UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

PRISCILA SANTOS CORRÊA

INFLUÊNCIA DA ESTRATÉGIA DE AERAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ÓLEO MICROBIANO E POLIÓIS POR *Yarrowia lipolytica*

RIO DE JANEIRO
2017

PRISCILA SANTOS CORRÊA

INFLUÊNCIA DA ESTRATÉGIA DE AERAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ÓLEO MICROBIANO E POLIÓIS POR *Yarrowia lipolytica*

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.

Orientadora: Profª. Drª. Maria Alice Zarur Coelho.

Co-orientadora: Drª. Etel Kameda.

Rio de Janeiro, RJ – Brasil
24 de Março de 2017

CIP - Catalogação na Publicação

S945i

Santos Corrêa, Priscila
Influência da estratégia de aeração na produção de óleo microbiano e polióis por Yarrowia lipolytica. / Priscila Santos Corrêa. -- Rio de Janeiro, 2017.
75 f.

Orientadora: Maria Alice Zarur Coelho.
Coorientadora: Etel Kameda.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2017.

1. Yarrowia lipolytica. 2. kLa. 3. Nile Red. 4. Óleo microbiano. 5. Polióis. I. Zarur Coelho, Maria Alice, orient. II. Kameda, Etel, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

INFLUÊNCIA DA ESTRATÉGIA DE AERAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ÓLEO MICROBIANO E POLIÓIS POR *Yarrowia lipolytica*

Priscila Santos Corrêa

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.
(Orientadora – presidente da banca)

Etel Kameda. D.Sc.
(Co-orientadora)

Banca Examinadora:

Prof.ª. Andrea Medeiro Salgado. D.Sc.

Verônica Regina de Oliveira Lopes Peclat. D.Sc.

Prof.ª. Gizele Cardoso Fontes Sant'Ana. D.Sc.

Rio de Janeiro, RJ – Brasil
24 de Março de 2017

"Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less."

Marie Curie

DEDICATÓRIA

DEDICO este trabalho à minha amada mãe Rosilene, a mulher mais corajosa, forte, batalhadora, guerreira e incrível que conheço e a todas as pessoas que ousam sair de suas zonas de conforto.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Rosilene por todo apoio, suporte e amor. Por ser um exemplo de garra e, definitivamente, uma figura feminina que tenho muito orgulho em me espelhar. Obrigada por todas as renúncias que fez em meu nome, pelo seu amor puro incondicional, por sempre acreditar no meu potencial e pelo seu papel sempre fundamental nas minhas conquistas.

Á minha irmã Daniele, por toda compreensão, amor e carinho. Por ser a força quando eu perdia as minhas. Ao meu "paidrasto" Marco, por ser um paizão e estar sempre presente quando mais precisei. À minha amada Amanda, que nesses quase 5 anos preencheu todos os meus dias com muito amor, apoio e compreensão.

À minha família e amigos, que não desistiram de mim e souberam compreender as minhas intermináveis ausências.

Aos meus amados cremosos, que tornaram o E-103 o melhor ambiente de trabalho da EQ, Eliana, Ariane, Júlio, Larissa, Ana Bia, Rose, Luciana, Caê, Richard, Verônica, Mike, Marselle, Pietro, Vanessa, Andressa e em especial ao Felipe, por toda ajuda com o biorreator e por ter me levado para esse lab maravilhoso, à Fernanda, rainha e sempre muito solícita, obrigada por toda ajuda e à Mari, pela ajuda decisiva com o HPLC. E não poderia deixar de agradecer também a todos pelos (sempre bem-vindos) drinks e problematizações!!!!!

À minha orientadora Maria Alice por todos os ensinamentos desde a época da graduação, paciência, compreensão e por ser a luz a iluminar minha escura atmosfera pessimista. À co-orientadora mais geek que existe, Etel, por todo suporte e por agregar conhecimentos além da academia.

Ao grupo BIOSE, por todo suporte e companheirismo. À Ju Mercadante, minha dupla e companheira em praticamente todas as disciplinas do mestrado. Ao Lannes, por todas as conversas, risadas e pela melhor aula e logomarca que Aproveitamento Biotecnológico de Recursos Naturais já teve.

À grande energia que rege o mundo, por sempre existirem novas possibilidades.

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.

INFLUÊNCIA DA ESTRATÉGIA DE AERAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ÓLEO MICROBIANO E POLIÓIS POR *Yarrowia lipolytica*

Priscila Santos Corrêa

Março de 2017

Orientadora: Profª. Drª. Maria Alice Zarur Coelho.
Co-orientadora: Drª. Etel Kameda.

Yarrowia lipolytica é uma levedura estritamente aeróbia capaz de utilizar glicerol como fonte de carbono para a produção de uma gama de produtos extracelulares, tais como, ácido cítrico, manitol e eritritol. Além disso, em determinadas condições, pode acumular reservas lipídicas dentro de suas células. A composição deste bio-óleo é similar ao do óleo de soja, principal matéria-prima da produção de biodiesel no Brasil. Desta forma, esse trabalho se propôs a estudar os fatores que influenciam o acúmulo de bio-óleo em *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, principalmente em termos de transferência de oxigênio no sistema, com a finalidade de reaproveitamento do glicerol, matéria-prima deste processo. Adicionalmente, os produtos extracelulares do metabolismo (ácido cítrico, manitol e eritritol) foram quantificados. Utilizando uma estratégia de redução da vazão de ar de 2,0 para 0,67 vvm na fase estacionária, obteve-se a máxima produção de bio-óleo determinada por citometria de fluxo, 925,91 de fluorescência de *Nile Red*. Mantendo-se todo o cultivo com a menor vazão de ar estudada (0,67 vvm), a produção de bio-óleo foi correspondente a 24% em peso seco de biomassa gerada em 96 horas. Em relação à produção de eritritol, o maior valor obtido (33,56 $g.L^{-1}$) foi alcançado apenas aumentando a razão C/N, sem necessidade de estresse osmótico por adição de alta concentração de NaCl. Deste modo, o estudo realizado mostrou-se promissor tanto para o acúmulo de bio-óleo quanto para a produção de eritritol em cepa selvagem de *Y. lipolytica*.

Abstract of Dissertation presented to Post-Graduation Program in Chemical and Biochemical Process Technology – EQ/UFRJ as partial fulfillment of requirements for the degree of Master of Science.

INFLUENCE OF THE STRATEGY OF AERATION IN THE PRODUCTION OF MICROBIAL OIL AND POLYOLS BY *Yarrowia lipolytica*

Priscila Santos Corrêa

March 2017

Supervisors: Profª Drª. Maria Alice Zarur Coelho.
Drª. Etel Kameda.

Yarrowia lipolytica is strictly aerobic yeast and it is able to use glycerol as carbon source to produce a range of extracellular products such as citric acid, mannitol and erythritol. In addition, in certain conditions this yeast can accumulate lipids into their cells. This bio-oil composition is similar to soybean oil that is the main feedstock for biodiesel production in Brazil. Therefore, this work proposes to study factors that influence bio-oil accumulation in *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682. One of main factor is oxygen transfer into the system in order to reuse the glycerol as raw material for biofuel production. Moreover, extracellular products (citric acid, mannitol and erythritol) from the process were also quantified. By using a strategy of aeration reduction from 2,0 to 0,67 vvm during stationary phase, it was obtained maximum production of bio-oil, 925.91 *Nile Red* fluorescence, measured by flow cytometry. By keeping the lower aeration rate tested (0.67 vvm), bio-oil production corresponded to 24% by dry weight of biomass generated for 96 hours. In relation to the erythritol production, the highest value obtained (33.56 $g.L^{-1}$) was reached only by increasing the C/N ratio and there was no need to add a high concentration of NaCl to induce osmotic stress. Thus, this study was promising both for oil accumulation and for erythritol production by a *Y. lipolytica* wild strain.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIAÇÕES

ACC -acil-CoA carboxilase

Ac-CoA - acetil-CoenzimaA

ACL - ATP citrato liase

ADP – adenosina difosfato

AG – Ácidos graxos

AMP – adenosina monofosfato

ATP – adenosina trifosfato

Ci: concentração de oxigênio dissolvido na interface gás-líquido

CL – corpúsculo lipídico

C_L: concentração de oxigênio dissolvido no seio do líquido

CS – citrato sintase

C/N – razão carbono/nitrogênio

EMP – Embden Meyerhof Parnas pathway

G-3-P DH – 3-P-glicerol desidrogenase

GK – glicerol quinase

ICDH - isocitrato desidrogenase

IMP – inosina monofosfato

N_A: fluxo de oxigênio por área

NAD – dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

OD – oxigênio dissolvido

PC – piruvato carboxilase

PD – piruvato desidrogenase

Pg: pressão parcial do oxigênio no seio da fase gasosa

Pi: pressão parcial do oxigênio na interface gás-líquido

P_l: pressão parcial do oxigênio no líquido

RE - retículo endoplasmático

SH – substrato hidrofóbico

TAG – triacilglicerol

$\delta_{L:}$ espessura do filme líquido

δv: espessura do filme gasoso

H: constante de Henry

C_L - Concentração de oxigênio dissolvido na fase líquida

TTO - taxa de transferência de oxigênio

TCO - taxa de consumo de oxigênio

vvm – volume de ar por volume de meio por minuto

ÍNDICE GERAL

1 Introdução 1

2 Objetivos 3

3 Revisão Bibliográfica 4

3.1 *Yarrowia lipolytica* 4

3.2 Glicerol 6

3.3 Óleo Microbiano 10

3.3.1 Vias de acúmulo de lipídeos 11

3.3.1.1 Via de síntese de novo 12

3.3.1.2 Via de acúmulo ex novo 13

3.4 Produtos extracelulares 14

3.4.1 Ácido Cítrico 14

3.4.2 Eritritol 16

3.4.3 Manitol 18

3.5 Respiração microbiana e a transferência de oxigênio em meios líquidos 18

3.5.1 Coeficiente volumétrico global de transferência de oxigênio (k_La) 21

3.5.1.1 Determinação do k_La por métodos químicos 25

3.5.1.1.1 Método da oxidação de sulfito 25

3.5.1.1.2 Método de absorção de CO_2 26

3.5.1.2 Determinação do kLa por métodos físicos 26

3.5.1.2.1 Método da desgaseificação 26

3.5.1.2.2 Método dinâmico 28

4 Materiais e Métodos 30

4.1 Materiais 30

4.2 Equipamentos 30

4.3 Meios de cultivo 31

4.4 Micro-organismo 31

4.4.1 Preservação 31

4.5 Métodos analíticos 32
4.5.1 Determinação de peso seco 32
4.5.2 Determinação do kLa 32
4.5.3 Determinação do teor lipídico por citometria de fluxo 34
4.5.4 Determinação do teor lipídico por espectrofluorimetria 35
4.5.5 Quantificação de componentes extracelulares 36
4.6 Pré-inóculos 36
4.7 Cultivos em Erlenmeyer 36
4.8 Cultivos em biorreator 36
5 Resultados e Discussões 38
5.1 Cultivos em Erlenmeyer 38
5.2 Determinação do kLa 40
5.2.1 Influência do equipamento de aeração 40
5.2.2 Influência da vazão de ar e da velocidade de agitação 43
5.3 Experimentos em biorreator 45
5.4 Determinação do teor lipídico por citometria de fluxo 47
5.4.1 Influência da vazão de ar 47
5.4.2 Influência da relação C/N 51
5.5 Determinação do teor lipídico por espectrofluorimetria 53
5.5.1 Influência da vazão de ar 53
5.6 Comparação entre a determinação do teor lipídico por citometria de fluxo e espectrofluorimetria 55
5.7 Quantificação de componentes extracelulares 57
5.7.1 Consumo de glicerol 57
5.7.2 Produção de ácido cítrico/isocítrico 57
5.7.3 Produção de manitol e eritritol 58
5.7.3.1 Experimento a 0,67 vvm. 58
5.7.3.2 Experimentos a 1,33 vvm 59
5.7.3.3 Experimentos a 2,0 vvm e 2,0 vvm por 24 horas e 0,67 vvm (24-96h). 61

5.7.3.4 Efeito do aumento da relação C/N 61

5.8 Considerações Finais 64

6 Conclusões 67

7 Sugestões para trabalhos futuros 68

8 Referências Bibliográficas 69

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 Projeções para o complexo de soja brasileiro..... 2
Tabela 2 Propriedades físico-químicas do glicerol à 20 °C. 6
Tabela 3 Produtos obtidos no cultivo de *Yarrowia lipolytica* utilizando glicerol como fonte de carbono..... 10
Tabela 4 Composição (% em peso) de metil ésteres de ácidos graxos de óleos vegetais e microbianos. 11
Tabela 5 Solubilidade do oxigênio em água pura a 1 atm em diversas temperaturas. 19
Tabela 6 Resumo das condições de processo e resultados obtidos nos experimentos realizados em biorreator a 650 rpm e 28ºC em 96 horas de cultivo de *Y. lipolytica*..... 46
Tabela 7 Vazão de ar, taxa específica de crescimento (μ), concentração final de biomassa (Xf) e lipídeos totais em 96 horas de cultivo. 51
Tabela 8 Vazão de ar, taxa específica de crescimento (μ), concentração final de biomassa (Xf), rendimento de substrato em produto ($Y_{P/S}$) e concentração de equivalente de trioleína em 96 horas de cultivo..... 55
Tabela 9 Perfil de consumo de glicerol para diferentes concentrações iniciais de biomassa e vazões de ar em sistema agitado a 650 rpm, 28ºC e relação C/N 50:1. 57
Tabela 10 Concentração final de ácido cítrico/isocítrico em diferentes condições de processo..... 58
Tabela 11 Concentração inicial de células, concentração final de eritritol e manitol e rendimento de glicerol em manitol e eritritol nos experimentos a 1,33 vvm, 650 rpm e C/N 50:1. 59
Tabela 12 Concentração inicial de células, concentração final de eritritol e manitol e rendimento de glicerol em manitol e eritritol nos experimentos a 2,00 vvm , 650 rpm e C/N 50:1. 61
Tabela 13 Comparação de rendimento de glicerol em manitol e eritritol para diferentes concentrações de NaCl..... 62
Tabela 14 Concentração inicial de glicerol e células e produção de ácido cítrico/isocítrico, manitol, eritritol e bio-óleo em diferentes vazões de ar. Experimentos com C/N 50:1 , 650 rpm e a 28º C..... 65

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 Substratos, fontes de nitrogênio, tipo de fermentação e produtos no cultivo de *Yarrowia lipolytica*..... 6
Quadro 2 Aplicações do ácido cítrico e suas funções em diferentes indústrias. 15
Quadro 3 Reagentes utilizados na composição dos meios de cultivo e seus respectivos fabricantes. .. 30
Quadro 4 Diferentes meios de cultivo para produção de eritritol e manitol..... 63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Participação percentual das matérias-primas para produção de biodiesel no Brasil..... 1
Figura 2 Morfologia celular e da colônia em cepas de Y. lipolytica. (A) Morfologia da colônia da cepa selvagem H222 (Fil+) e um mutante filamentoso (Fil-) em meio rico em YPD. (B) Morfologia celular leveduriforme em YNB (imagem superior) forma filamentosa em presença de soro (inferior). 4
Figura 3 Produtos obtidos à partir de glicerol por via bioquímica, química e termoquímica. 7
Figura 4 Reação de saponificação..... 7
Figura 5 Reação de hidrólise de triglicerídeos..... 8
Figura 6 Reação de transesterificação. R – grupamento alquila contendo em média 18 a 22 carbonos. R1 – grupamento alquila do álcool utilizado..... 8
Figura 7 Produção anual de biodiesel no Brasil..... 9
Figura 8 Projeção de produção e consumo de óleo diesel no Brasil. 9
Figura 9 Imagem de microscopia ótica de fluorescência mostrando os corpos lipídicos de células de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 coradas com o fluorocromo *Nile Red* utilizando microscópio ótico Nikon modelo Eclipse E200 acoplado a câmera Evolution VF (1000x de aumento). Fonte: MARTINS, 2013..... 10
Figura 10 Vias metabólicas envolvidas no catabolismo de glicerol e biossíntese de lipídeo intracelular e ácido cítrico extracelular por *Y. lipolytica*. Limitação de nitrogênio causa um rápido declínio na concentração de AMP, que é clivada pela AMP-desaminase. Essa etapa resulta na inibição de NAD+-ICDH e consequente acúmulo de ác. cítrico na mitocôndria. Quando a concentração de ácido cítrico atinge um valor crítico, este é secretado para o citosol. Na fase lipogênica o ác. cítrico é clivado por ACL gerando oxaloacetato e Ac-CoA, precursor para a biossíntese de ácidos graxos. Durante a transição da fase lipogênica para a produção de ác. cítrico, quantidades significativas de glicerol são convertidas em ácido cítrico em simultâneo com a renovação ("*turnover*") de lipídeos. TAG: triacilglicerol; AMP – adenosina monofosfato; ACL - ATP citrato liase; ICDH - isocitrato desidrogenase; Ac-CoA – acetil coenzima A; ACC -acil-CoA carboxilase; CS – citrato sintase; PC – piruvato carboxilase; PD – piruvato desidrogenase; NAD – dinucleotídeo de nicotinamida e adenina; ATP – adenosina trifosfato; ADP – adenosina difosfato; EMP – Embden Meyerhof Parnas pathway; G-3-P DH – 3-P-glicerol desidrogenase; GK – glicerol quinase. Fonte: adaptado Makri et al., 2010. 12
Figura 11 Representação esquemática da assimilação de substratos hidrofóbicos (SH) por Y. lipolytica (1a, 1b). Liposan reduz o diâmetro das emulsões e gotículas hidrofóbicas formadas pelo SH. (1b) TAGs são clivados pela lipase extracelular gerando ácidos graxos (AGs). (2) Gotículas do substrato ligam-se a protrusões da superfície celular. (3) Transportadores mediam a entrada e saída dessas gotículas na membrana celular. (4) Modificação do SH (ω-oxidação). (5) Degradação por β-oxidação

ou (6) estocagem nos corpúsculos lipídicos como TAGs; (7) mobilização de TAG depois da hidrólise por lipases. Protrusões: estruturas da superfície celular que permitem a ligação das gotículas hidrofóbicas. Fonte: adaptado BEOPOULOS et al., 2009. 14
Figura 12 Estrutura química do ácido cítrico. 15
Figura 13 Estrutura química do eritritol. 16
Figura 14 Via metabólica proposta para a produção de polióis por *Y. lipolytica*. TCA: ciclo dos ácidos tricarboxílicos; (1) glicerol quinase; (2) NAD+ glicerol-3-P desidrogenase; (3) manitol desidrogenase; (4) hexoquinase; (5) manitol-1-P desidrogenase; (6) manitol-1-fosfatase; (7) transcetolase; (8) transaldolase; (9) arabitol desidrogenase; (10) eritrose redutase. Fonte: DO NASCIMENTO, 2016. . 17
Figura 15 Estrutura química do manitol. 18
Figura 16 Resistências relativas à dissolução e consumo de oxigênio em sistemas aeróbicos. (1) Problema de dissolução ou transferência do oxigênio do gás para o líquido; (2) Problema de eventual difusão do oxigênio na interface gás-líquido; (3) Problema de difusão do oxigênio através de uma película líquida estagnada; (4) Resistência associada à difusão do oxigênio até as células; (5) Resistência promovida pela película líquida estagnada ao redor da célula; (6) Resistência da membrana celular; (7) Resistência resultante da difusão do oxigênio no citoplasma; (8) Resistência relativa a velocidade da reação de consumo do O_2. 20
Figura 17 Resistências a transferência de oxigênio da bolha até a célula em biossistemas aerados. 22
Figura 18 Transferência de oxigênio na interface gás-líquido. Pg: pressão parcial do oxigênio no seio da fase gasosa; Pi: pressão parcial do oxigênio na interface; P_l: pressão parcial do oxigênio no líquido; Ci: concentração de oxigênio dissolvido na interface; C_L: concentração de oxigênio dissolvido no seio do líquido; N_A: fluxo de oxigênio por área; δv e δ_L: espessura do filme gasoso e líquido, respectivamente. 22
Figura 19 Representação esquemática da interface gás-líquido, concentrações e coeficientes de transferência de massa K_L, k_L e k_G. Fonte: GARCIA-OCHOA & GOMES, 2009. 24
Figura 20 Demonstração do perfil de concentração de oxigênio dissolvido no método da desgaseificação. 27
Figura 21 Gráfico de $\ln(1-C_L/C_L^*)$ em função do tempo. 28
Figura 22 Biorreator TECNAL® em funcionamento. 1: Módulo de aeração; 2: Módulo de bombas; 3: Módulo de controle; 4: Computador acoplado. 33
Figura 23 Módulo de calibração do sensor de oxigênio dissolvido. 33
Figura 24 Configuração do equipamento: distância entre os impelidores e entre o impelidor e a saída de ar. 34
Figura 25 Gráfico da resposta obtida pelo *software* quando aplicado o método da desgaseificação. 34
Figura 26 Faixa de linearidade de fluorescência para diferentes concentrações de trioleína. 35
Figura 27 Crescimento celular em 96 horas de cultivo em erlenmeyer a 250 rpm e 28ºC (triplicata).. 38

Figura 28 Determinação de lipídeos polares, neutros e totais por fluorescência de *Nile Red* e crescimento de biomassa a 28ºC e 250 rpm (experimento 1). 39
Figura 29 Determinação de lipídeos polares, neutros e totais por fluorescência de *Nile Red* e crescimento de biomassa a 28ºC e 250 rpm (experimento 2). 39
Figura 30 Determinação de lipídeos polares, neutros e totais por fluorescência de Nile Red e crescimento de biomassa a 28ºC e 250 rpm (experimento 3). 40
Figura 31 Determinação do k_La em água. (a) módulo de calibração do sensor de OD embutido; (b) módulo separado. 41
Figura 32 Determinação do k_La em meio mineral sem glicerol. (a) módulo de calibração do sensor de OD embutido; (b) módulo separado. 42
Figura 33 Determinação do k_La em meio mineral contendo glicerol na razão C/N 50:1. (a) módulo de calibração do sensor de OD embutido; (b) módulo separado. 42
Figura 34 Determinação do k_La em água, meio mineral sem glicerol e com glicerol nas razões C/N 50:1, 75:1 e 100:1 a 350 rpm. 43
Figura 35 Determinação do k_La em água, meio mineral sem glicerol e com glicerol nas razões C/N 50:1, 75:1 e 100:1 a 500 rpm. 44
Figura 36 Determinação do k_La em água, meio mineral sem glicerol e com glicerol nas razões C/N 50:1, 75:1 e 100:1 a 650 rpm. 44
Figura 37 Determinação do k_La em água, meio mineral sem glicerol e com glicerol nas razões C/N 50:1, 75:1 e 100:1 a 800 rpm. 45
Figura 38 Determinação de lipídeos polares, neutros e totais por fluorescência de *Nile Red* e crescimento 47
Figura 39 Determinação de lipídeos polares, neutros e totais por fluorescência de *Nile Red* e concentração de biomassa em 96h de cultivo a 2,00 vvm. 48
Figura 40 Porcentagem de oxigênio dissolvido ao longo do tempo no cultivo a 1,33 vvm. 48
Figura 41 Determinação de lipídeos polares, neutros e totais por fluorescência de *Nile Red* e crescimento de biomassa em 96h de cultivo a 2,00 vvm por 24 horas e 0,67 vvm (24-96h). 50
Figura 42 Porcentagem de oxigênio dissolvido ao longo do tempo no cultivo a 2,00 vvm por 24 horas e 0,67 vvm (24-96h). 51
Figura 43 Determinação de lipídeos polares, neutros e totais por fluorescência de *Nile Red* e crescimento de biomassa em 96h de cultivo a 2,0 vvm e C/N 100:1. 52
Figura 44 Porcentagem de oxigênio dissolvido ao longo do tempo no cultivo a 2,00 vvm e relação C/N 100:1. 52
Figura 45 Concentração equivalente de trioleína em 96 horas de cultivo a 650 rpm, relação C/N 50:1 e variando a vazão de ar. 53
Figura 46 Porcentagem de oxigênio dissolvido ao longo do tempo no cultivo a 0,67 vvm, relação C/N 50:1 e 650 rpm. 54

