. *Química Nova*, *32*(3), 768-775, 2009 .

SUBRAMANIAM, R., *et al*. Microbial lipids from renewable resources: production and characterization. *J Ind Microbiol Biotechnol*. v.37(12), p.1271-87, 2010.

TACCARI, M., *et al*. Screening of yeasts for growth on crude glycerol and optimization of biomass production. *Bioresour Technol*. v.110, p.488-495, 2012.

TOMASZEWSKA, L., RYWINSKA, A., GLADKOWSKI, W. Production of erythritol and mannitol by Yarrowia lipolytica yeast in media containing glycerol. *J Ind Microbiol Biotechnol*, v.39, p.1333-1343, 2012.

USDA-United States Department of Agriculture. EU Biofuels Annual 2013. EU Biofuels Annual 2013. Disponível em <http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Biofuels%20Annual_The%20Hague_EU-27_8-13-2013.pdf>.

WYNN, J., *et al*. Biochemical events leading to the diversion of carbon into storage lipids in the oleaginous fungi *Mucor circinelloides* and *Mortierella alpin*. *Microbiology*, v.147 (10), pp.2857-2864, 2001

YU, Z., *et al*. Enhanced a-ketoglutaric acid production in Yarrowia lipolytica WSH-Z06 by an improved integrated fed-batch strategy. *Bioresour Technol*, v.114, p.597-602, 2012.

YUZBASHEV, T., *et al*. Production of succinic acid at low pH by a recombinant strain of the aerobic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Bioeng*, v.107(4), p.673-682, 2010.

ZWEYTICK D., ATHENTEADT K., DAUM G. Intracellular lipid particles of eukaryotic cells. Biochim. Biophys .v.1469 p.101–120, 2000.