Figura 47 Porcentagem de oxigênio dissolvido ao longo do tempo no cultivo a 1,33 vvm, relação C/N 50:1 e 650 rpm. 54
Figura 48 Porcentagem de oxigênio dissolvido ao longo do tempo no cultivo a 2,0 vvm, relação C/N 50:1 e 650 rpm. 55
Figura 49 Perfil de produção de lipídeos neutros por citometria de fluxo e espectrofluriorimetria para uma mesma condição de processo. 56
Figura 50 Curva de correlação entre a metodologia de citometria de fluxo e espectrofluorimetria em cultivo a 1,33 vvm, 650 rpm e relação C/N 50:1. 56
Figura 51 Concentração de manitol, eritritol e biomassa no cultivo de Y. lipolytica a 0,67 vvm, 650 rpm e C/N 50:1 por 96 horas. 59
Figura 52 Concentração de manitol, eritritol e biomassa no cultivo de *Y. lipolytica* a 1,33 vvm, 650 rpm e C/N 50:1 por 96 horas (Experimento 2ª)..... 60
Figura 53 Concentração de manitol, eritritol e biomassa no cultivo de *Y. lipolytica* a 1,33 vvm, 650 rpm e C/N 50:1 por 96 horas (Experimento 3[b]). 60
Figura 54 Concentração de manitol, eritritol e biomassa no cultivo de *Y. lipolytica* a 1,33 vvm, 650 rpm e C/N 50:1 por 96 horas (Experimento 4[b]). 61
Figura 55 Concentração de manitol, eritritol e biomassa no cultivo de *Y. lipolytica* a 2,0 vvm, 650 rpm e C/N 100:1 por 96 horas. 62
Figura 56 Variação de pH no cultivo de *Y. lipolytica* a 2,0 vvm, C/N 100:1 e 650 rpm..... 63
Figura 57 kLa do sistema a 650 rpm em diferentes aerações e relação carbono/nitrogênio inicial. 64

1 Introdução

Yarrowia lipolytica é uma levedura oleaginosa não convencional, estritamente aeróbia e que possui capacidade metabólica de assimilar diversas fontes de carbono, dentre elas destaca-se o glicerol, coproduto do processo de transesterificação para produção de biodiesel (CHRISTOPHE et al., 2012). Em bioprocessos aeróbios, o coeficiente volumétrico global de transferência de oxigênio (k_La) é um dos mais importantes parâmetros estudados, uma vez que a disponibilidade de oxigênio é um fator que influencia no metabolismo do micro-organismo e consequentemente na produtividade do que se deseja produzir (LORENZINI, 2012).

Em condições de limitação por nitrogênio, esta levedura é capaz de acumular bio-óleo intracelular, cuja composição de ácidos graxos é similar à do óleo de soja, matéria-prima majoritariamente utilizada na produção do biodiesel brasileiro (Figura 1) (EPE, 2015). Ou seja, é capaz de utilizar o coproduto gerado (glicerol) para obter a matéria-prima (bio-óleo) para produção de biodiesel. Além da produção de bio-óleo, diversos outros produtos podem ser obtidos por esta levedura como, por exemplo, ácido cítrico e polióis como manitol e eritritol (KUO et al., 2013).

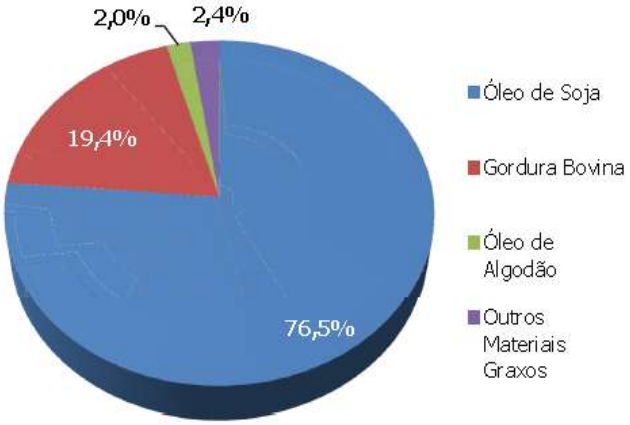

Figura 1 Participação percentual das matérias-primas para produção de biodiesel no Brasil.
Fonte: EPE, 2015.

Recente estudo publicado pela ABIOVE (2016) projeta que com a aprovação da Lei n° 13.263/2016, que estipula um aumento percentual gradativo de adição de biodiesel ao diesel brasileiro, se a produção de soja permanecer próxima ao patamar de 2016 seria necessário o comprometimento de aproximadamente 32% do óleo de soja produzido no país para suprir a demanda de biodiesel em 2017 e chegando a cerca de 61% em 2030, conforme os dados apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 Projeções para o complexo de soja brasileiro.

Complexo Soja	2016	2020	2025	2030	Unidade (milhões)	Δ% 2016-30 (a.a.)
Produção de soja (safra)	96,6	114,7	133,3	164,9	T	4,2
Área plantada	32,4	36,2	39,2	44,6	Há	2,5
Produtividade	3,0	3,2	3,4	3,7	t/há	1,6
Quantidade de soja processada	40,7	55,1	77,3	107,2	T	7,7
Parcela da safra processada	40	48	58	65	%	3,8
Produção de óleo de soja	8,1	10,2	14,3	19,9	T	7,1
Óleo de soja destinado ao biodiesel	2,6	4,3	7,7	12,2	T	12,6
Óleo de soja consumo doméstico exceto biodiesel	3,9	4,2	4,6	5,3	T	2,4
Óleo de soja mercado externo	1,6	1,6	1,9	2,4	T	3,2

Fonte: adaptado ABIOVE, 2016.

Deste modo, para expandir a produção de biodiesel visando atender à crescente demanda, esta indústria tem o desafio de escoar a produção de glicerol bruto, aproximadamente 10% da massa de biodiesel gerado, e buscar fontes alternativas de matéria-prima. E com isso, diversos estudos foram e continuam sendo desenvolvidos objetivando o aproveitamento do glicerol, que já encontra uma saturação no mercado convencional, além de novas matérias-primas com viabilidade para substituir o óleo de soja (CHHETRI et al., 2008; KUMAR & SHARMA, 2016; HEJNA et al., 2016), de modo que os micro-organismos podem ser bastante explorados neste contexto (AMARAL et al., 2009; SCHULTZ et al., 2014).

Yarrowia lipolytica demonstra-se uma potencial candidata para atuar no reaproveitamento do coproduto da transesterificação (glicerol), utilizando-o como fonte de carbono e na substituição do óleo de soja por óleo microbiano para produção do biocombustível supracitado. Sendo assim, o trabalho aqui exposto tem por finalidade apresentar um estudo sobre a influência da estratégia de aeração do sistema no acúmulo de bio-óleo e polióis extracelulares em *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 utilizando glicerol como fonte de carbono.

2 Objetivos

O objetivo principal dessa dissertação é avaliar a influência da estratégia de aeração do sistema no acúmulo de bio-óleo intracelular por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 cultivada em biorreator utilizando glicerol como fonte de carbono.

Os objetivos específicos são:

- Determinar os valores do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) em diferentes condições de processo. Variando a vazão de ar de 0,67 a 4,0 vvm, agitação de 350 a 800 rpm e relação carbono/nitrogênio do meio de cultivo de 50:1, 75:1 e 100:1.

- Avaliar a influência dessas variáveis no valor do k_La obtido.

- Avaliar a produção de bio-óleo por *Yarrowia lipolytica* por citometria de fluxo e espectrofluorimetria, ambas associadas a fluorescência do fluorocromo *Nile Red*.

- Caracterizar e quantificar subprodutos extracelulares (ácido cítrico, manitol e eritritol) formados ao longo do processo.

- Avaliar e determinar os parâmetros cinéticos do processo.

3 Revisão Bibliográfica

3.1 *Yarrowia lipolytica*

Yarrowia lipolytica é um micro-organismo pertencente ao reino Fungi, eucariótico, estritamente aeróbio e pertencente à família Hemiascomicetos. Foi isolada e identificada pela primeira vez em 1928 e a este novo gênero foram atribuídos diversos nomes, tais como *Mycotorula*, *Monilia*, *Torula*, *Pseudomonilia*, *Proteomyces*, *Azymoprocandida*, *Candida*, *Endomycopsis*, *Torulopsis* ou *Saccharomycopsis*. (HARZEVILI, 2014). O nome genérico *Yarrowia* foi proposto em 1980 por van der Walt e von Arx em homenagem aos trabalhos desenvolvidos por David Yarrow (Delft Microbiology Laboratory) (YARROW, 1972). Já o nome *lipolytica* remete a capacidade desta levedura de hidrolisar lipídeos (NICAUD, 2012).

Leveduras consideradas "convencionais", como *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*, são definidas como micro-organismos unicelulares eucarióticos que se reproduzem por brotamento ou fissão. No entanto, várias espécies de leveduras, a exemplo *Yarrowia lipolytica*, apresentam dimorfismo e produzem pseudo-hifas (Figura 2) em determinadas condições, sendo então consideradas leveduras "não-convencionais" (WOLF, 1996).

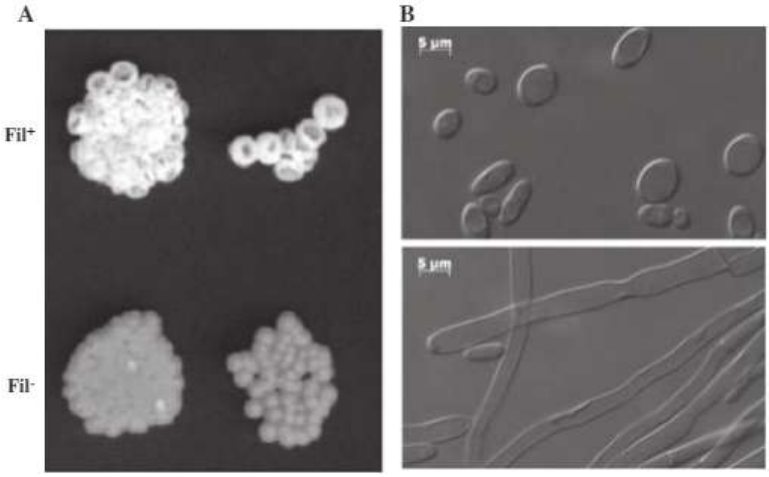

Figura 2 Morfologia celular e da colônia em cepas de Y. lipolytica. (A) Morfologia da colônia da cepa selvagem H222 (Fil+) e um mutante filamentoso (Fil-) em meio rico em YPD. (B) Morfologia celular leveduriforme em YNB (imagem superior) forma filamentosa em presença de soro (inferior).
Fonte: NICAUD, 2012.

As diferentes morfologias apresentadas por *Y. lipolytica* podem culminar em mudanças tanto no perfil de produção enzimática e de metabólitos quanto na transferência de energia e massa do sistema. A forma hifada é favorecida em valores de pH próximos a neutralidade e é

praticamente ausente em pH ácido (~3,0) (DO NASCIMENTO, 2016). MORÍN et al. (2007) avaliaram as mudanças metabólicas durante essa transição morfológica em *Y. lipolytica* e identificaram 45 proteínas sendo expressas de forma diferente, nove destas com a expressão reduzida em células hifadas.

O mecanismo que resulta no dimorfismo em *Y. lipolytica* ocorre via cascata da MAPK (mitogen-activated protein kinase ou proteína quinase ativada por mitógeno). Essa via de sinalização consiste na fosforilação de proteínas quinase em uma sequência pré-determinada, resultando na ativação do fator de transcrição Cph1. Tal fator de transcrição é capaz de se ligar a sequências específicas do DNA, chamadas elementos de resposta a filamentação, estimulando a transição morfológica (DUTRA, 2010).

As cepas de *Yarrowia lipolytica* podem ser isoladas de laticínios, salsichas, ambientes ricos em lipídeos, como esgotos e meios contaminados com óleos, e também de ambientes marinhos ou hipersalinos. Não é considerada uma espécie patogênica, sendo classificada pela *American Food and Drug Administration* (FDA) como *Generally Regarded As Safe* (GRAS) (NICAUD, 2012). É uma espécie bastante estudada devido ao seu grande potencial biotecnológico na produção de uma gama de produtos de interesse comercial, como ácido cítrico (PAPANIKOLAOU et al., 2008), biossurfactantes (FONTES et al., 2012), γ-decalactona (WACHÉ et al., 2002; KRZYCZKOWSKA, 2012), lipase (BRÍGIDA, 2014), lipídeo intracelular (POLI, 2014), eritritol e manitol (TOMASZEWSKA et al., 2012), entre outros.

Adicionalmente, *Yarrowia lipolytica* apresenta grande versatilidade também no consumo de substratos, sendo capaz inclusive de assimilar substratos hidrofóbicos (GONÇALVES et al., 2014). Alguns substratos utilizados no cultivo de *Y. lipolytica*, bem como o produto de interesse obtido, são apresentados no Quadro 1.

Quadro 1 Substratos, fontes de nitrogênio, tipo de fermentação e produtos no cultivo de *Yarrowia lipolytica*.

Substrato	Fonte de Nitrogênio	Tipo de Fermentação	Produto
Glicose	Nitrato de amônio e extrato de levedura	Submersa	Ácido Cítrico
Etanol	Sulfato de amônio e hidrolizado de levedura	Submersa	Ácido Cítrico
n-parafina	Nitrato de ferro (III)	Submersa	Ácido Cítrico
Glicerol	Extrato de levedura	Submersa	Ácido Cítrico
Resíduo de abacaxi	Extrato de levedura	Estado sólido	Ácido Cítrico
Óleo de Girassol	Nitrato de amônio e extrato de levedura	Submersa	Ácido Cítrico
Metanol	Peptona e extrato de levedura	Submersa	Lipídeo
Estearina	Sulfato de amônio e hidrolizado de levedura	Submersa	Lipídeo, lipase e biomassa
Óleo de côco	Sulfato de amônio	Estado sólido	Ácido graxo saturado
Bagaço de cana-de-açúcar	Peptona	Submersa	Lipídeo
Óleo de oliva, óleo de milho e glicose	Uréia	Submersa	Lipase

Fonte: adaptado GONÇALVES et al., 2014.

3.2 Glicerol

O glicerol (1,2,3-propanotriol), é um poliol viscoso, incolor e inodoro, naturalmente presente na estrutura dos triglicerídeos. Este nome lhe foi atribuído por apresentar paladar adocicado, sendo glicerol derivado do grego *glykys* (doce). Também é conhecido como glicerina, no entanto essa denominação se refere ao produto comercial, uma solução aquosa de glicerol com 95,5 a 99% de pureza (PAGLIARO & ROSSI, 2008). A Tabela 2 apresenta algumas propriedades físico-químicas deste composto.

Tabela 2 Propriedades físico-químicas do glicerol à 20 °C.

Fórmula química	$C_3H_5(OH)_3$
Massa molecular	92,09382 $g.mol^{-1}$
Densidade	1,261 $g.cm^{-3}$
Viscosidade	1,5 Pa.s
Ponto de fusão	18,2 °C
Ponto de ebulição	290 °C
Valor calórico	4,32 $kcal.g^{-1}$
Tensão superficial	64,00 $mN.m^{-1}$
Coeficiente de temperatura	-0,0598 $mN.(mK)^{-1}$

Fonte: PAGLIARO & ROSSI, 2008

Suas propriedades lhe conferem múltiplas possibilidades de aplicação, podendo servir de matéria-prima para a geração de diversos produtos tanto por via biotecnológica quanto por via química (Figura 3).

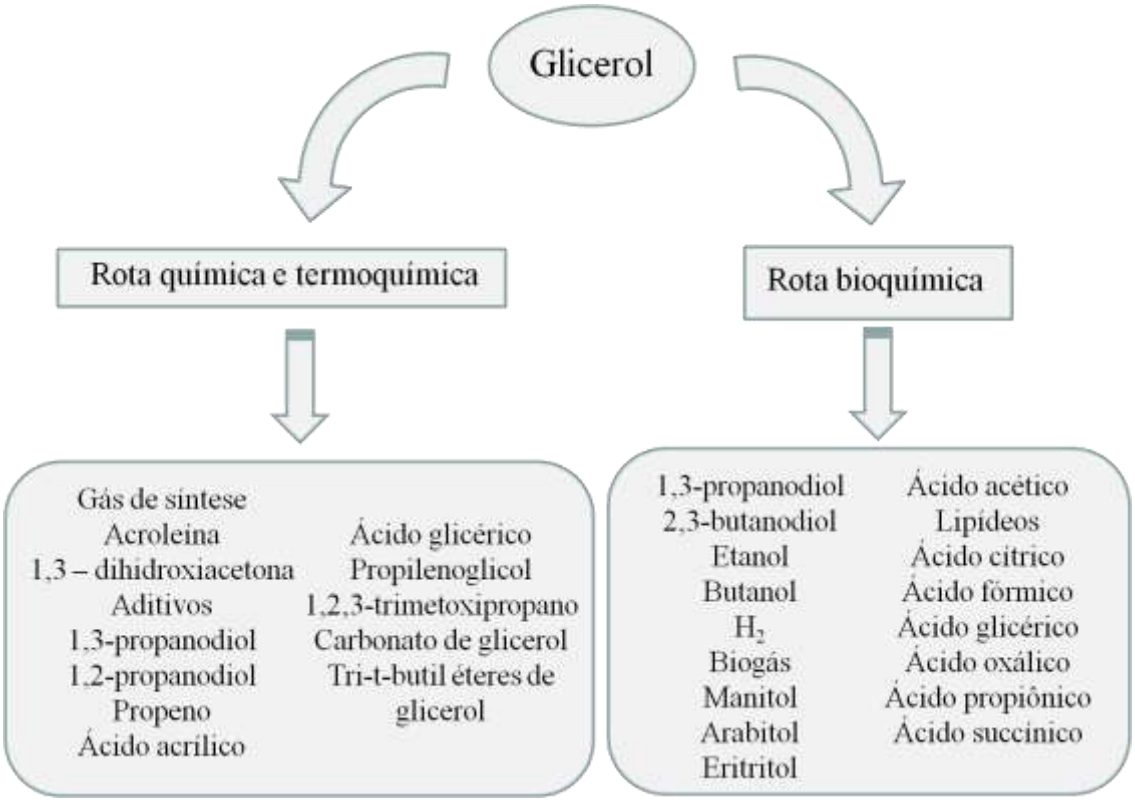

Figura 3 Produtos obtidos à partir de glicerol por via bioquímica, química e termoquímica.
Fonte: adaptado SCHULTZ et al., 2014.

A obtenção do glicerol pode ser feita via saponificação (Figura 4), hidrólise (Figura 5) ou reação de transesterificação, sendo esta última de grande interesse por estar associada a produção de biodiesel (CIRIMINNA et al., 2014).

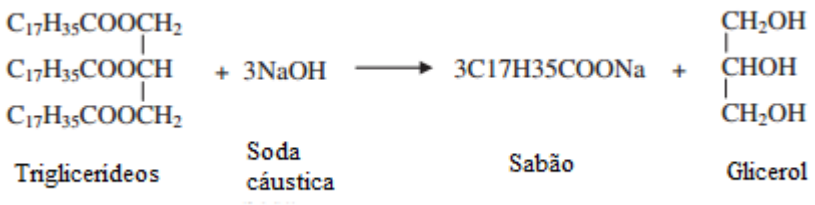

Figura 4 Reação de saponificação.

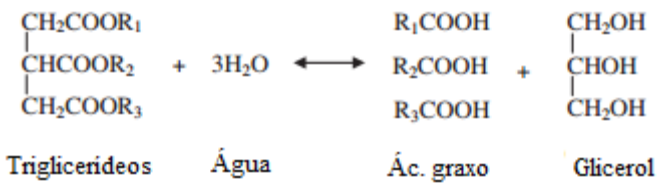

Figura 5 Reação de hidrólise de triglicerídeos.

A reação de transesterificação consiste na reação de um triglicerídeo (gordura ou óleo) com álcool na presença de um catalisador (ácido, base ou enzima) gerando biodiesel e glicerol. Estima-se que a cada 100 kg de biodiesel produzido, 10,5 kg de glicerol bruto são gerados (Figura 6) (TAN et al., 2013).

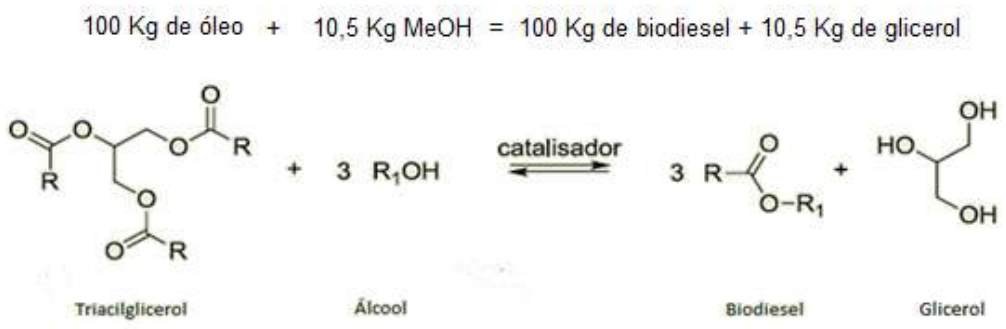

Figura 6 Reação de transesterificação. R – grupamento alquila contendo em média 18 a 22 carbonos. R1 – grupamento alquila do álcool utilizado

Em 2005, foi aprovada no Brasil a Lei n° 11.097/2005, que tornou obrigatória a adição de um determinado percentual de biodiesel misturado ao diesel brasileiro, chegando a 7% em novembro de 2012. E no ano passado entrou em vigor a Lei nº 13.623/2016, que projeta o percentual de participação em 10% em março de 2019. Essa obrigatoriedade estimulou a produção de biodiesel, acarretando em um aumento na produção de aproximadamente 57 vezes em 2015 quando comparado a 2006 (Figura 7) (ANP, 2016).

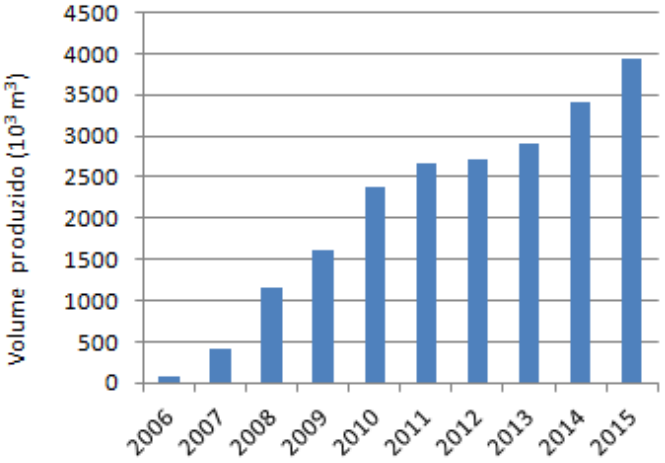

Figura 7 Produção anual de biodiesel no Brasil.
Fonte: ANP, 2016.

RODRIGUES & LOSEKANN (2015) fizeram uma projeção do consumo e produção de óleo diesel no Brasil até 2023 (Figura 8), que mostra uma perspectiva de aumento em ambos os casos, tendo um impacto direto na produção de biodiesel.

Figura 8 Projeção de produção e consumo de óleo diesel no Brasil.
Fonte: RODRIGUES e LOSEKANN, 2015.

O crescente aumento na produção de biodiesel gerou uma saturação de glicerol no mercado, tornando-se um problema para as indústrias produtoras de biodiesel, mas em contrapartida estimulando o estudo para o desenvolvimento de novas aplicações para o glicerol e otimização de processos envolvendo este composto. Neste contexto, *Yarrowia lipolytica* tem sido bastante reportada na literatura na valorização do glicerol, conforme mostra a Tabela 3.

Tabela 3 Produtos obtidos no cultivo de *Yarrowia lipolytica* utilizando glicerol como fonte de carbono.

Tipo de glicerol	Cepa *Y. lipolytica*	Tempo de fermentação (h)	$\mu_{máx}$ (h^{-1})	Produto	$Y_{P/S}$ ($g.g^{-1}$)	Referência
Bruto	PGC01003	72	0,40	Ácido Succínico	0,24	GAO et al., 2016
Bruto	JMY4086	450	-	Lipídeo	0,13	RAKICKA et al., 2015
Bruto	LGAM S(7)1	236	0,2	Ácido Cítrico	0,44	PAPANIKOLAOU et al., 2002
Puro	Wratislavia K1	73	-	Eritritol	0,46	RAKICKA et al., 2016
Bruto	DiSVA C 12.1	56	0,16	Biomassa	0,88[a]	TACCARI et al., 2012
Puro (+ azeite de oliva)	KKP 379	42	-	Lipase extracelular	0,135[b]	FABISZEWSKA, et al., 2015
Puro	WSH-Z06	168	-	Ácido α-ketoglutárico	0,53	YU et al., 2012
Bruto	IMUFRJ 50682	96	-	Biossurfactantes	81,3%[c]	FONTES et al., 2010

$Y_{P/S}$ – rendimento de substrato por grama de glicerol consumido
[a]$Y_{X/S}$ – rendimento de biomassa por grama de glicerol consumido
[b]Atividade enzimática (U/mL)
[c]EI (índice de emulsificação)

3.3 Óleo Microbiano

Yarrowia lipolytica é considerado um micro-organismo oleaginoso, ou seja, apresenta a capacidade de estocar conteúdo lipídico intracelular podendo, em condições de limitação de nutrientes, acumular até 70% de lipídeo em relação a biomassa. Os lipídeos são armazenados em compartimento chamado corpo lipídico, corpúsculo lipídico ou gotícula lipídica (Figura 9) (LOPES, 2014).

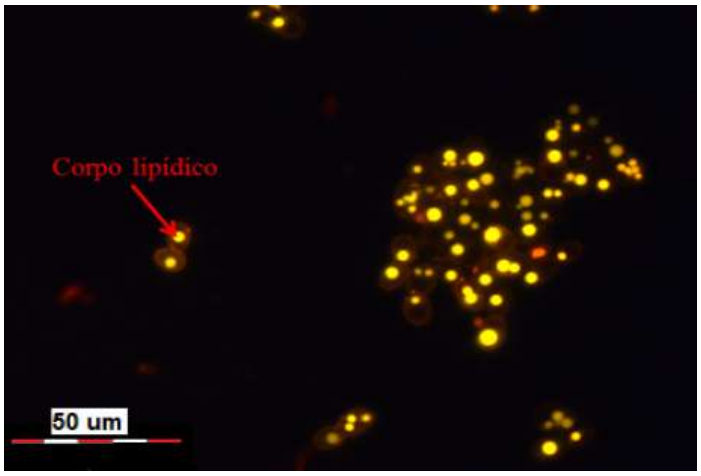

Figura 9 Imagem de microscopia ótica de fluorescência mostrando os corpos lipídicos de células de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 coradas com o fluorocromo *Nile Red* utilizando microscópio ótico Nikon modelo Eclipse E200 acoplado a câmera Evolution VF (1000x de aumento). Fonte: MARTINS, 2013.

A Tabela 4 apresenta a diferença no perfil lipídico entre o óleo produzido por micro-organismos oleaginosos e óleos vegetais. O óleo produzido por *Yarrowia lipolytica* apresenta um perfil similar ao do óleo de soja, principal matéria-prima na produção de biodiesel, demostrando-se um promissor substituinte do óleo vegetal na produção deste biocombustível. (CHRISTOPHE et al., 2012).

Tabela 4 Composição (% em peso) de metil ésteres de ácidos graxos de óleos vegetais e microbianos.

Espécies	Ácido palmítico (C16:0)	Ácido palmitoléico (C16:1)	Ácido esteárico (C18:0)	Ácido oléico (C18:1)	Ácido linoléico (C18:2)	Ácido linolênico (C18:3)
Lipomyces starkeyi	33-56	2-6	5-14	26-55	0,1-3	0,12
L. lipofera	37	4	7	48	3	-
Rhodosporidium toruloides	18-37	1	3-36	19-60	2-13	0-3,5
Trichosporon pullulans	15	Traços	2-10	57	7-24	1
Cryptococcus curvatus	17-25	-	12	55	8	2
Cunninghamella echinulata	16-19	-	12-14	40-48	4	3
Mortierella isabellina	20-27	1-4	2-6	44-54	4-18	3-8
Yarrowia lipolytica	11	6	1	28	51	1
Óleo de palma	32-59	-	1-8	27-52	5,14	Traços
Girassol	3-10	-	1-10	14-65	20-75	Traços
Soja	7-14	-	1-6	19-30	44-62	4-11
Amendoin	6-12,5	-	2,5-6	37-61	13-41	1
Óleo de semente de algodão	27-28	-	0,92	13-18	51-57	Traços
Óleo de soja	11	-	4	22	53	8
Óleo de colza	3-14	-	0,9-2	56-64	22-26	8-10
Milho	12	-	0,9	25	61	0,48

Fonte: adaptado CHRISTOPHE et al., 2012.

3.3.1 Vias de acúmulo de lipídeos

O acúmulo intracelular de lipídeos pode ocorrer por duas vias metabólicas: a via de síntese *de novo*, que se baseia na produção de precursores de ácidos graxos, como acetil e malonil-CoA e sua integração com a biossíntesse lipídica e a via de acumulação *ex novo*, que envolve o acúmulo de ácidos graxos, óleos e TAGs provenientes do meio de cultivo e o seu armazenamento dentro da célula (BEOPOULOS et al., 2011).

3.3.1.1 Via de síntese *de novo*

O fluxo de carbono, durante a fase de crescimento do micro-organismo, é distribuído para atender a quatro demandas: carboidratos, lipídeos, ácidos nucleicos e proteínas. Enquanto que o nitrogênio presente no sistema, geralmente adicionado sob a forma de sal de amônio, é preferencialmente utilizado para a síntese de ácidos nucleicos e proteínas necessários ao crescimento e multiplicação celular. No entanto, diversos fatores como concentração de substrato, composição do meio de cultivo, temperatura, pH, entre outros, são responsáveis pelo desvio e favorecimento de determinadas vias metabólicas em detrimento de outras (FLORES et al., 2000). A Figura 10, a seguir, mostra a via de síntese lipídica *de novo*.

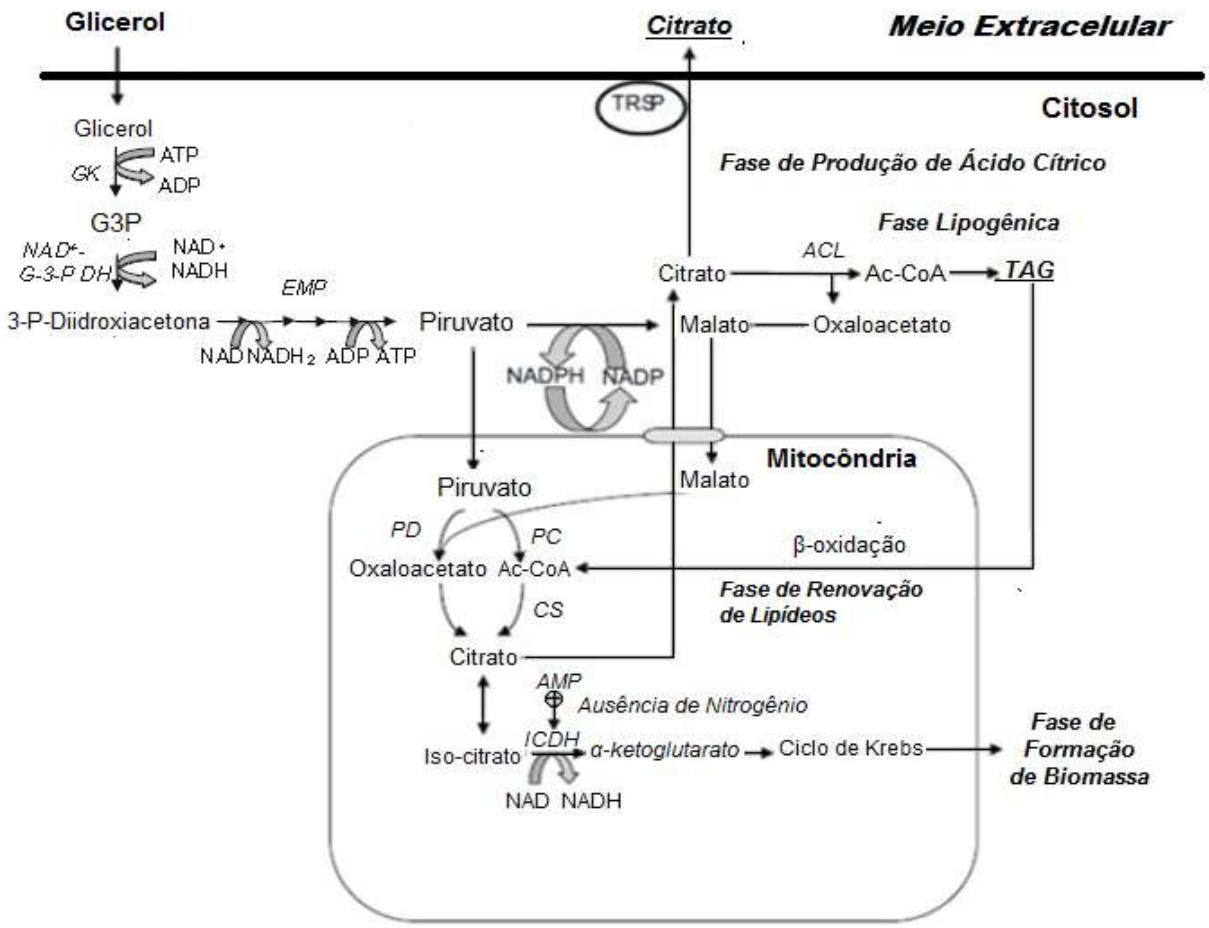

Figura 10 Vias metabólicas envolvidas no catabolismo de glicerol e biossíntese de lipídeo intracelular e ácido cítrico extracelular por *Y. lipolytica*. Limitação de nitrogênio causa um rápido declínio na concentração de AMP, que é clivada pela AMP-desaminase. Essa etapa resulta na inibição de NAD+-ICDH e consequente acúmulo de ác. cítrico na mitocôndria. Quando a concentração de ácido cítrico atinge um valor crítico, este é secretado para o citosol. Na fase lipogênica o ác. cítrico é clivado por ACL gerando oxaloacetato e Ac-CoA, precursor para a biossíntese de ácidos graxos. Durante a transição da fase lipogênica para a produção de ác. cítrico, quantidades significativas de glicerol são convertidas em ácido cítrico em simultâneo com a renovação ("*turnover*") de lipídeos. TAG: triacilglicerol; AMP – adenosina monofosfato; ACL - ATP citrato liase; ICDH - isocitrato desidrogenase; Ac-CoA – acetil coenzima A; ACC -acil-CoA carboxilase; CS – citrato sintase; PC – piruvato carboxilase; PD – piruvato desidrogenase; NAD – dinucleotídeo de nicotinamida e adenina; ATP – adenosina

trifosfato; ADP – adenosina difosfato; EMP – Embden Meyerhof Parnas pathway; G-3-P DH – 3-P-glicerol desidrogenase; GK – glicerol quinase. Fonte: adaptado Makri et al., 2010.

Em condições de limitação de nitrogênio no meio de cultivo, a taxa de crescimento se reduz rapidamente e ocorre a ativação da enzima AMP-desaminase, responsável pela clivagem de AMP (adenosina monofosfato) em IMP (inosina monofosfato). A AMP regula a atividade da ICDH (isocitrato desidrogenase), de forma que a clivagem deste composto resulta na inativação dessa enzima. Estando inativada, a ICDH cessa a transformação de iso-citrato em α-ketoglutarato, intermediário do ciclo de Krebs. Com isso, há um acúmulo de citrato em equilíbrio com iso-citrato na mitocôndria, até que se atinja uma concentração tal onde o citrato é transportado para o citosol com consequente entrada de malato na mitocôndria. Esse citrato é levado a acetil-CoA mediante a ação da enzima ACL (ATP citrato liase), iniciando assim a fase lipogênica, ou seja, o acúmulo de triacilgliceróis (TAGs) (RYWINSKA et al., 2013). O acetil-CoA citosólico fornece os dois primeiros átomos de carbono para a síntese lipídica, mas a cadeia de ácidos graxos cresce pela adição de unidades de malonil-CoA, do retículo endoplasmático (RE), ou acetil-CoA da mitocôndria. O acetil-CoA utilizado para elongação é obtido pelo processo de β-oxidação, que consiste na clivagem de lipídeos acumulados, já o malonil-CoA é gerado pela ACC (acil-CoA carboxilase), sendo a principal fonte de carbono para a síntese de ácidos graxos da via *de novo* (BEOPOULOS et al., 2009a).

3.3.1.2 Via de acúmulo *ex novo*

Em contrapartida, a via de acúmulo *ex novo* se baseia na capacidade do micro-organismo oleaginoso de assimilar substratos hidrofóbicos como alcanos e lipídeos. *Yarrowia lipolytica*, que é comumente encontrada em ambientes ricos nesse tipo de substrato, é um exemplo de micro-organismo capaz de assimilá-los eficientemente, tendo sido utilizada por THEVENIEAU et al. em 2007 como modelo para o estudo dos mecanismos envolvidos na degradação de substratos hidrofóbicos. A primeira etapa para utilização desses substratos como fonte de carbono consiste na indução de modificações no substrato de modo a torná-lo mais acessível à célula. *Yarrowia lipolytica*, por exemplo, pode produzir surfactantes para reduzir o tamanho das gotículas deste substrato aumentando a superfície de contato entre este e a levedura, assim como secretar lipase para a hidrólise de TAGs (RUFINO et al., 2014). Quando o substrato é um n-alcano, este pode ser aderido a protrusões ou a elevações hidrofóbicas que se formam na superfície da levedura e depois migrar para o retículo

endoplasmático via membrana plasmática por transporte interfacial direto. No retículo endoplasmático, os n-alcanos são hidroxilados por citocromos P450, no processo de ω-oxidação (Figura 11). No entanto, a via metabólica envolvida na assimilação de n-alcanos ainda não está completamente elucidada (BEOPOULOS et al., 2009b; FUKUDA, 2013).

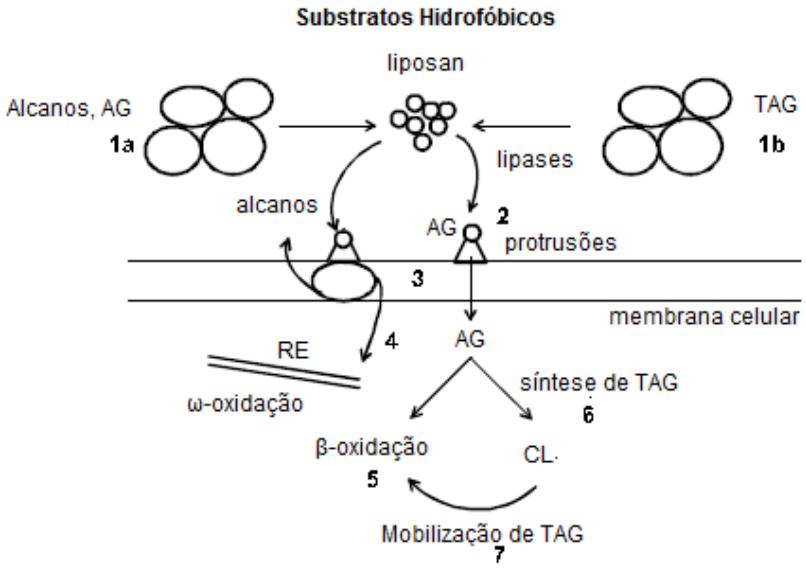

Figura 11 Representação esquemática da assimilação de substratos hidrofóbicos (SH) por Y. lipolytica (1a, 1b). Liposan reduz o diâmetro das emulsões e gotículas hidrofóbicas formadas pelo SH. (1b) TAGs são clivados pela lipase extracelular gerando ácidos graxos (AGs). (2) Gotículas do substrato ligam-se a protrusões da superfície celular. (3) Transportadores mediam a entrada e saída dessas gotículas na membrana celular. (4) Modificação do SH (ω-oxidação). (5) Degradação por β-oxidação ou (6) estocagem nos corpúsculos lipídicos como TAGs; (7) mobilização de TAG depois da hidrólise por lipases. Protrusões: estruturas da superfície celular que permitem a ligação das gotículas hidrofóbicas. Fonte: adaptado BEOPOULOS et al., 2009.

3.4 Produtos extracelulares

Yarrowia lipolytica é uma levedura "não-convencional" bastante abordada na literatura, principalmente devido a sua ampla possibilidade de aplicações biotecnológicas. Dentre essas aplicações, destacam-se aquelas cujos produtos de interesse são secretados para o meio extracelular, podendo assim ser mais facilmente separados como, por exemplo, ácido cítrico, manitol, eritritol, lipase e outros (COELHO et al., 2010).

3.4.1 Ácido Cítrico

O ácido cítrico (ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico), também conhecido como citrato de hidrogênio, nome que deriva do latim *citrus*, gênero das plantas cujas frutas apresentam este ácido mais expressivamente em sua composição, é considerado um ácido

fraco e apresenta a fórmula química $C_6H_8O_7$, sendo a sua estrutura química representada conforme mostra a Figura 12 (MAX et al., 2010).

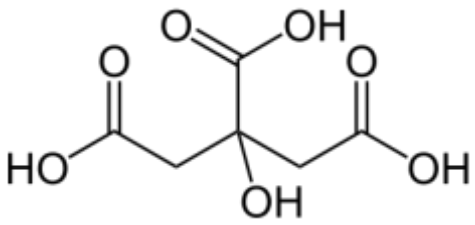

Figura 12 Estrutura química do ácido cítrico.

É aceito mundialmente como *Generally Regarded As Safe* (GRAS) e amplamente utilizado nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e de cosméticos. Algumas das possíveis aplicações do ácido cítrico estão descritas no Quadro 2 (SOCCOL et al., 2006).

Quadro 2 Aplicações do ácido cítrico e suas funções em diferentes indústrias.

Indústria	**Aplicações**	**Função**
Bebidas	Vinhos e Sidras	• Previne escurecimento em alguns vinhos brancos • Evita turbidez • Ajuste de pH
Alimentos	Geleias, doces e conservantes	• Ajuste de pH • Atua como acidulante • Aumenta eficácia de conservantes antimicrobianos • Fornece grau desejado de acidez e sabor.
	Laticínios	• Emulsionante em sorvetes e queijos processados • Agente acidificante e antioxidante em diversos produtos à base de queijo • Minimiza inversão da sacarose • Previne cristalização da sacarose
Farmacêutica	Fármacos	• Efervescente em pós e comprimidos em combinação com bicarbonatos. • Anticoagulante • Acelera a dissolução de componentes ativos • Acidulante em formulações ligeiramente adstringentes
Cosméticos	Produtos cosméticos	• Quelante de íons metálicos • Ajuste de pH • Agente tamponante

FONTE: adaptado SOCCOL et al., 2006.

O ácido cítrico é um intermediário do ciclo de Krebs, sendo um composto de grande importância no metabolismo celular microbiano e sua produção industrial majoritariamente feita por via biotecnológica. Diversos micro-organismos como, bactérias, fungos e leveduras são capazes de produzir este composto. Como o ácido cítrico participa do metabolismo

energético, o seu acúmulo em quantidades expressivas requer condições drásticas de desbalanceamento energético, de forma que muitos micro-organismos não conseguem alcançar rendimentos economicamente viáveis para a produção industrial. (VANDENBERGHE, 1999). Este rendimento está associado a diversos fatores tais como, micro-organismo utilizado, condições do processo, composição do meio de cultivo, concentração de íons metálicos (principalmente Mn^{2+}), limitação por nitrogênio, entre outros. No entanto, no caso das leveduras, uma das maiores desvantagens consiste na produção simultânea de ácido isocítrico, que pode chegar a até 50% do valor obtido de ácido cítrico (SÁ, 2011; SHOW et al., 2015). DA SILVA (2010) atingiu a produção 16,49 $g.L^{-1}$ de ácido cítrico no cultivo submerso em frascos erlenmeyer de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 utilizando glicerol como fonte de carbono e MOELLER et al. (2007) obtiveram uma produção máxima de 41 $g.L^{-1}$ de ácido cítrico no cultivo em biorreator de *Yarrowia lipolytica* H222 em meio contendo glicose.

3.4.2 Eritritol

Eritritol (2S, 3R-butano-1,2,3,4-tetraol) (Figura 13) é um poliol (álcool de açúcar) que apresenta entre 60 a 80% do poder adoçante da sacarose em 10% (p/v) de solução, não carcinogênico, tendo aplicação tanto na indústria alimentícia quanto farmacêutica. (RAKICKA et al., 2016). Na indústria de alimentos é utilizado como um edulcorante de baixa caloria, sendo disponibilizado em pó ou incorporado a bebidas ou gomas de mascar. Além do poder adoçante, o eritritol também tem a capacidade de suprimir a formação de biofilme de algumas bactérias patogênicas causadoras da cárie dentária (MIRÓNCZUK et al., 2015) e uma ligeira capacidade de alterar os níveis de insulina, podendo também ser consumido por diabéticos. É também utilizado na indústria de cosméticos como hidratante e possui propriedades antioxidantes, devido à presença de grupamentos hidroxil em sua estrutura (RAKICKA et al., 2016).

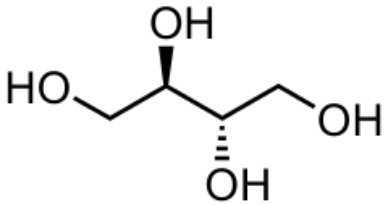

Figura 13 Estrutura química do eritritol.

A produção por via biotecnológica de eritritol pode ser feita por bactérias láticas heterofermentativas como *Leuconostoc oenos* (VEIGA-DA-CUNHA et al., 1993), fungos filamentosos ou leveduras, tais como *Torula corallina* (Lee et al., 2002), *Trigonopsis variabilis* (KIM et al., 1997), *Zygosaccharomyces acidifaciens* (HAJNY et al., 1964) e *Yarrowia lipolytica* (DA SILVA *et. al.*, 2016). Em bactérias láticas, o eritritol é produzido para oxidar moléculas de NADPH em excesso, de forma a balancear o potencial de oxirredução celular. Entretanto em leveduras, principalmente as leveduras osmofílicas, essa produção ocorre em resposta a um estresse osmótico (DO NASCIMENTO, 2016). O estresse osmótico ocorre devido a altas concentrações de açúcar ou sais presentes no meio de cultivo, podendo causar danos às estruturas celulares, pois provoca um efluxo de água intracelular. Fisiologicamente as leveduras possuem duas respostas para contornar essa situação: a ativação de sistemas de transporte para expelir íons sódio e potássio e a síntese de solutos compatíveis para balancear a pressão osmótica interna. Alguns exemplos de solutos compatíveis produzidos são em geral polióis como manitol, glicerol, eritritol ou também trealose (DEÁK, 2008). O direcionamento para a produção de determinado poliól pode ser feito mediante controle de determinadas variáveis como pH, estágio de estresse osmótico e concentração de sais. A Figura 14 mostra a via metabólica proposta para a produção de polióis por *Yarrowia lipolytica* (DO NASCIMENTO, 2016).

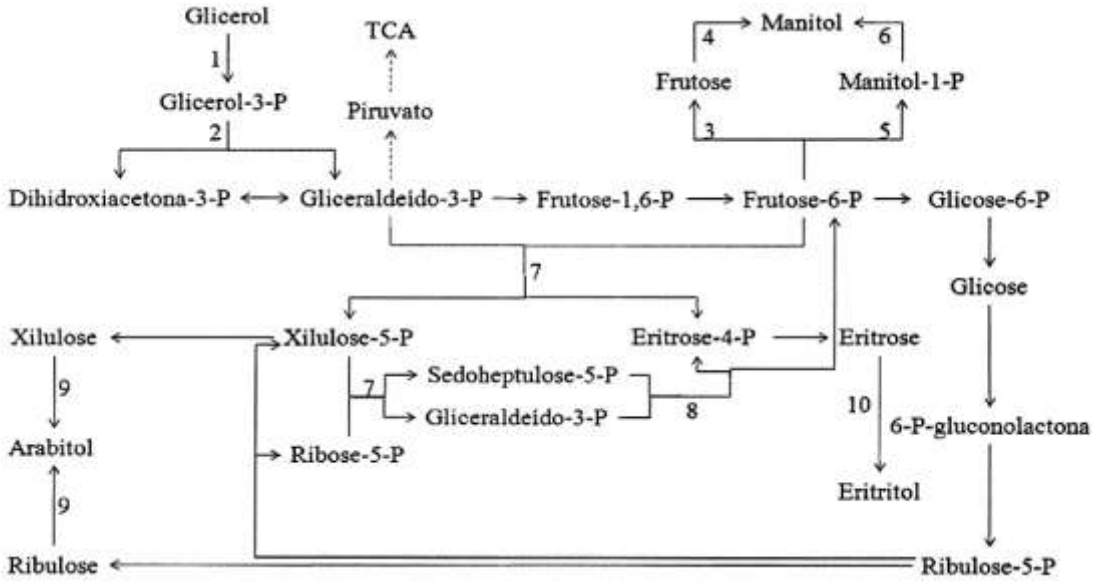

Figura 14 Via metabólica proposta para a produção de polióis por *Y. lipolytica*. TCA: ciclo dos ácidos tricarboxílicos; (1) glicerol quinase; (2) NAD+ glicerol-3-P desidrogenase; (3) manitol desidrogenase; (4) hexoquinase; (5) manitol-1-P desidrogenase; (6) manitol-1-fosfatase; (7) transcetolase; (8) transaldolase; (9) arabitol desidrogenase; (10) eritrose redutase. Fonte: DO NASCIMENTO, 2016.

3.4.3 Manitol

Manitol (Figura 15) é um poliól que assim como o eritritol possui ampla aplicação nas indústrias alimentícias e farmacêuticas. Em alimentos, sua propriedade de reduzir a tendência de cristalização de açúcares é bastante explorada a fim de aumentar o tempo de prateleira desses produtos. Além disso, a sua forma cristalina apresenta baixa higroscopicidade, sendo bastante utilizada em produtos que requerem estabilidade em condições de alta umidade. Adicionalmente, apresenta baixo valor calórico (1,6 $kcal.g^{-1}$) e baixa solubilidade em água. É amplamente utilizado em gomas de mascar e sendo um composto quimicamente inerte, aparece na formulação de diversos medicamentos, principalmente para impedir absorção de umidade e mascarar eventuais sabores desagradáveis inerentes a alguns fármacos (SAHA & RACINE, 2011).

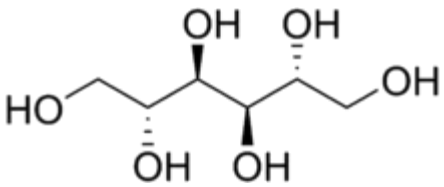

Figura 15 Estrutura química do manitol.

O manitol é industrialmente produzido por via química, mediante a hidrogenação de frutose em altas condições de temperatura e pressão. No entanto, também pode ser encontrado em diversas algas, plantas e micro-organismos, sendo o processo biotecnológico de produção deste composto uma alternativa interessante (TOMASZEWSKA et al., 2012).

3.5 Respiração microbiana e a transferência de oxigênio em meios líquidos

A respiração microbiana é um processo bioquímico no qual compostos orgânicos ou inorgânicos reduzidos são oxidados por compostos inorgânicos para geração de energia. Quando o oxidante é o oxigênio (O_2), esse processo é denominado respiração aeróbica e sendo outro oxidante, respiração anaeróbica. (BAILEY & OLLIS, 1986). Bactérias do gênero *Bacillus* e *Pseudomonas*, por exemplo, são capazes de utilizar íon nitrato (NO^{3-}) como aceptor final de elétrons, do gênero *Desulfovibrio* utilizam sulfato (SO_4^{2-}), assim como algumas bactérias utilizam carbonato (CO_3^{2-}) (TORTORA et al.,2012).

O fornecimento de oxigênio ao micro-organismo para manutenção de sua atividade respiratória pressupõe a implementação de um sistema de aeração e agitação eficientes. De

modo que a transferência do oxigênio da fase gasosa para a líquida seja efetiva e o oxigênio dissolvido entre em contato com as células suspensas, penetrando-as e sendo disponibilizado para as reações da cadeia respiratória. Esse sistema de transferência de oxigênio consiste em uma etapa crítica e limitante de bioprocessos que utilizam micro-organismos aeróbios devido à baixa solubilidade do oxigênio em água. A Tabela 5 apresenta a solubilidade do oxigênio em diferentes temperaturas a pressão de 1 atmosfera (atm).

Tabela 5 Solubilidade do oxigênio em água pura a 1 atm em diversas temperaturas.

Temperatura (ºC)	Solubilidade do oxigênio (mmol/L)
0	2,18
10	1,70
15	1,54
20	1,38
25	1,26
30	1,16
35	1,09
40	1,03

Fonte: BAILEY; OLLIS, 1986.

A atividade respiratória de uma população de leveduras pode alcançar a taxa de consumo de oxigênio na ordem de 0,3 g de oxigênio por hora por grama de massa seca de células. Existem diversos fatores que influenciam a transferência das moléculas de oxigênio desde o início da aeração até o consumo final pelas células, ou seja, há diversas formas de resistência. (LORENZINI, 2012).

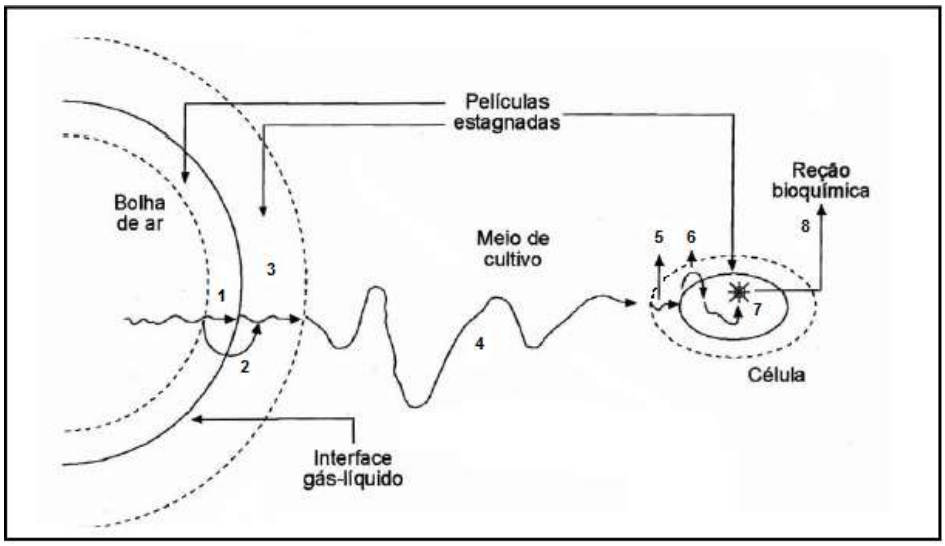

Figura 16 Resistências relativas à dissolução e consumo de oxigênio em sistemas aeróbicos. (1) Problema de dissolução ou transferência do oxigênio do gás para o líquido; (2) Problema de eventual difusão do oxigênio na interface gás-líquido; (3) Problema de difusão do oxigênio através de uma película líquida estagnada; (4) Resistência associada à difusão do oxigênio até as células; (5) Resistência promovida pela película líquida estagnada ao redor da célula; (6) Resistência da membrana celular; (7) Resistência resultante da difusão do oxigênio no citoplasma; (8) Resistência relativa a velocidade da reação de consumo do O_2.
Fonte: SCHMIDELL *et. al*, 2001.

A Figura 16 ilustra algumas das possíveis resistências a essa transferência que serão comentadas a seguir. A primeira resistência encontrada é referente a transferência do oxigênio da fase gasosa para a líquida (1), provocada por uma película gasosa estagnada pela qual o oxigênio tem que se difundir. A próxima resistência (2) ocorre na interface gás-líquido e a resistência 4 é relativa a difusão do oxigênio ao longo do meio de cultivo. Considerando um sistema com agitação adequada, as resistências 1 e 4 podem ser desprezadas, devido a acentuada movimentação das moléculas de oxigênio, assim como a resistência 2 na interface, exceto em casos onde sejam utilizados componentes capazes de aderir a essa superfície como, por exemplo, alguns antiespumantes (DAS NEVES, 2003).

Por outro lado, temos a resistência estabelecida pela película líquida estagnada em torno da bolha de gás, que leva em consideração a difusividade do oxigênio no líquido e a espessura da película (resistência 3) e a resistência 5, onde a película líquida estagnada encontra-se ao redor da célula. Como as dimensões celulares são ínfimas, a área exposta ao meio líquido é máxima, podendo assim a resistência 5 ser desprezada.

Similarmente, a resistência 6 também pode ser desprezada. O oxigênio entra na célula por difusão simples, de forma que a membrana celular não deve promover grande resistência a esse fluxo. A sétima resistência (7) também pode ser descartada pelo mesmo princípio que a resistência 5. Em células eucarióticas considerar a resistência enfrentada pelo oxigênio até este atingir as membranas internas da mitocôndria, onde ocorre a respiração, não teria

expressividade. E principalmente, no caso de bactérias, em que o aparato respiratório encontra-se no citoplasma, essa hipótese de resistência pode ser prontamente descartada (AMARAL, 2007).

Com isso, as mais significativas resistências são estabelecidas pela película líquida estagnada ao redor do gás (resistência 3) e pelas velocidades das reações enzimáticas que compõem a respiração celular (resistência 8). Diversos fatores afetam a velocidade de uma reação enzimática como, por exemplo, a concentração e atividade enzimática, concentração proteica, disponibilidade de elétrons a serem transportados na cadeia respiratória e ATP (adenosina trifosfato). Outro fator de resistência que deve ser considerado ocorre em situações nas quais os micro-organismos crescem aglomerados, ou seja, onde a difusão do oxigênio para as células localizadas mais no interior do aglomerado é prejudicada. (SCHMIDELL et al., 2001).

3.5.1 Coeficiente volumétrico global de transferência de oxigênio (k_La)

O principal modelo proposto a fim de equacionar a transferência de oxigênio dentro de sistemas líquidos apresenta uma abordagem que considera a existência de películas estagnadas. Ou seja, supõe-se que entre o seio gasoso e a interface gás-líquido haja uma película líquida estagnada, considerando o seio gasoso homogêneo e com pressão parcial de O_2 constante. A resistência oferecida pela película é representada pelo inverso do coeficiente de transferência da película gasosa (k_G), que é função da difusividade do oxigênio e da espessura da película. Como o efeito é difusional, deve haver um gradiente entre a pressão parcial de O_2 no interior da bolha (P_g) e a pressão parcial de O_2 na interface (P_i) (Figura 18).

Analogamente, para a fase líquida, supõe-se a presença de uma película estagnada em torno da bolha oferecendo uma resistência definida pelo inverso do coeficiente de transporte na película líquida (k_L) (Figura 17) (LORENZINI, 2012).

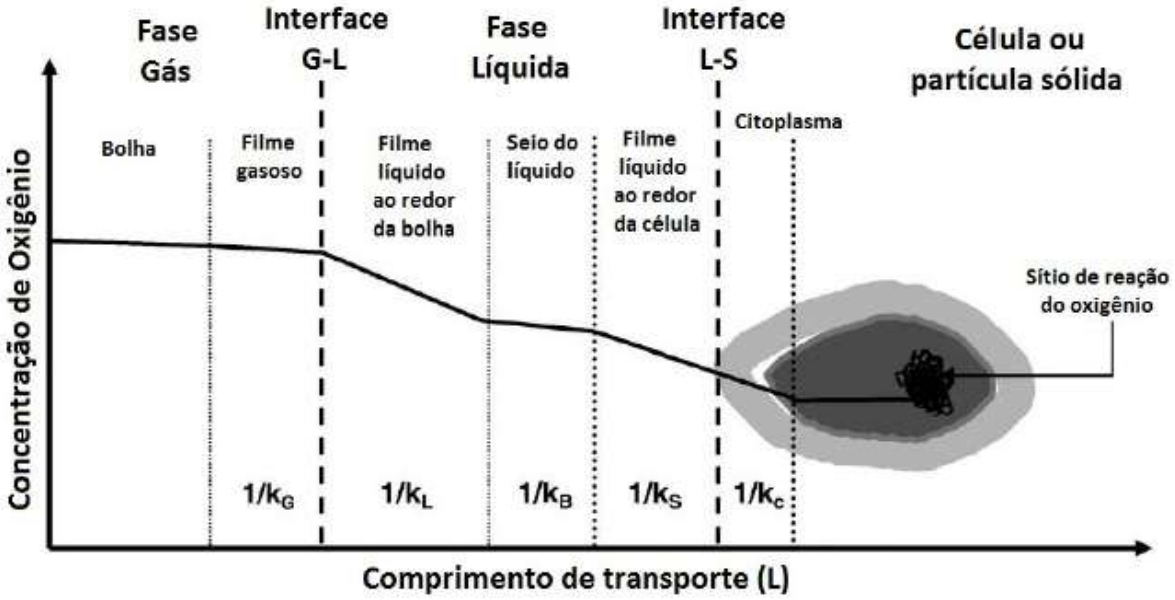

Figura 17 Resistências a transferência de oxigênio da bolha até a célula em biossistemas aerados.
Fonte: LORENZINI, 2012.

De forma semelhante, o fluxo de oxigênio depende também de um gradiente, neste caso, entre a concentração de O_2 na interface (C_i) e no seio líquido (C_L) (Figura 18).

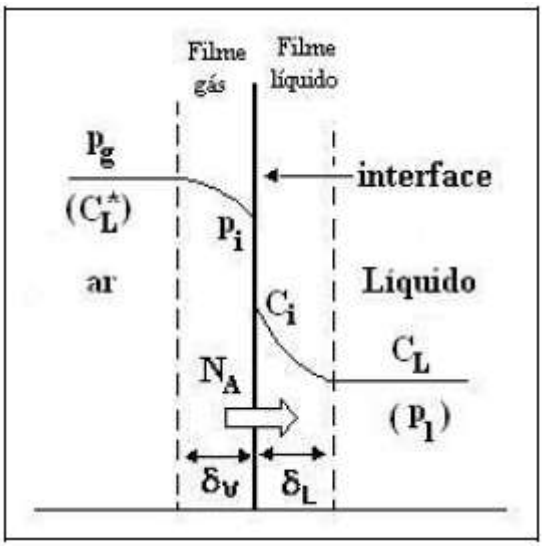

Figura 18 Transferência de oxigênio na interface gás-líquido. Pg: pressão parcial do oxigênio no seio da fase gasosa; Pi: pressão parcial do oxigênio na interface; P_l: pressão parcial do oxigênio no líquido; Ci: concentração de oxigênio dissolvido na interface; C_L: concentração de oxigênio dissolvido no seio do líquido; N_A: fluxo de oxigênio por área; δv e δ_L: espessura do filme gasoso e líquido, respectivamente.
Fonte: AMARAL, 2007.

Os fluxos de oxigênio por unidade de área nas fases gasosa e líquida ($N_{O2,G}$ e $N_{O2,L}$, respectivamente) são definidos conforme as Equações a seguir:

$$N_{O2,G} = k_G * (P_g - P_i) \qquad (3.1)$$

$$N_{O2,L} = k_L * (C_i - C_L) \qquad (3.2)$$

Onde:

$N_{O2,G}$ e $N_{O2,L}$: [$gO_2.m^{-2}h^{-1}$]
Pg e Pi : pressão parcial de oxigênio na fase gasosa e na interface[atm]
Ci e C_L: concentração de oxigênio dissolvido na interface e no seio da fase líquida [$gO_2.m^{-3}$]
k_G: coeficiente de transferência de oxigênio local da fase gasosa [$gO_2.m^{-2}h^{-1}atm^{-1}$]
k_L: coeficiente de transferência de oxigênio local da fase líquida [ms^{-1}]

Considerando um sistema aquoso diluído, as concentrações na interface gás-líquido encontram-se em estado estacionário. Desta forma, Pi e Ci estão em equilíbrio termodinâmico e podem ser correlacionados pela lei de Henry (Equação 3.3) (AMARAL, 2007).

$$P_i = H * C_i \qquad (3.3)$$

Onde H é a constante de Henry ($atm.m^3.gO_2^{-1}$).

Devido à dificuldade em se medir as concentrações na interface, definiu-se um fluxo global de oxigênio da bolha de ar para a fase líquida (N_{O2}) (Equação 3.4):

$$N_{O2} = K_L * (C_L^* - C_L) \qquad (3.4)$$

Onde C_L* é a concentração de saturação do oxigênio na fase líquida que está em equilíbrio com a pressão parcial do oxigênio na fase gasosa, sendo então descrito conforme a Equação 3.5:

$$C_L^* = \frac{P_g}{H} \qquad (3.5)$$

Considerando estado estacionário, temos que $N_{O2,G}$ = $N_{O2,L}$ = N_{O2} e utilizando as relações citadas anteriormente (3.1), (3.3) e (3.5), obtemos a Equação 3.6 (NIELSEN et al., 2002). A Figura 19 mostra esquematicamente esta relação.

$$\frac{1}{K_L} = \frac{1}{H * k_G} + \frac{1}{k_L} \qquad (3.6)$$

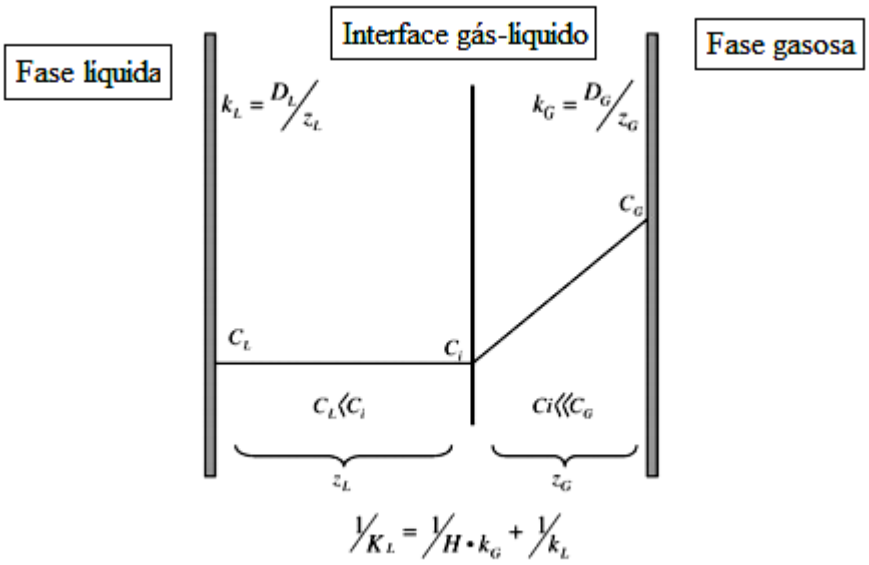

Figura 19 Representação esquemática da interface gás-líquido, concentrações e coeficientes de transferência de massa K_L, k_L e k_G. Fonte: GARCIA-OCHOA & GOMES, 2009.

A baixa resistência do oxigênio na fase gasosa faz com que k_G seja muito maior que k_L. Sendo assim, podemos dizer que o coeficiente global de transferência de oxigênio (K_L) é muito próximo do valor do coeficiente local (k_L). E como o fluxo de oxigênio é expresso por unidade de área interfacial, uma última definição se faz necessária (AMARAL, 2007), de modo que essa área (a) é dita como:

$$a = \frac{\text{área interfacial de transferência de massa } (m^2)}{\text{volume total de líquido } (m^3)}$$

De uma forma geral, a variação da concentração de oxigênio dissolvido na fase líquida é definida como a diferença entre a taxa de transferência de oxigênio e a taxa de consumo do mesmo (Equação 3.7).

$$\frac{dC_L}{dt} = TTO - TCO \qquad (3.7)$$

Onde:

$$TTO = k_L a (C_L^* - C_L) \qquad (3.8)$$

e

$$TCO = q_{O_2}X \qquad (3.9)$$

C_L - Concentração de oxigênio dissolvido na fase líquida

t - tempo

TTO - taxa de transferência de oxigênio

TCO - taxa de consumo de oxigênio

q_{o2} - taxa específica de consumo de oxigênio

X - densidade celular

Substituindo (3.8) e (3.9) em (3.7), temos então que:

$$\frac{dC_L}{dt} = k_L a(C_L^* - C_L) - q_{O_2}X \qquad (3.10)$$

Em meio líquido sem células metabolicamente ativas, TCO = $q_{O2}X = 0$, então:

$$\frac{dC_L}{dt} = k_L a(C_L^* - C_L) \qquad (3.11)$$

A Equação 3.11 serve como base para diversas metodologias para a determinação do k_La, sendo estas divididas em dois grupos: métodos químicos e métodos físicos.

3.5.1.1 Determinação do k_La por métodos químicos

Embora os métodos químicos tenham sido os primeiros a se difundirem, apresentam a grande desvantagem de não serem recomendados para biorreatores aerados, pois a adição de químicos pode causar mudanças físico-químicas nas propriedades dos líquidos, principalmente o efeito de coalescência (GARCIA-OCHOA & GOMES, 2009).

3.5.1.1.1 Método da oxidação de sulfito

Este método é baseado na reação do sulfito de sódio com o oxigênio para geração de sulfato na presença de um catalisador, sento este em geral um cátion divalente.

$$SO_3^{-2} + \frac{1}{2}O_2 \xrightarrow{catalisador} SO_4^{-2} \qquad (3.12)$$

Essa reação ocorre com aeração e agitação, que de tempos em tempos são desligadas para retirada de alíquotas. Cada alíquota é misturada com um excesso de iodo para posterior titulação com solução de tiosulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$). Desta forma, obtém-se a concentração de sulfito e o kLa pode ser calculado pela Equação 3.13.

$$-\frac{dC_{Na_2SO_3}}{dt} = 2k_L a C^* \qquad (3.13)$$

Uma grande limitação deste método se encontra no fato de que diferentes meios fermentativos podem apresentar propriedades físico-químicas diversas, alterado a hidrodinâmica da solução, principalmente devido ao tamanho das bolhas de oxigênio. Isso pode superestimar o valor experimental do k_La (GARCIA-OCHOA & GOMES, 2009).

3.5.1.1.2 Método de absorção de CO_2

Este método consiste na absorção de dióxido de carbono em uma solução alcalina, conforme as reações abaixo:

$$HCO_3^- - CO_2 - OH^- = 0 \qquad (3.14)$$

$$HCO_3^- + H^+ - CO_2 - H_2O = 0 \qquad (3.15)$$

E utilizando as relações (3.16) e (3.17) para mensurar o valor do kLa (TALBOT et al., 1991).

$$-\frac{1}{2}\frac{dC_{CO_2}}{dt} = k_L a. C^* \sqrt{k. C_{CO_2}} \qquad (3.16)$$

$$\frac{k_L a|O_2}{k_L a|CO_2} = \frac{D_{O_2}}{D_{CO_2}} \qquad (3.17)$$

3.5.1.2 Determinação do kLa por métodos físicos

3.5.1.2.1Método da desgaseificação

O método da desgaseificação, também conhecido de método do balanço gasoso, consiste no borbulhamento de nitrogênio (N_2) no sistema até que a leitura do sensor de O_2 seja

nula. Neste momento, inicia-se a aeração e agitação do sistema nas condições pré-estabelecidas para determinação do k_La, até que num dado momento a leitura no sensor de oxigênio dissolvido vai atingir a saturação, mantendo-se constante, conforme mostra a Figura 20.

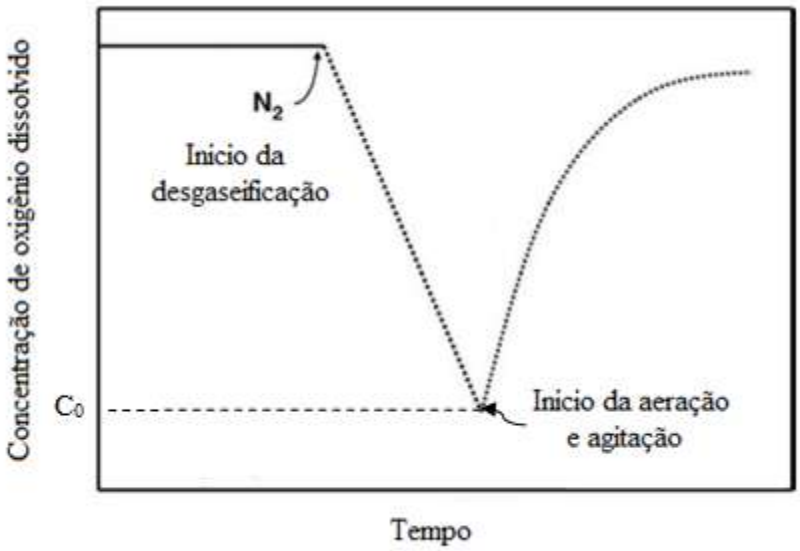

Figura 20 Demonstração do perfil de concentração de oxigênio dissolvido no método da desgaseificação.
Fonte: adaptado GARCIA-OCHOA & GOMES, 2009.

Desta forma, integrando a Equação 3.11, temos que:

$$\int_0^{C_L} \frac{dC_L}{(C_L^* - C_L)} = \int_0^t k_L a \, dt \quad (3.18) \text{ e, portanto, } \ln\left(1 - \frac{C_L}{C_L^*}\right) = k_L a * t \quad (3.19)$$

Os dados de concentração de oxigênio dissolvido sendo substituídos no termo neperiano em função do tempo geram então um gráfico cujo coeficiente angular é o k_La (Figura 21) (AMARAL, 2007).

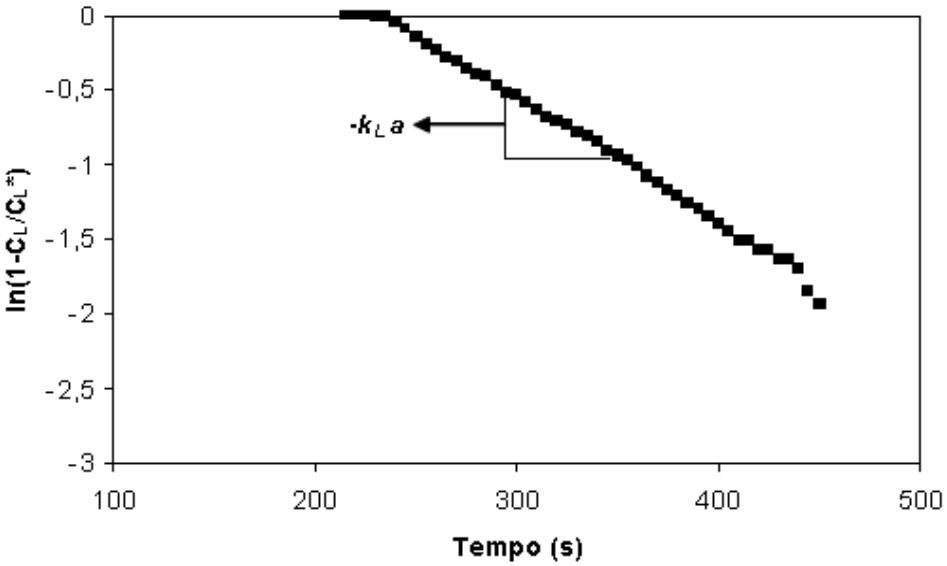

Figura 21 Gráfico de ln(1-C_L/C_L*) em função do tempo.
Fonte: Amaral, 2007.

No entanto, a dinâmica do sensor só pode ser desprezada quando o tempo para a transferência de oxigênio ($1/k_La$) for maior que 10 vezes o tempo de resposta (τ_r). Este tempo de resposta fica geralmente em torno de 5 segundos. Quando a resposta do eletrodo não é suficientemente rápida (10s < $1/k_La$ < 100s), o valor de k_La deve ser corrigido pela Equação 3.20 (GARCIA-OCHOA & GOMES, 2009).

$$C_{me} = C^* + \frac{C^* - C_0}{1 - \tau_r k_L a}\left[\tau_r k_L a \, exp\left(\frac{-t}{\tau_r}\right) - \exp\left(-k_L a\right)\right] \qquad (3.20)$$

Onde:

C_{me}: concentração de oxigênio dissolvido medida no eletrodo
C_0: concentração de oxigênio dissolvido no início da aeração
C*: concentração de saturação de oxigênio dissolvido
τ_r : tempo de resposta do eletrodo.

3.5.1.2.2Método dinâmico

O método dinâmico é similar ao método da desgaseificação, porém com o diferencial de considerar o consumo de oxigênio pelo micro-organismo, ou seja, o k_La é mensurado durante o processo fermentativo. De um modo geral, este método consiste na interrupção na aeração e redução da agitação do processo, com posterior leitura da concentração de oxigênio dissolvido

em determinados intervalos de tempo. Em alguns casos a redução na agitação do biorreator pode provocar um atraso no tempo de resposta do eletrodo, fazendo-se necessária a correção do valor obtido. Utilizando-se como base a Equação 3.11, chega-se a relação mostrada na Equação 3.21.

$$ln\left(\frac{C_{L,0}-C_L}{C_{L,0}-C_{L,1}}\right) = -k_L a(t-t_1) \qquad (3.21)$$

Onde:

$C_{L,0}$: concentração de oxigênio dissolvido no momento anterior a interrupção da aeração (t_0).
$C_{L,1}$: concentração de oxigênio dissolvido quando a aeração é reiniciada (t_1).

Analogamente ao método anterior, plotando-se um gráfico ln $(C_{L,0}-C_L)/(C_{L,0}-C_{L,1})$ em função de $(t-t_1)$ obtém-se o valor do k_La pelo coeficiente angular da reta. Essa metodologia pode ser encontrada de forma mais detalha nos trabalhos publicados por AMARAL (2007), SCHMIDELL et al. (2001) e BORZANI et al. (1975).

4 Materiais e Métodos

Neste capítulo são apresentados os materiais utilizados nos experimentos realizados e as metodologias aplicadas no monitoramento do bioprocesso empregando a levedura *Yarrowia lipolytica*.

4.1 Materiais

Os componentes dos meios de cultivo utilizados neste trabalho estão listados no Quadro 3.

Quadro 3 Reagentes utilizados na composição dos meios de cultivo e seus respectivos fabricantes.

Componente	Fabricante
$(NH_4)_2SO_4$	VETEC
KH_2PO_4	ISOFAR
K_2HPO_4	VETEC
$MgSO_4.7H_2O$	VETEC
NaCl	VETEC
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	SIGMA-ALDRICH
Glicerol	SIGMA-ALDRICH
Glicose	VETEC
Extrato de peptona	OXOID
Extrato de levedo	SIGMA-ALDRICH

O reagente utilizado nos ensaios de quantificação de teor lipídico foi o fluorocromo *Nile Red*, fabricado pela SIGMA-ALDRICH.

4.2 Equipamentos

Os principais equipamentos utilizados no trabalho foram:

1) Autoclave vertical Prismatec modelo CS;
2) Balança Analítica Adventurer Ohaus;
3) Biorreator Tecnal modelo Tec-bio-1,5;
4) Capela de fluxo laminar equipada com luz UV - BioFlux II A1 90 AC;
5) Centrífuga Eppendorf modelo Centrifuge5810R;
6) Citômetro de fluxo Partec modelo CyFlow Space;

7) Espectrofotômetro Spectra Max M2 – Molecular devices;
8) Incubadora com agitação Tecnal TE-4200;
9) Microscópio ótico Nikon modelo Eclipse E200 acoplado a câmera Evolution VF;
10) HPLC (*High Pressure Liquid Chromatography*), Shimadzu LC-20 AD SP.

4.3 Meios de cultivo

Os meios de cultivo utilizados nos experimentos estão descritos a seguir.

- YPD ("***Y****east Extract*, ***P****eptone*, ***D****extrose*") – composição (em p/v): extrato de levedo 1%, peptona 2% e glicose 2%.

- Meio mineral mínimo ou meio Reader modificado (não tamponado) – composição (em $g.L^{-1}$): $(NH_4)_2SO_4$, 3,0; KH_2PO_4, 1,0; K_2HPO_4, 0,16; $MgSO_4.7H_2O$, 0,70; NaCl, 0,5; $Ca(NO_3)_2.4H_2O$, 0,40; Cloridrato de tiamina, 0,0003; Glicerol, 87,35, 130,92 ou 174,56 (adaptado KOVALCHUK, 2005).

4.4 Micro-organismo

O micro-organismo empregado no presente estudo foi a levedura *Yarrowia lipolytica* 582 IMUFRJ 50682. Trata-se de uma cepa selvagem de *Y. lipolytica* isolada de um estuário da Baía de Guanabara no estado do Rio de Janeiro, Brasil, e caracterizada pelo Instituto de Microbiologia do Centro de Ciência da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro (HAGLER e MENDONÇA-HAGLER, 1981).

4.4.1 Preservação

Após 48 horas de crescimento em tubos de ensaio contendo meio YPD-Ágar (descrito no item 4.3), as células foram conservadas em freezer a 4°C.

4.5 Métodos analíticos

4.5.1 Determinação de peso seco

As células de *Yarrowia lipolytica* foram cultivas em meio YPD de onde foi retirada uma alíquota, posteriormente centrifugada a 8000 rpm e ressuspensa em solução salina NaCl 0,9%. A centrifugação foi repetida de duas a três vezes, a fim de eliminar quaisquer resquícios dos componentes do meio de cultivo na nova suspensão formada. Em seguida, retirou-se um volume de 10 mL desta solução, sendo este filtrado em membrana Millipore 0,45 µm que fora previamente pesada. A membrana contendo as células foi exposta a luz infravermelha por 30 minutos para secar e pesadas, repetindo-se o procedimento até a obtenção de peso constante. Sendo assim, desta mesma suspensão celular foram feitas diversas diluições de forma a obter-se diferentes concentrações celulares, cujas absorbâncias foram obtidas em espectrofotômetro a 570 nm. Plotando-se em um gráfico os valores de concentração celular (massa seca) e seus respectivos valores de absorbância, o coeficiente angular obtido foi utilizado para determinação do fator de conversão (f = 1/a) de absorbância em concentração de biomassa.

Adicionalmente, foram utilizadas as Equações 4.1 e 4.2 para determinação da taxa específica de crescimento microbiano e rendimento de substrato em produto.

$$\mu = \frac{(\ln X - \ln X_0)}{\Delta t} \qquad (4.1)$$

$$Y_{P/S} = -\frac{\Delta P}{\Delta S} \qquad (4.2)$$

4.5.2 Determinação do kLa

A determinação do k_La foi realizada pelo método da desgaseificação, conforme descrito no item 3.5.1.2.1. A leitura da concentração de oxigênio dissolvido foi feita por um sensor seletivo e os dados armazenados no *software* de controle e operação instalado no computador acoplado ao biorreator. Foram utilizados dois sistemas da TECNAL®, um com o sistema de aeração calibrado via *software* (Figura 22) e o segundo com um módulo a parte (Figura 23), em ambos os casos utilizando mesmos sensores de oxigênio e pH e mesmo biorreator. No entanto, diferentes módulos de aeração, ambos de controle manual, foram utilizados para cada configuração.

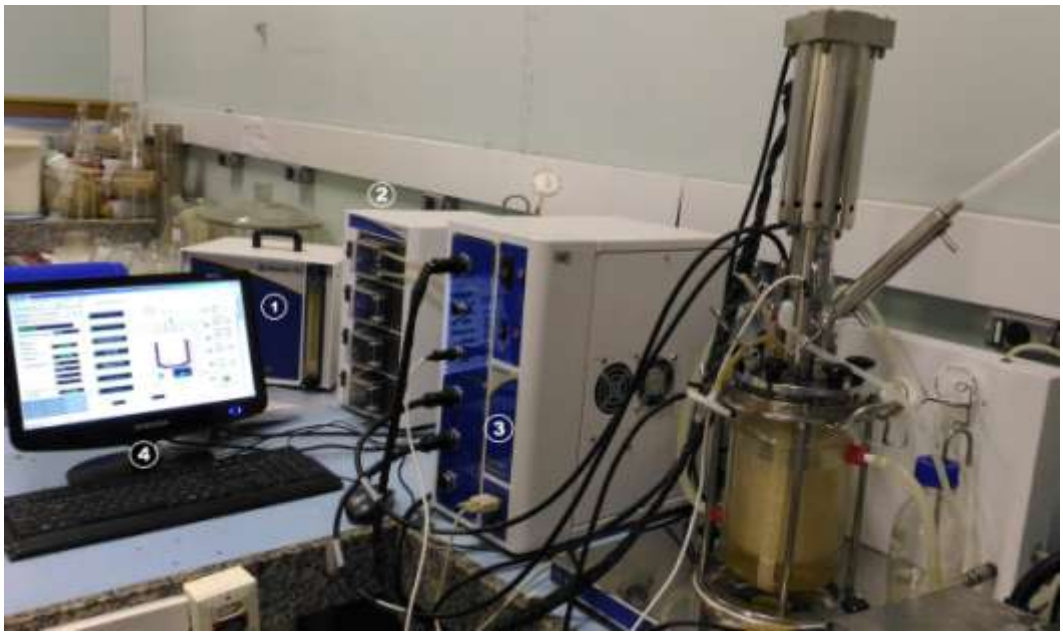

Figura 22 Biorreator TECNAL® em funcionamento. 1: Módulo de aeração; 2: Módulo de bombas; 3: Módulo de controle; 4: Computador acoplado.

.

Figura 23 Módulo de calibração do sensor de oxigênio dissolvido.

A configuração dos impelidores e da saída de aeração para todos os experimentos realizados neste trabalho é apresentada na Figura 24. O impelidor superior é do tipo hélice turbina (Rushton) e o inferior hélice turbina de lâminas curvadas. As distâncias entre os impelidores e entre a saída de ar foram definidas após realização de testes preliminares, onde as condições escolhidas foram as que minimizaram a estagnação de bolhas de ar na superfície do sensor de oxigênio dissolvido.

Figura 24 Configuração do equipamento: distância entre os impelidores e entre o impelidor e a saída de ar.

E o gráfico obtido pelo *software* quando aplicado o método da desgaseificação, ou seja, ciclo de borbulhamento alternado entre nitrogênio e oxigênio, é exemplificado na Figura 25.

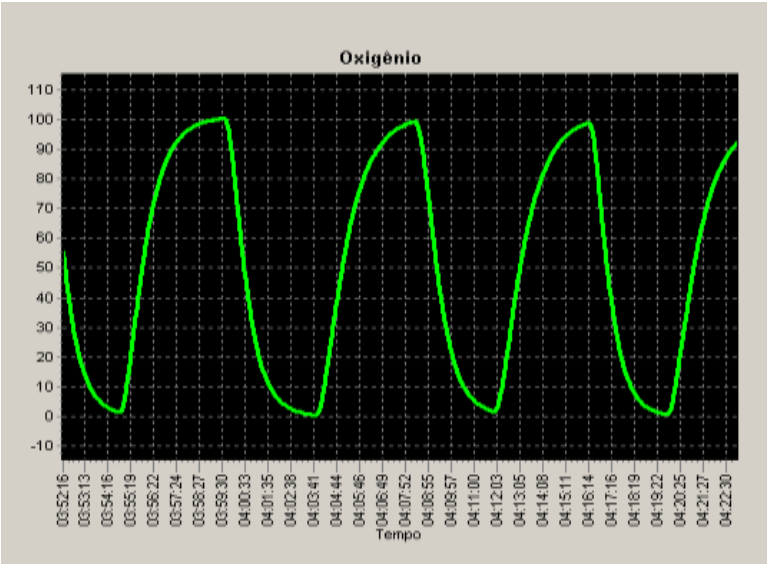

Figura 25 Gráfico da resposta obtida pelo *software* quando aplicado o método da desgaseificação.

4.5.3 Determinação do teor lipídico por citometria de fluxo

A determinação do teor lipídico por citometria de fluxo associada ao corante *Nile Red* foi realizada conforme protocolo estabelecido por MARTINS (2013). O citômetro de fluxo CyFlow Space é equipado com um laser de argônio de 488 nm e, sob a excitação deste laser

o *Nile Red* emite fluorescência a 580 nm e 610 nm quando dissolvido em lipídios neutros e polares, respectivamente. Estes são detectados pelos detectores FL2 (590 ± 25 nm) e FL3 (675 ± 20 nm). As células foram marcadas com 3,0 x 10^{-3} µM *Nile Red* em 1 mL de volume de reação e incubadas a 37°C por 7 minutos. Cada amostra contendo aproximadamente 60.000 células.mL^{-1}. Os dados de citometria de fluxo foram analisados utilizando o software FloMax© versão 2.7 (Partec GmbH, Munster, Alemanha).

4.5.4 Determinação do teor lipídico por espectrofluorimetria

A determinação do teor de lipídeos neutros utilizando o padrão de trioleína foi realizada por espectrofluorimetria associada ao corante *Nile Red*, conforme protocolo estabelecido por OLIVEIRA; KAMEDA; COELHO (2016). A partir da leitura de absorbância a 570 nm da amostra a ser analisada, foi calculado o volume necessário para obter-se uma concentração celular final de 0,3 ou 0,2 g.L^{-1} em um volume total de 3 mL contendo o volume fixo de 30 µL (1µg/mL) de corante *Nile Red*, completando-se o volume com água destilada. Essa solução foi homogeneizada e incubada a 37°C por 7 minutos na ausência de luz e a leitura foi realizada em espectrofluorímetro com comprimento de onda de excitação 500 nm, comprimento de onda de emissão 582 nm e filtro de corte 570 nm. O valor de fluorescência obtido foi correlacionado com a concentração equivalente de trioleína (padrão) mediante o gráfico apresentado na Figura 26.

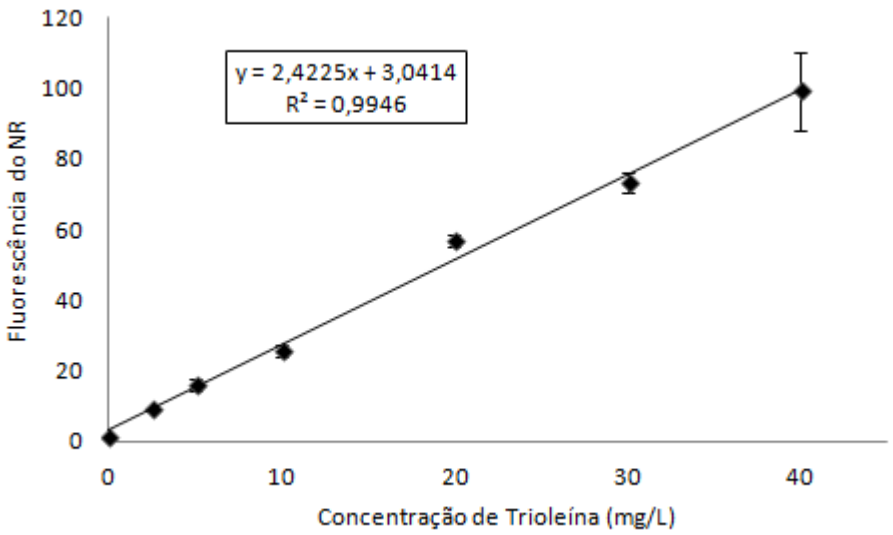

Figura 26 Faixa de linearidade de fluorescência para diferentes concentrações de trioleína.

A curva de correlação entre a intensidade de fluorescência do *Nile Red* e a concentração de trioleína (padrão lipídico) foi obtida mediante a leitura de amostras contendo 3 mL de

solução aquosa com concentração de trioleína variando entre 0 e 40 $mg.L^{-1}$ em espectrofluorímetro utilizando os parâmetros descritos acima.

4.5.5 Quantificação de componentes extracelulares

A concentração de glicerol, ácido cítrico, manitol e eritritol ao longo da batelada foram obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com injeção automática e detecção por medida de índice de refração a temperatura de 60°C, vazão de 0,8 mL min^{-1} da fase móvel (solução de ácido sulfúrico 5mM), utilizando a coluna Aminex HPX-87H 300 x 7,8 mm (Bio-Rad Laboratories Ltda), sendo os tempos de retenção observados para o ácido cítrico, manitol, eritritol e glicerol iguais a 6,1, 7,4, 8,6 e 9,8 minutos, respectivamente. As amostras a serem analisadas foram centrifugadas para retirada das células e o sobrenadante separado e filtrado em membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) com poro de 0,45 µm de diâmetro, sendo diluídas de 2 a 3 vezes conforme a necessidade.

4.6 Pré-inóculos

Os pré-inóculos de todos os experimentos realizados foram feitos em volumes de 200 mL e 400 mL de meio YPD em frascos Erlenmeyer incubados por 72 horas a 28 ºC com agitação constante de 160 rpm.

4.7 Cultivos em Erlenmeyer

Foi feito um experimento preliminar em triplicata com um volume de 200 mL de meio contendo glicerol puro na razão carbono/nitrogênio 75:1 em frascos Erlenmeyer incubados por 96 horas a 28º C, agitação de 250 rpm e concentração inicial de células de 1 $g.L^{-1}$. Esses experimentos foram realizados no intuito de se observar as diferenças na produção de bio-óleo em menor escala e sem sistema de aeração.

4.8 Cultivos em biorreator

Todos os cultivos em biorreator foram realizados em volume de 750 mL de meio contendo glicerol em diferentes concentrações para atingir a relação carbono-nitrogênio 50:1 e 100:1, essas relações foram escolhidas tendo por base os trabalhos desenvolvidos por MARTINS (2013) e KAMEDA et al. (2014). A agitação foi mantida em 650 rpm em todos

experimentos, parâmetro obtido após análise dos resultados de k_La discutidos no presente trabalho. Assim como, vazão de ar foi estudada em três valores 0,67, 1,33 e 2,0 vvm. Já o parâmetro temperatura foi fixado em 28ºC e o cultivo realizado por 96 horas após inoculação de uma concentração inicial de células de 1 ou 5 $g.L^{-1}$.

5 Resultados e Discussões

5.1 Cultivos em Erlenmeyer

Os experimentos em Erlenmeyer realizados em triplicata com concentração inicial de células de aproximadamente 1 $g.L^{-1}$ apresentaram um perfil de crescimento de celular semelhante (Figura 27), chegando a aproximadamente 8 $g.L^{-1}$ ao fim de 96 horas de cultivo. Ademais, a taxa específica de crescimento (μ) foi de 0,06 h^{-1} nos três cultivos.

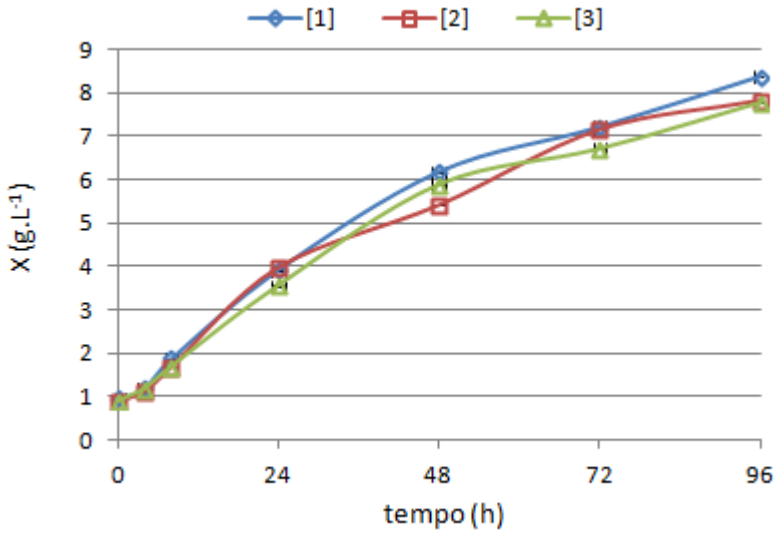

Figura 27 Crescimento celular em 96 horas de cultivo em erlenmeyer a 250 rpm e 28ºC (triplicata).

Em relação à produção de bio-óleo, observa-se em um perfil bastante similar nos experimentos 1 (Figura 28) e 2 (Figura 29), com produção de lipídeos polares e neutros próximo a um valor de 100 para fluorescência do corante Vermelho do Nilo (*Nile Red*). A quantidade de lipídeos polares foi ligeiramente superior a de neutros, e produção de lipídeos totais apresentou valores em torno de 200 e 250 de fluorescência, respectivamente.

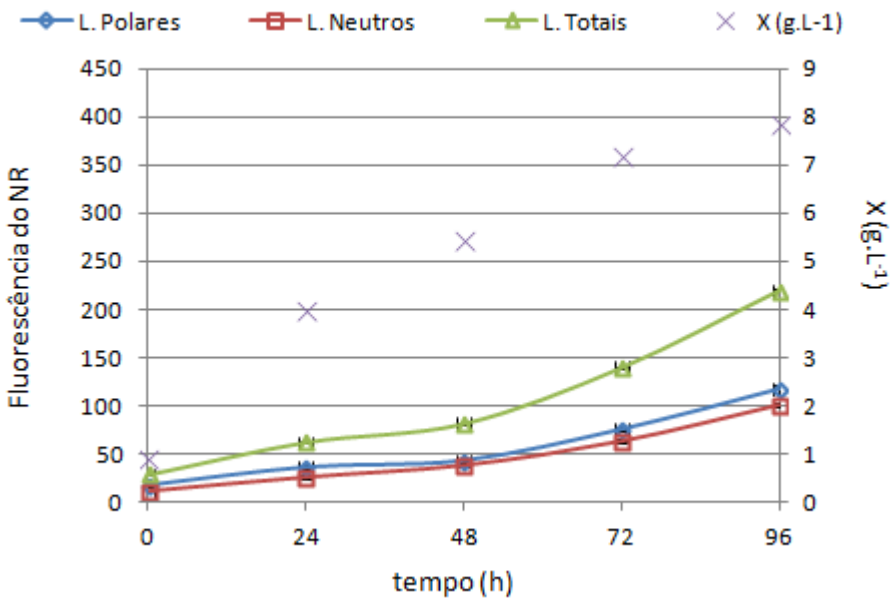

Figura 28 Determinação de lipídeos polares, neutros e totais por fluorescência de *Nile Red* e crescimento de biomassa a 28ºC e 250 rpm (experimento 1).

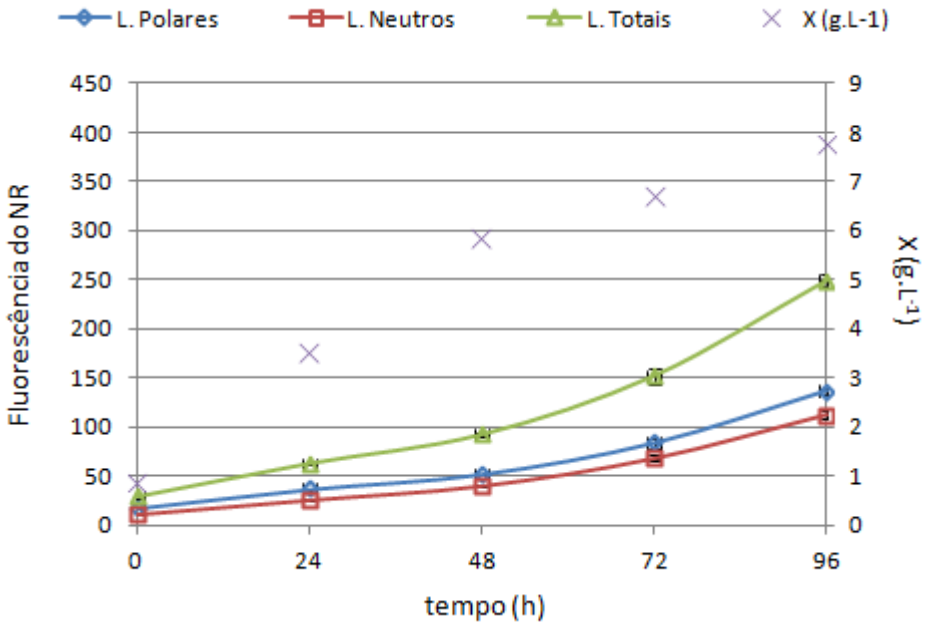

Figura 29 Determinação de lipídeos polares, neutros e totais por fluorescência de *Nile Red* e crescimento de biomassa a 28ºC e 250 rpm (experimento 2).

Em contrapartida, o terceiro experimento da triplicata apresentou um perfil bastante diferente de produção dos anteriores, o que posteriormente se mostrou ser mais semelhante aos experimentos realizados em biorreator (Figura 30).

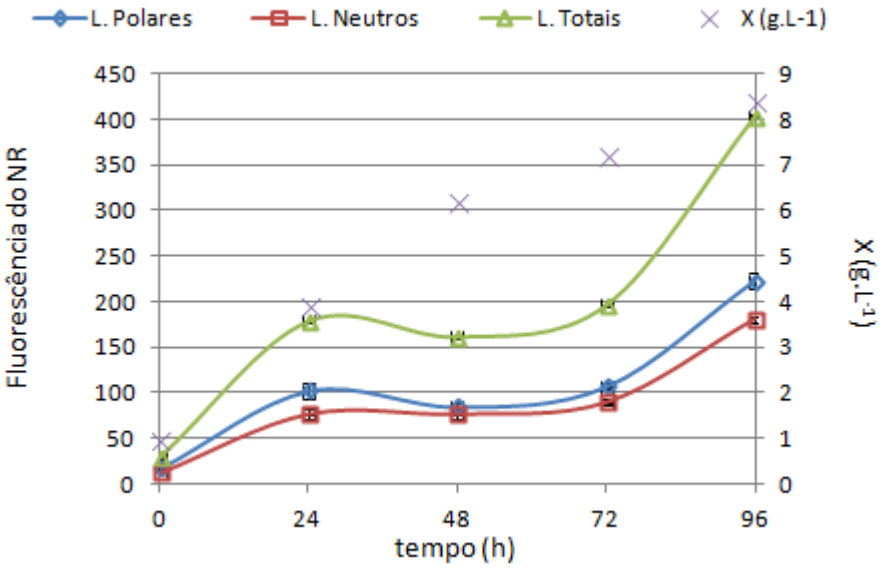

Figura 30 Determinação de lipídeos polares, neutros e totais por fluorescência de Nile Red e crescimento de biomassa a 28ºC e 250 rpm (experimento 3).

Neste último caso, a produção de óleo em 24 horas é mais rápida, voltando a ascender em 72 horas e ao fim de 96 horas a produção de lipídeos totais apresenta praticamente o dobro da fluorescência esperada. Uma razão para esse resultado divergente pode estar nas diferenças geométricas entre os frascos utilizados, acarretando diferentes perfis de transferência de oxigênio no sistema. Considerando que diferenças sutis na confecção de frascos de mesmo modelo e volume ocasionam diferenças significativas na transferência de oxigênio do sistema.

5.2 Determinação do kLa

Neste tópico serão discutidas a influência de diferentes variáveis no valor de k_La obtido, tais como, o equipamento utilizado, a vazão de ar, velocidade de agitação e composição do meio de cultivo.

5.2.1 Influência do equipamento de aeração

Nas medidas de k_La realizadas em equipamentos da mesma empresa (TECNAL®), cuja diferença foi apenas o módulo de aeração e o sistema de calibração do sensor de oxigênio dissolvido (módulo embutido ou a parte do sistema), obteve-se valores bastante diferentes, principalmente quando o meio utilizado na medição foi a água (Figura 31). Nesta condição, a transferência de oxigênio foi muito superior no sistema acoplado, chegando a uma diferença em torno de 77 h^{-1} no k_La medido (considerando o desvio padrão das medidas) na aeração de 0,67 vvm e 800 rpm de agitação.

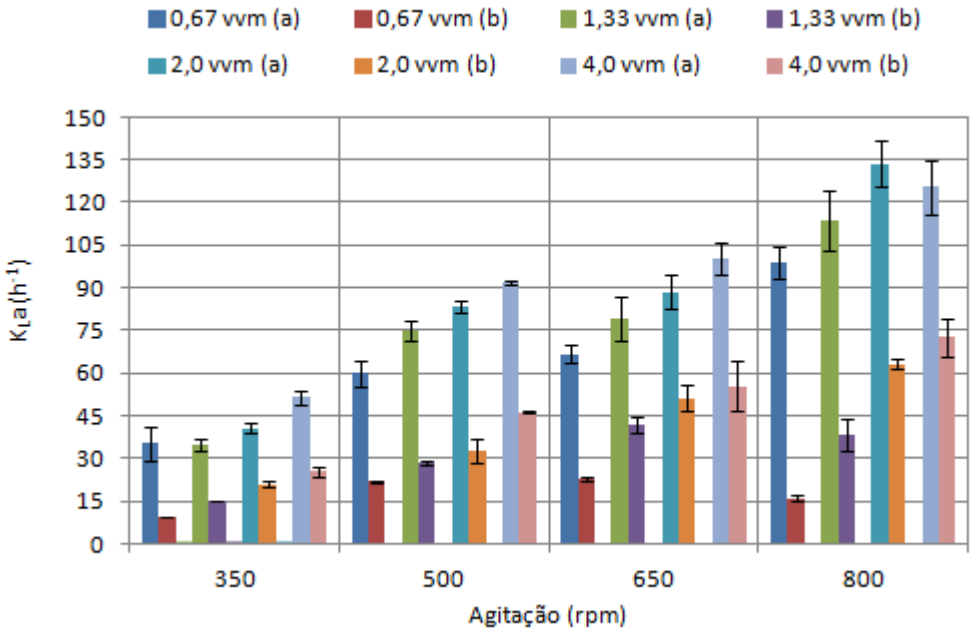

Figura 31 Determinação do k_La em água. (a) módulo de calibração do sensor de OD embutido; (b) módulo separado.

Essa diferença é minimizada quando se altera o meio de cultivo, onde na mesma condição de 0,67 vvm e 800 rpm essa diferença cai para aproximadamente 26 h^{-1} em meio mineral sem glicerol (Figura 32) e 48 h^{-1} em meio mineral contendo glicerol na relação carbono/nitrogênio 50:1 (Figura 33). Como o mesmo sensor foi utilizado, as únicas explicações para essa divergência de resultados podem estar na calibração do sensor, uma feita via *software* e outra por um módulo específico, ou na eficiência bomba de aeração. Em relação à bomba de aeração, embora o controle da vazão seja feito de forma manual e esteja suscetível a oscilações, as medidas de k_La foram realizadas com acompanhamento contínuo, de modo que tais variações não poderiam ter tanta expressividade no resultado final. Então, a maior suspeita é de que a metodologia de calibração do sensor de oxigênio esteja atrelada a essas verificações, fato que também explicaria a redução dessa diferença em diferentes meios, uma vez que as medidas foram realizadas em dias diferentes para cada sistema. Vale ressaltar que diferentemente do *software*, o módulo de calibração não fornece as curvas de calibração como resposta, não sendo possível um ajuste se necessário.

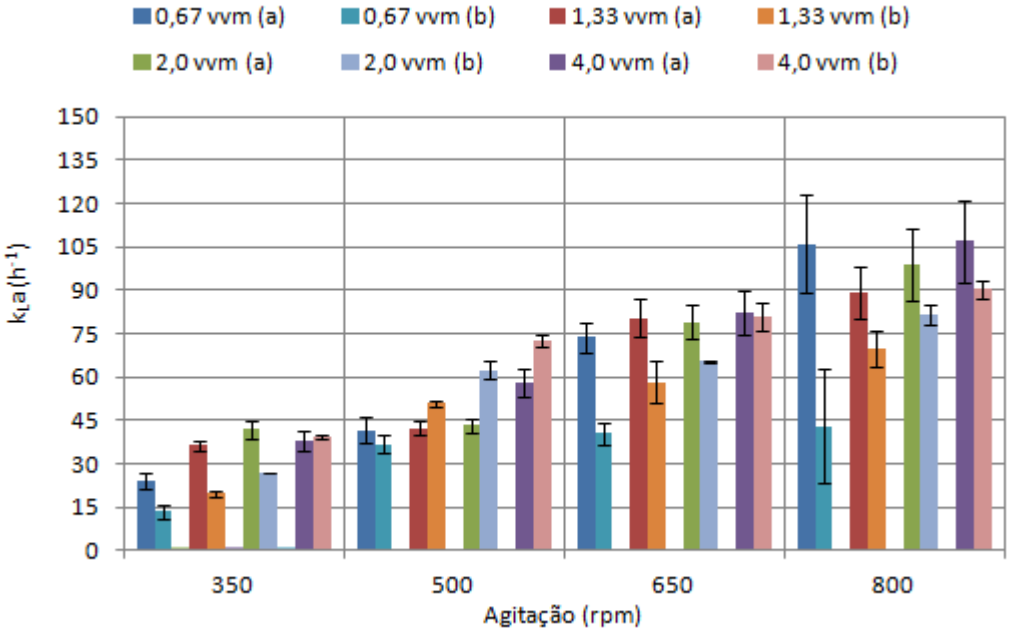

Figura 32 Determinação do k_La em meio mineral sem glicerol. (a) módulo de calibração do sensor de OD embutido; (b) módulo separado.

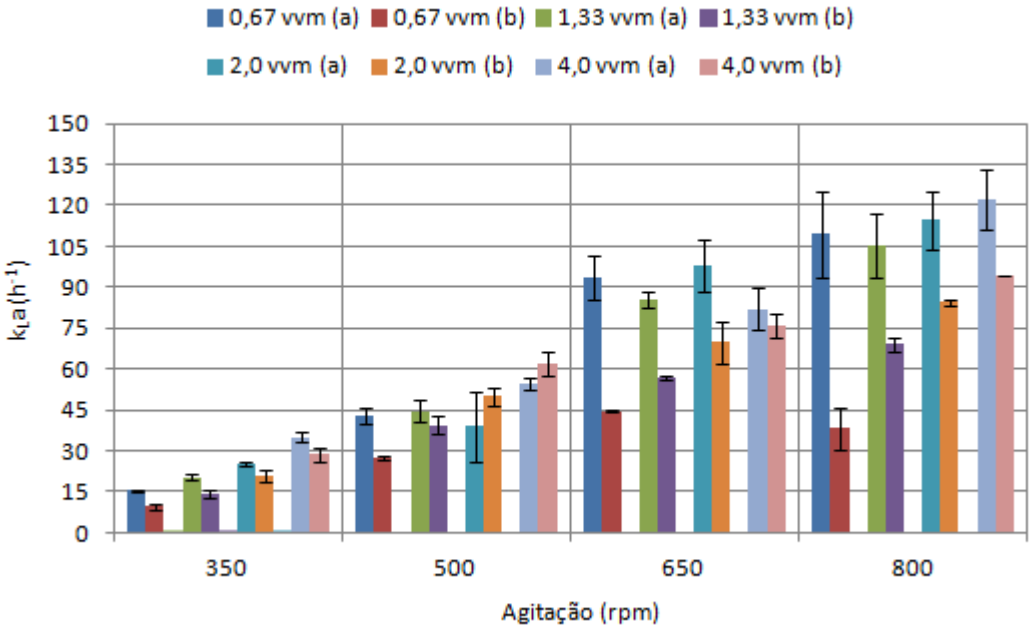

Figura 33 Determinação do k_La em meio mineral contendo glicerol na razão C/N 50:1. (a) módulo de calibração do sensor de OD embutido; (b) módulo separado.

5.2.2 Influência da vazão de ar e da velocidade de agitação

Como o sistema utilizando calibração embutida apresentou valores superiores de k_La, serão apresentados apenas os resultados de k_La para esta configuração.

Neste sistema, conforme esperado, o aumento na agitação do sistema implicou diretamente em um aumento no k_La. No entanto, mantendo-se a agitação constante e variando a vazão de ar de 0,67 vvm a 4,0 vvm, este efeito não foi observado e os valores de k_La se mantiveram similares (Figuras 34, 35, 36 e 37). Na menor agitação estudada (350 rpm), os valores de k_La se mantiveram entre 10 e 50 h^{-1}. O aumento na vazão de ar no sistema, provoca um ligeiro aumento no k_La, sem reduzir de forma significativa a diferença entre estes valores comparando diferentes meios medidos (Figura 34).

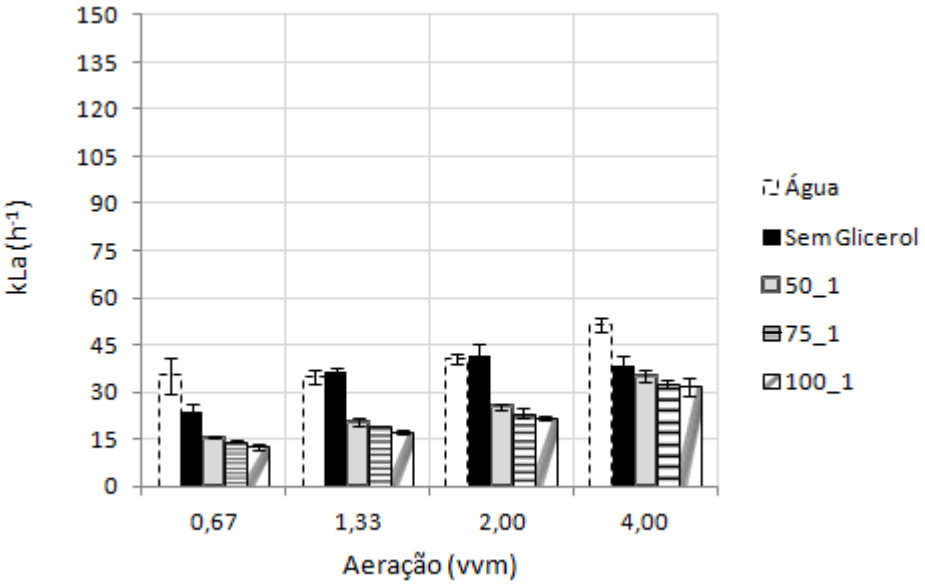

Figura 34 Determinação do k_La em água, meio mineral sem glicerol e com glicerol nas razões C/N 50:1, 75:1 e 100:1 a 350 rpm.

Aumentando-se a agitação para 500 rpm, a influência dos componentes do meio no valor de k_La fica mais evidente, enquanto em água atinge valores na faixa de 30 a 90 h^{-1}, os outros meios ficam abaixo de 45 h^{-1} e entre 60 e 45 h^{-1} quando a vazão é a máxima estudada, 4,0 vvm (Figura 35).

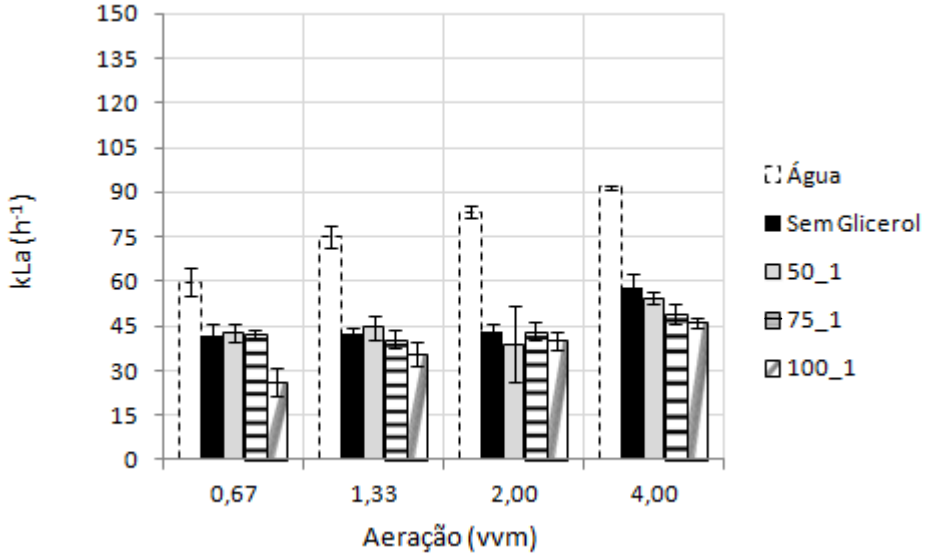

Figura 35 Determinação do k_La em água, meio mineral sem glicerol e com glicerol nas razões C/N 50:1, 75:1 e 100:1 a 500 rpm.

Já nas condições de maior agitação do sistema, 650 e 800 rpm, os efeitos dos componentes foram amenizados e os valores se mantiveram próximos mesmo com o aumento na aeração. A 650 rpm, o valor ficou em média em torno de 80 h^{-1} (Figura 36) e a 800 rpm essa média subiu para cerca de 100 h^{-1} (Figura 37). No entanto, o desvio padrão das medidas, realizadas em triplicada, foram maiores do que as condições anteriores.

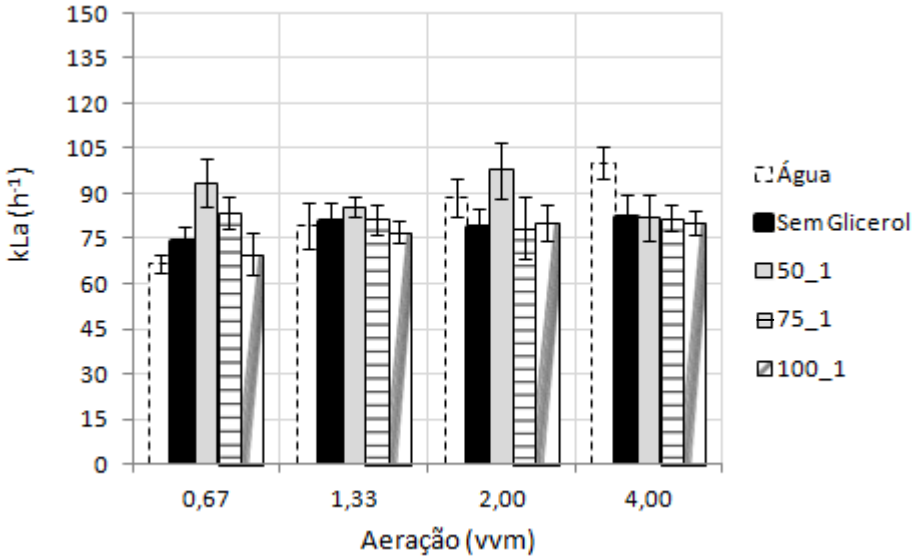

Figura 36 Determinação do k_La em água, meio mineral sem glicerol e com glicerol nas razões C/N 50:1, 75:1 e 100:1 a 650 rpm.

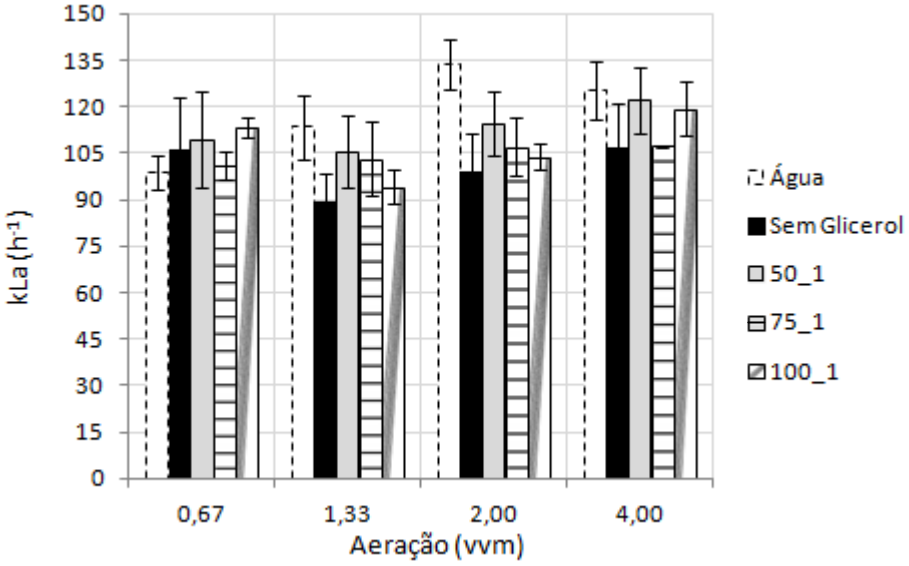

Figura 37 Determinação do k_La em água, meio mineral sem glicerol e com glicerol nas razões C/N 50:1, 75:1 e 100:1 a 800 rpm.

Embora a maior agitação tenha resultado em maiores valores do k_La, a agitação demonstrou-se muito rigorosa para o volume final de meio de 750 mL, inviabilizando sua aplicação no cultivo de células de *Y. lipolytica*. Desta forma, a condição de 650 rpm foi considerada a melhor dentre as estudadas para avaliar a produção de bio-óleo nesta levedura.

A correção do valor de k_La considerando o efeito da dinâmica do sensor de oxigênio, sugerida no subtópico 3.5.1.2.1, não foi necessária pois apenas sete das oitenta médias de k_La obtidas dos experimentos em triplicata se enquadravam no caso em ela se aplicaria.

AMARAL (2007) estudou a influência da presença de células inativas de *Y. lipolytica*, em concentrações de 5 e 10 $g.L^{-1}$, no valor do k_La medido. E observou que o aumento na concentração celular reduziu, mas de forma pouco expressiva, o valor do k_La em alguns casos.

5.3 Experimentos em biorreator

Os resultados obtidos nos cultivos realizados em biorreator variando a concentração inicial de biomassa, a vazão de ar imposta ao sistema de 0,67 a 2,0 vvm e a relação carbono/nitrogênio de 50:1 e 100:1, estão apresentados na Tabela 6. Estes resultados serão discutidos separadamente do subtópico 5.4 ao 5.7, sendo a discussão geral finalizada no subtópico 5.8 de considerações finais.

Tabela 6 Resumo das condições de processo e resultados obtidos nos experimentos realizados em biorreator a 650 rpm e 28ºC em 96 horas de cultivo de *Y. lipolytica*.

Experimento	Vazão de ar (vvm)	$[Glicerol]_0$ – $[Glicerol]_f$ ($g.L^{-1}$)	$X_0 – X_f$ ($g.L^{-1}$)	[Ác. cítrico /isocítrico]$_f$ ($g.L^{-1}$)	$[Manitol]_f$ ($g.L^{-1}$)	$[Eritritol]_f$ ($g.L^{-1}$)	Método de quantificação lipídica utilizado	Lipídeos totais/neutros 96h (Fluorescência de *Nile Red*)	[Trioleína] equivalente 96 h ($g.L^{-1}$)
1	0,67	79,27-6,14	4,21-9,79	3,5	15,91	8,78	E	-	2,38
2	1,33	70,38-58,74	4,71-10,98	0,52	4,75	4,62	CF	320/144	-
3	1,33	79,11-48,33	1,85-5,78	3,04	11,39	7,19	E	-	0,60
4	1,33	85,46-67,40	3,8-11,01	0,67	4,97	5,08	E	-	0,20
5	2,0	77,20-56,55	0,43-6,19	0,63	5,35	7,73	CF	884/403	-
6	2,0	89,60-78,80	4,64-10,00	0,84	2,93	4,41	E	-	0,24
7	2,0 – 0,67 (24-96h)	97,20-74,37	3,61-10,12	0,75	2,06	3,97	CF	926/366	-
8	2,0	196,86-148,44	2,88-9,90	1,9	8,03	33,56	CF	359/200	-

E: Espectrofluorimetria
CF: Citometria de fluxo

5.4 Determinação do teor lipídico por citometria de fluxo

5.4.1 Influência da vazão de ar

Mantendo-se a relação C/N 50:1 e 650 rpm de agitação, avaliou-se o efeito da vazão de ar nesse sistema. Ou seja, como uma mínima diferença no k_La poderia beneficiar ou não a produção de bio-óleo. Comparando os resultados por citometria de fluxo em 1,33 vvm (Figura 38) e 2,0 vvm (Figura 39), observa-se que o perfil de produção de lipídeos é diferente. Enquanto no primeiro caso o aumento do acumulo lipídico só comece a partir de 48 horas de cultivo, no segundo os valores estão sempre aumentando com o tempo, exceto pela existência de um platô entre 48 e 72 horas. Com isso, a resposta da fluorescência em *Nile Red* foi aproximadamente 2,5 vezes maior em 96 horas com o aumento da aeração. Além disso, a 1,33 vvm (Figura 38), ao contrário de a 2,0 vvm (Figura 39), houve maior produção em lipídeos neutros embora em ambos os casos essa diferença não seja muito grande.

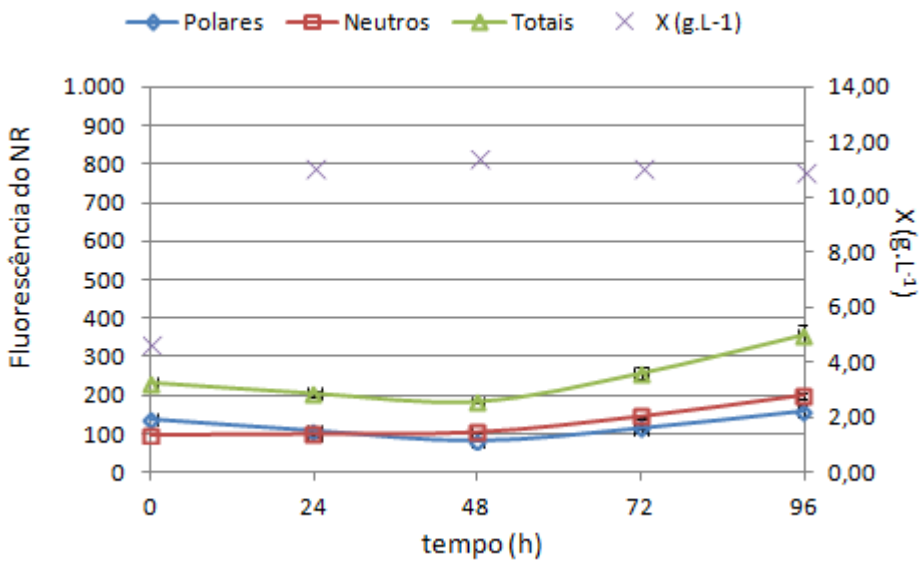

Figura 38 Determinação de lipídeos polares, neutros e totais por fluorescência de *Nile Red* e crescimento

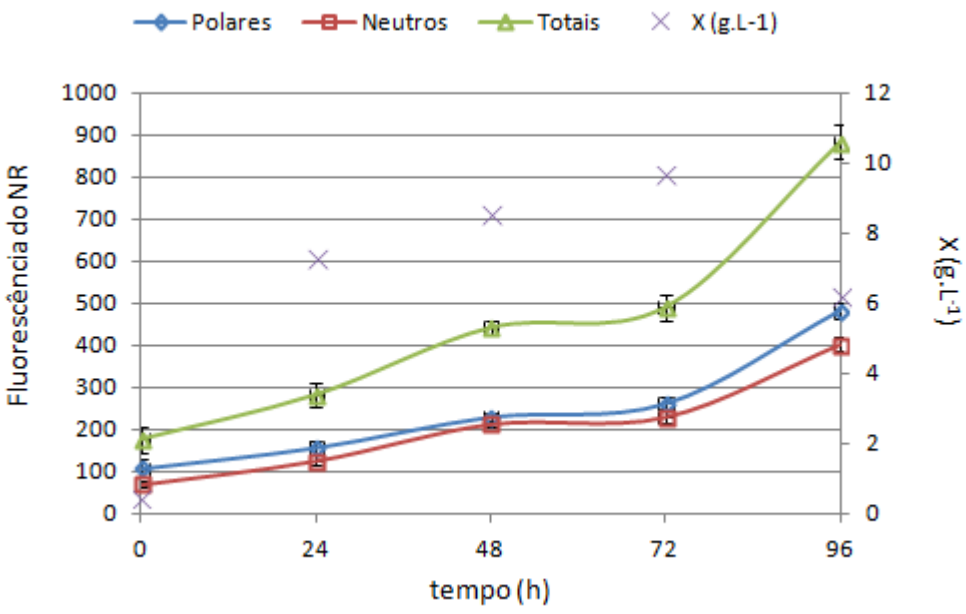

Figura 39 Determinação de lipídeos polares, neutros e totais por fluorescência de *Nile Red* e concentração de biomassa em 96h de cultivo a 2,00 vvm.

Avaliando a porcentagem de oxigênio dissolvido nestes sistemas ao longo do tempo, observa-se que a 1,33 vvm até as primeiras 24 horas, ou seja, durante a fase exponencial de crescimento, esse valor é mínimo e próximo a zero. E após 24 horas, entrando na fase estacionária, a concentração volta a aumentar atingindo a saturação em 100 % (Figura 40).

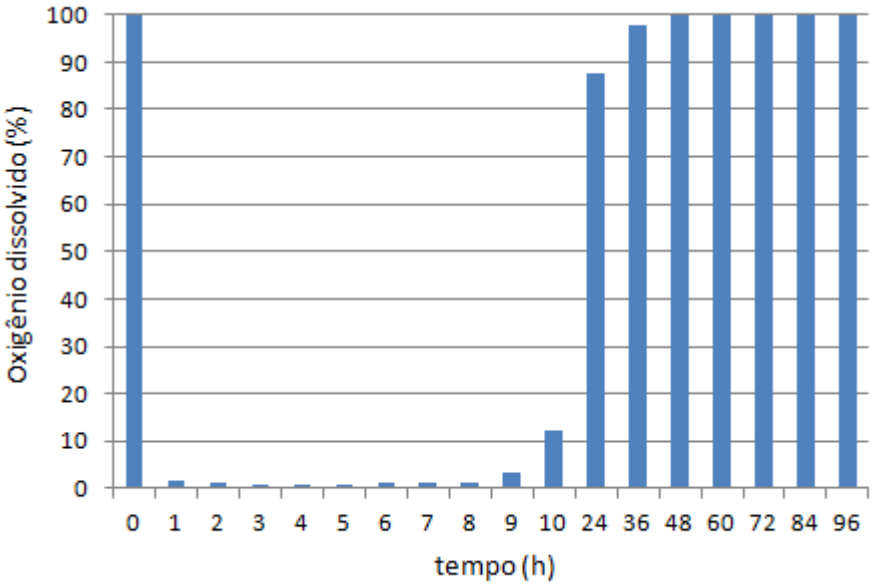

Figura 40 Porcentagem de oxigênio dissolvido ao longo do tempo no cultivo a 1,33 vvm.

Entretanto, devido a problemas de contaminação no pré-inóculo, o experimento de maior aeração começou com uma concentração inicial aproximadamente dez vezes menor que

o outro. Em termos de citometria, como esta é feita por média utilizando valores próximos de contagem celular, a comparação continua sendo válida. Isso significa, como pode-se observar, que uma maior concentração celular não necessariamente corresponde a um maior acúmulo de óleo. No entanto, do ponto de vista biológico, a concentração celular vai influenciar na disponibilidade de oxigênio e substrato para cada célula, podendo alterar o metabolismo do micro-organismo em um mesmo meio de cultivo. Já em relação ao perfil de oxigênio do sistema, com menor concentração de biomassa inicial (0,43g.L^{-1}) e maior vazão de ar (2,0 vvm), os valores obtidos foram todos superiores a 40% mesmo durante a fase exponencial de crescimento e na fase estacionária não foi possível obter esses valores devido a frequentes problemas na rede elétrica (dados não mostrados).

De um modo geral, o segundo experimento não apresenta dados confiáveis, tendo em vista a sequência de eventos não planejados que ocorreram, não permitindo o total controle das condições de processo. Entretanto, o fato da produção de bio-óleo ter sido maior quando na fase estacionária a transferência de oxigênio foi prejudicada pelo repetido desligamento do equipamento, possibilitou a tentativa de uma nova estratégia de aeração. Esta estratégia consistiu na aeração a 2,0 vvm por 24 horas, sendo reduzida para 0,67 vvm no restante do processo.

Conforme mostra a Figura 41, tanto o perfil de fluorescência quanto o de concentração celular foram diferentes dos observados nas Figuras 38 e 39. Neste caso, houve um rápido aumento de produção nas primeiras 24 horas, mantendo-se estável entre 24 e 72 horas e tornando a ascender em 96 horas. Pode-se observar que o perfil de produção de bio-óleo foi similar ao de crescimento celular nas primeiras 48 horas, porém em 72 horas quando a concentração celular deu um salto, esse aumento não foi acompanhado de um aumento no acúmulo de reservas lipídicas. Isso pode ter ocorrido provavelmente por efeito de β-oxidação, também chamada de fase de renovação lipídica, ou seja, degradação de lipídeos de reserva.

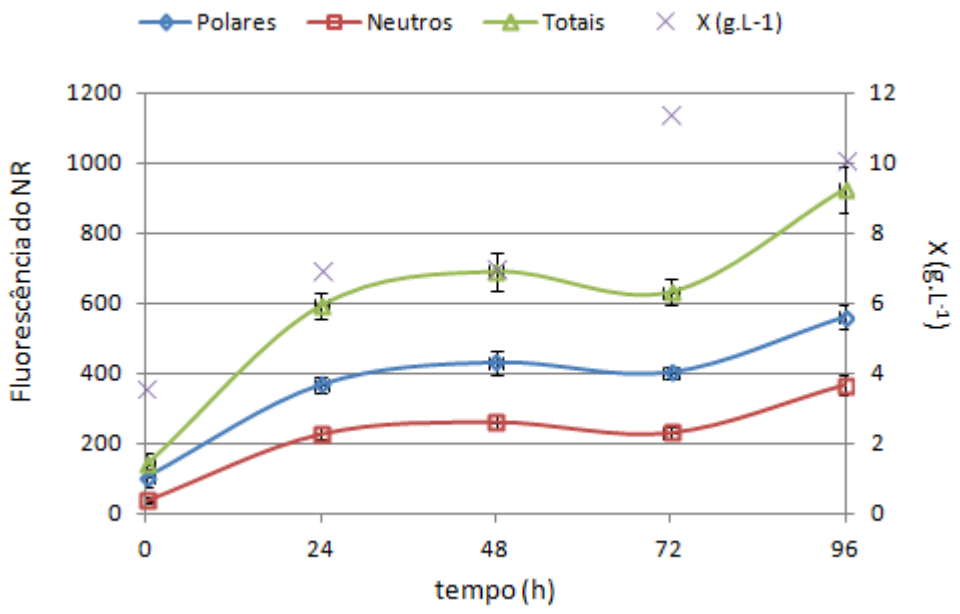

Figura 41 Determinação de lipídeos polares, neutros e totais por fluorescência de *Nile Red* e crescimento de biomassa em 96h de cultivo a 2,00 vvm por 24 horas e 0,67 vvm (24-96h).

A produção de lipídeos totais foi a maior obtida nas condições estudadas, chegando a um valor de fluorescência superior a 900 em 96 horas de cultivo. Além disso, a diferença entre lipídeos polares e neutros também aumentou. Essa observação pode ser provavelmente explicada pelo aumento de concentração celular e do número de corpúsculos lipídicos, já que a fração polar corresponde a lipídeos estruturais, como fosfolipídeos, esfingolipídeos e glicolipídeos (MARTINS, 2013). Sendo assim, esta estratégia se mostrou promissora, pois além de aumentar a produção de óleo, a redução da aeração também implica em redução de custos do processo.

O perfil de oxigênio dissolvido foi similar ao do cultivo a 1,33 vvm (Figura 40), embora o aumento tenha ocorrido a partir de 8 horas de cultivo e na fase estacionária a saturação não foi em 100% mas se manteve em valores superiores a 90% até o fim do experimento (Figura 42).

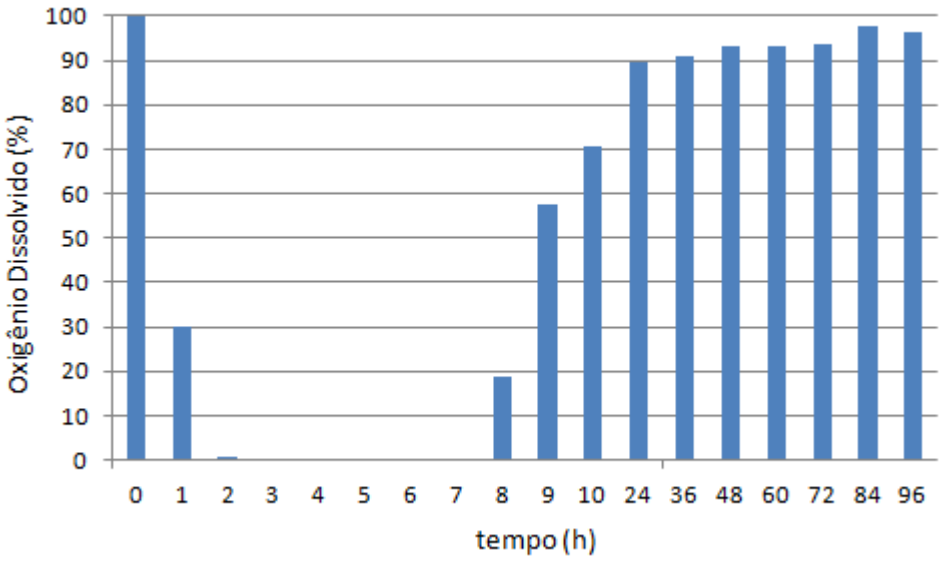

Figura 42 Porcentagem de oxigênio dissolvido ao longo do tempo no cultivo a 2,00 vvm por 24 horas e 0,67 vvm (24-96h).

Nestes três experimentos, o perfil de lipídeos totais apresenta uma tendência de aumento na produção após 96 horas. No entanto, em estudos desenvolvidos por KAMEDA et al. (2014), verificou-se que para a cepa *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 cultivada em meio similar, esse valor entrava em declínio a partir deste instante. A Tabela 7 mostra de forma resumida, a produção total de lipídeos nas diferentes condições de cultivo realizadas.

Tabela 6 Vazão de ar, taxa específica de crescimento (μ), concentração final de biomassa (Xf) e lipídeos totais em 96 horas de cultivo.

Experimento	Vazão de ar (vvm)	μ (h^{-1})	X_f ($g.L^{-1}$)	Lipídeos totais em 96 horas (Fluorescência de NR)
2	1,33	0,08	10,98	319,67
5	2,00	-	6,19	883,89
7	2,00 (24 h) e 0,67 (24-96h)	0,06	10,12	925,91

5.4.2 Influência da relação C/N

Aumentando-se a relação C/N de 50:1 para 100:1 e impondo uma aeração de 2,00 vvm (Figura 43), a produção de lipídeos totais foi praticamente a mesma observada a 1,33 vvm com relação C/N 50:1 (Figura 38). Ou seja, o excesso de substrato no meio desviou a rota metabólica desfavorecendo o acúmulo de reserva lipídica. Ademais, esse experimento apresentou taxa específica de crescimento de 0,09 h^{-1} e concentração final de células de 9,90 $g.L^{-1}$.

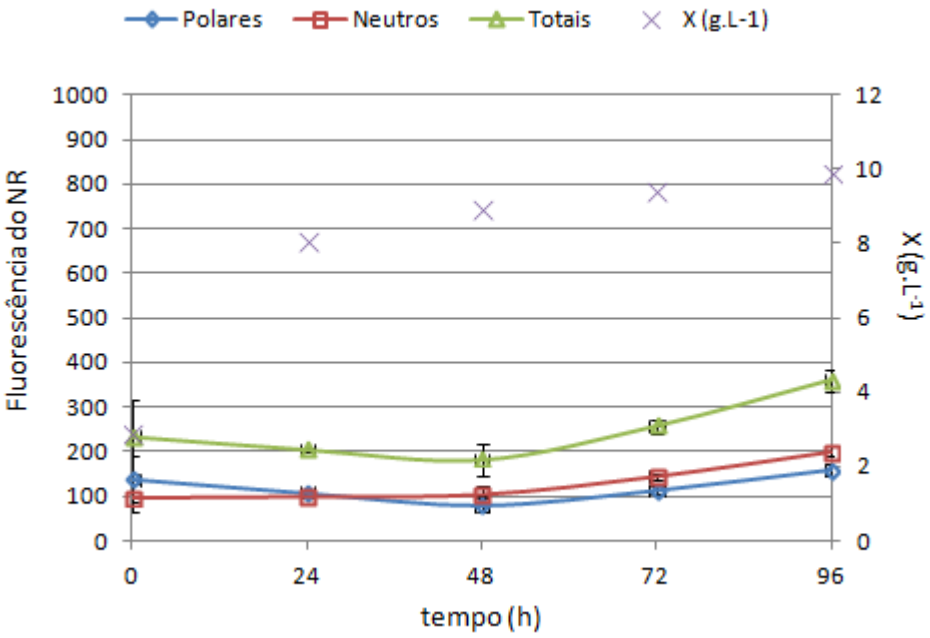

Figura 43 Determinação de lipídeos polares, neutros e totais por fluorescência de *Nile Red* e crescimento de biomassa em 96h de cultivo a 2,0 vvm e C/N 100:1.

A porcentagem de oxigênio dissolvido permaneceu superior a 50% ao longo de todo processo (Figura 44).

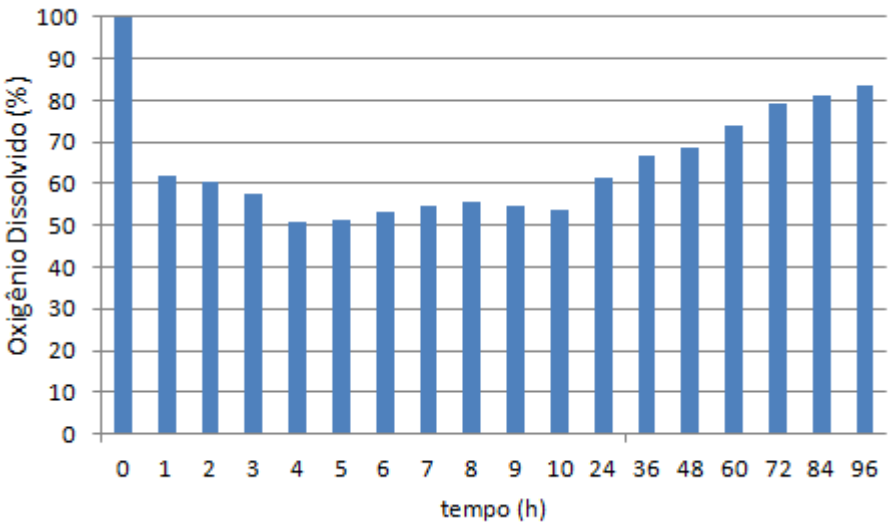

Figura 44 Porcentagem de oxigênio dissolvido ao longo do tempo no cultivo a 2,00 vvm e relação C/N 100:1.

5.5 Determinação do teor lipídico por espectrofluorimetria

5.5.1 Influência da vazão de ar

Quantificando a produção de bio-óleo por espectrofluorimetria, mantendo a relação C/N 50:1, agitação 650 rpm e variando a vazão de ar, observa-se que a produção de bio-óleo foi muito superior na menor vazão (0,67 vvm) (Figura 45). A priori, essa produção de 2,38 $g.L^{-1}$ pode parecer baixa, mas ela representa 24% em peso seco da biomassa gerada, valor interessante por se tratar de uma cepa selvagem. Esse resultado é similar ao obtido no trabalho de POLI et al. (2014) utilizado a cepa *Yarrowia lipolytica* QU21, onde esse percentual ficou em torno de 18 e 25%.

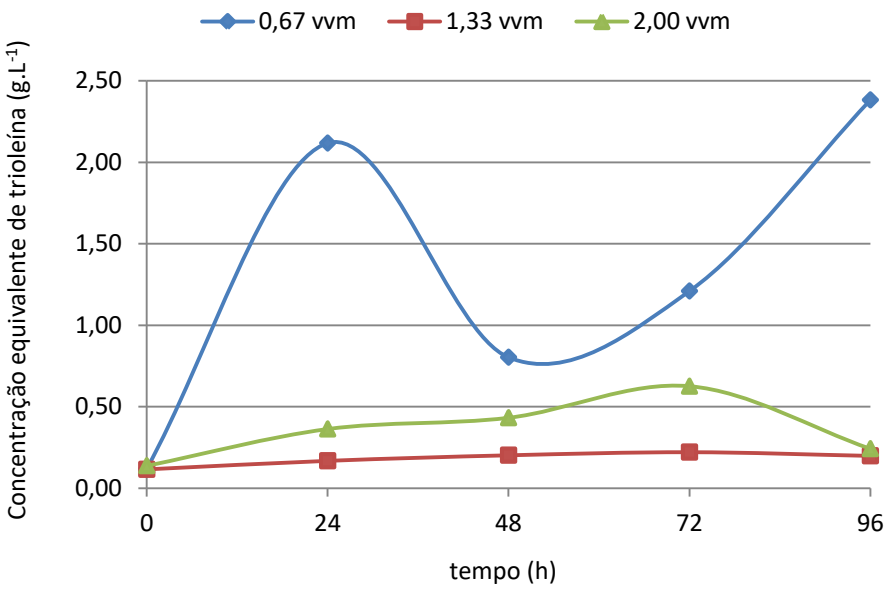

Figura 45 Concentração equivalente de trioleína em 96 horas de cultivo a 650 rpm, relação C/N 50:1 e variando a vazão de ar.

Aparentemente, o aumento na vazão de ar no sistema tem efeito negativo no acúmulo de bio-óleo. Este efeito também foi observado por KAVSCEK et al. (2015) no cultivo em regime de batelada alimentada com cepa de *Y. lipolytica* geneticamente modificada. Após 48 horas de cultivo, foi observado um conteúdo lipídico 67% maior (39% em peso seco) na condição de esgotamento simultâneo de fonte de nitrogênio e oxigênio quando comparado a condição de limitação apenas por nitrogênio.

O percentual de oxigênio dissolvido foi similar nas vazões 1,33 vvm (Figura 47) e 2,0 vvm (Figura 48), o que pode explicar o perfil parecido de produção de bio-óleo, enquanto que

na condição de 0,67 vvm esses percentuais se mantiveram mais baixos durante a fase estacionária (Figura 46).

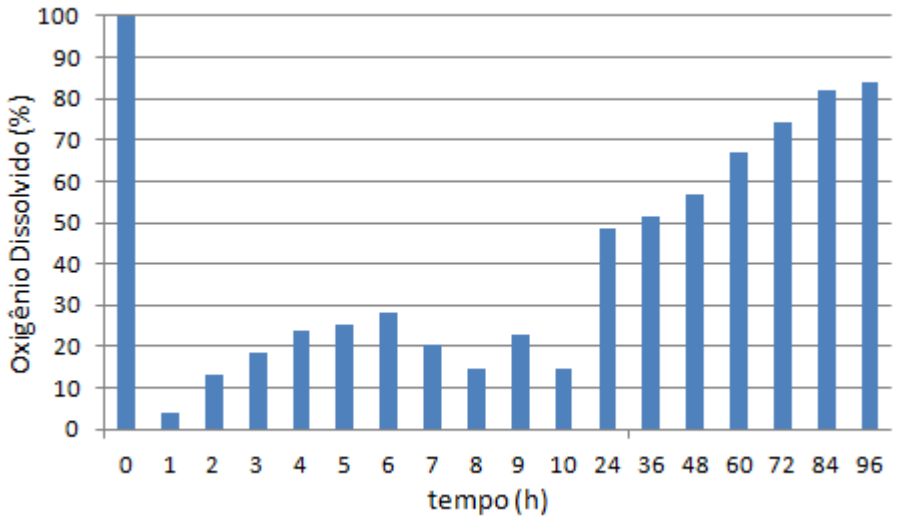

Figura 46 Porcentagem de oxigênio dissolvido ao longo do tempo no cultivo a 0,67 vvm, relação C/N 50:1 e 650 rpm.

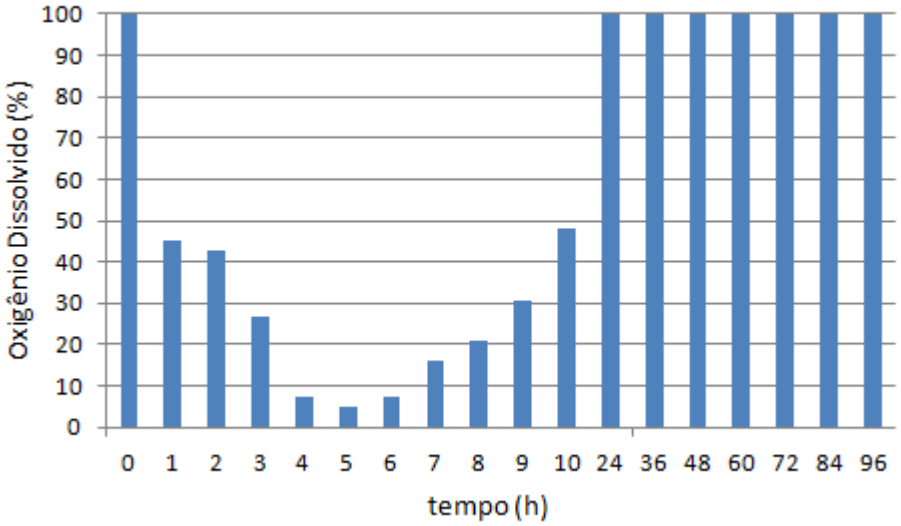

Figura 47 Porcentagem de oxigênio dissolvido ao longo do tempo no cultivo a 1,33 vvm, relação C/N 50:1 e 650 rpm.

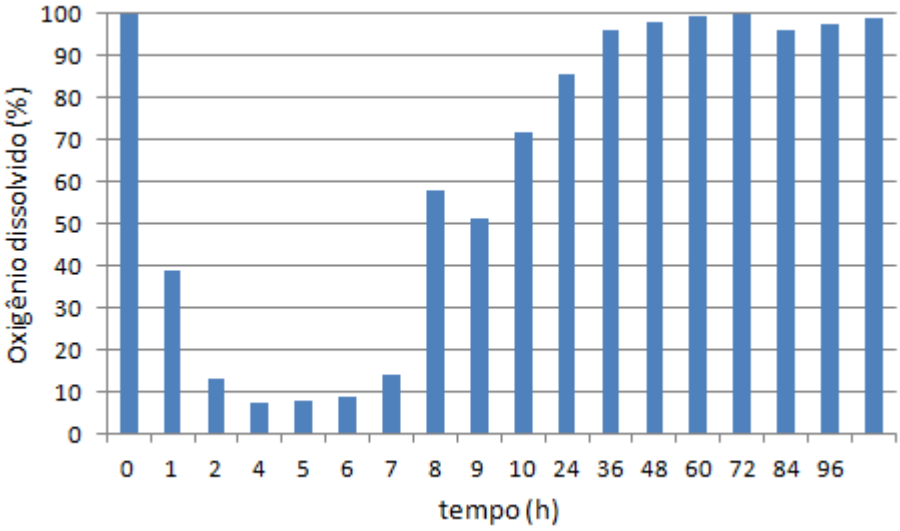

Figura 48 Porcentagem de oxigênio dissolvido ao longo do tempo no cultivo a 2,0 vvm, relação C/N 50:1 e 650 rpm.

A Tabela 8 mostra as principais diferenças observadas no cultivo ao se aumentar a vazão de ar.

Tabela 7 Vazão de ar, taxa específica de crescimento (μ), concentração final de biomassa (Xf), rendimento de substrato em produto ($Y_{P/S}$) e concentração de equivalente de trioleína em 96 horas de cultivo.

Experimento	Vazão de ar (vvm)	μ (h^{-1})	X_0-X_f ($g.L^{-1}$)	$Y_{P/S}$ ($g\ g^{-1}$)	Concentração de trioleína em 96 horas ($mg.L^{-1}$)
1	0,67	0,11	4,21-9,79	0,004	2382,1
4	1,33	0,13	3,81-11,01	0,010	198,9
6	2,00	0,10	4,64-10,00	0,005	242,5

5.6 Comparação entre a determinação do teor lipídico por citometria de fluxo e espectrofluorimetria

Ao se comparar de forma qualitativa o perfil de produção de bio-óleo a 1,33 vvm, 650 rpm de agitação e relação C/N 50:1 por análise de citometria de fluxo e por espectrofluorimetria (Figura 49), observa-se uma grande diferença os resultados destas metodologias. O aumento e declínio nos valores obtidos não ocorrem de forma análoga.

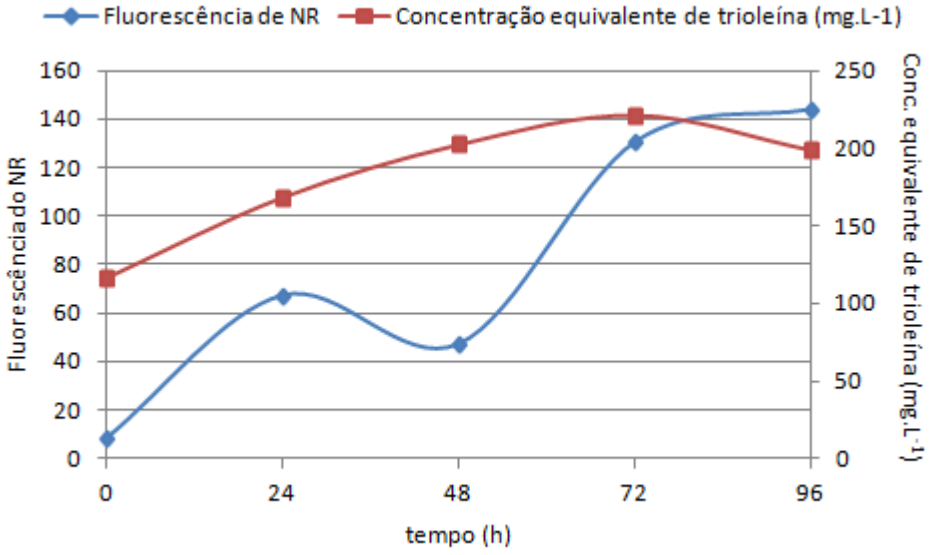

Figura 49 Perfil de produção de lipídeos neutros por citometria de fluxo e espectrofluriorimetria para uma mesma condição de processo.

Removendo-se o valor obtido em 48 horas foi possível obter uma correlação de R^2 próximo a 0,9 entre a concentração equivalente de trioleína obtida por espectrofluorimetria e a fluorescência de *Nile Red* gerada em análise por citometria de fluxo para lipídeos neutros (Figura 50).

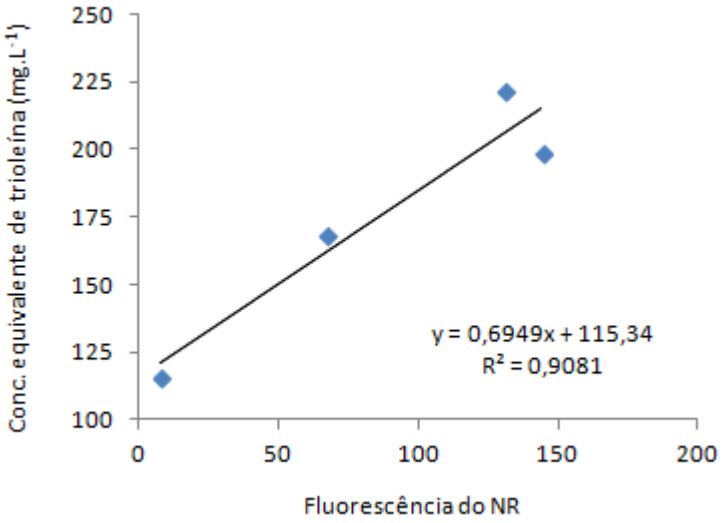

Figura 50 Curva de correlação entre a metodologia de citometria de fluxo e espectrofluorimetria em cultivo a 1,33 vvm, 650 rpm e relação C/N 50:1.

A análise espectrofluorimétrica possui uma metodologia de simples implementação e demonstrou-se um sistema linear para a quantificação de lipídeos neutros, sendo uma alternativa interessante para a determinação lipídica sem necessidade de extração do óleo intracelular acumulado. Já a análise por citometria de fluxo possui a vantagem de analisar

individualmente as células marcadas com o fluorocromo *Nile Red* gerando como resposta a média dessas quantificações, aumentando a acurácia da medição. Ademais, esta metodologia apresenta resultados mais completos, diferenciando lipídeos neutros e polares e permitindo outras análises da fisiologia celular. No entanto, ao comparar os resultados obtidos nas diferentes análises, não foi possível obter uma correlação satisfatória entre a análise espectrofluorimétrica e por citometria de fluxo.

5.7 Quantificação de componentes extracelulares

5.7.1 Consumo de glicerol

A Tabela 9 mostra o perfil de consumo de glicerol nas diferentes condições estudas.

Tabela 8 Perfil de consumo de glicerol para diferentes concentrações iniciais de biomassa e vazões de ar em sistema agitado a 650 rpm, 28ºC e relação C/N 50:1.

Experimento	Vazão de ar (vvm)	X_0-X_F ($g.L^{-1}$)	$[Glicerol]_0$ ($g.L^{-1}$)	[Glicerol] remanescente ($g.L^{-1}$)	Consumo de glicerol ($g.L^{-1}$)
1	0,67	4,21-9,79	79,27	6,14	73,13
2	1,33	4,71-10,98	70,38	58,74	11,64
3	1,33	1,85-5,78	79,11	48,33	30,78
4	1,33	3,8-11,01	85,46	67,40	18,06
5	2,00	0,43-6,19	77,20	56,55	20,65
6	2,00	4,6-10,00	89,60	78,80	10,8
7	2,0 por 24h e 0,67 (24-96h)	3,61-10,12	97,20	74,37	22,83
8[a]	2,0 vvm	2,88-9,90	196,86	148,44	48,42

[a]C/N 100:1

A partir destes dados, observa-se que os maiores valores de consumo foram da condição de menor aeração, onde houve estímulo a produção de bio-óleo e da condição como maior relação carbono nitrogênio, que resultou uma das maiores produções de manitol e eritritol deste trabalho. No entanto, o mesmo efeito não foi observado para o experimento 7[a], que também apresentou alta produção lipídica.

5.7.2 Produção de ácido cítrico/isocítrico

A produção de ácido cítrico/isocítrico extracelular foi inferior a 1 $g.L^{-1}$ e similar na maioria dos experimentos, exceto nos experimentos 1, 3 e 8 (Tabela 10). Os experimentos 3 e

8 apresentaram uma baixa produção de bio-óleo, ou seja, houve acúmulo desse composto ao invés da utilização do mesmo na via lipogênica.

Tabela 9 Concentração final de ácido cítrico/isocítrico em diferentes condições de processo.

Experimento	X_0-X_F ($g.L^{-1}$)	Vazão de ar de processo (vvm) para C/N 50:1 e 650 rpm	Concentração final de ác. cítrico/isocítrico ($g.L^{-1}$)
1	4,21-9,79	0,67	3,5
2	4,71-10,98	1,33	0,52
3	1,85-5,78	1,33	3,04
4	3,8-11,01	1,33	0,67
5	0,43-6,19	2,00	0,63
6	4,6-10,00	2,00	0,84
7	3,61-10,12	2,0 por 24h e 0,67 (24-96h)	0,75
8[a]	2,88-9,90	2,0	1,9

[a]C/N 100:1

5.7.3 Produção de manitol e eritritol

5.7.3.1 Experimento a 0,67 vvm.

No menor valor de vazão de ar estudado, a via de produção de solutos compatíveis foi favorecida em relação a produção de bio-óleo. Os dois produtos apresentaram um perfil de produção associada ao crescimento. A produção de manitol e eritritol ao final de 96 horas foi de 15,91 e 8,78 $g.L^{-1}$, respectivamente (Figura 51). Esta foi a maior produção de manitol observada nos experimentos deste trabalho, com rendimento de glicerol em manitol de 0,22 $g.g^{-1}$, enquanto que o rendimento em eritritol foi de 0,11 $g.g^{-1}$.

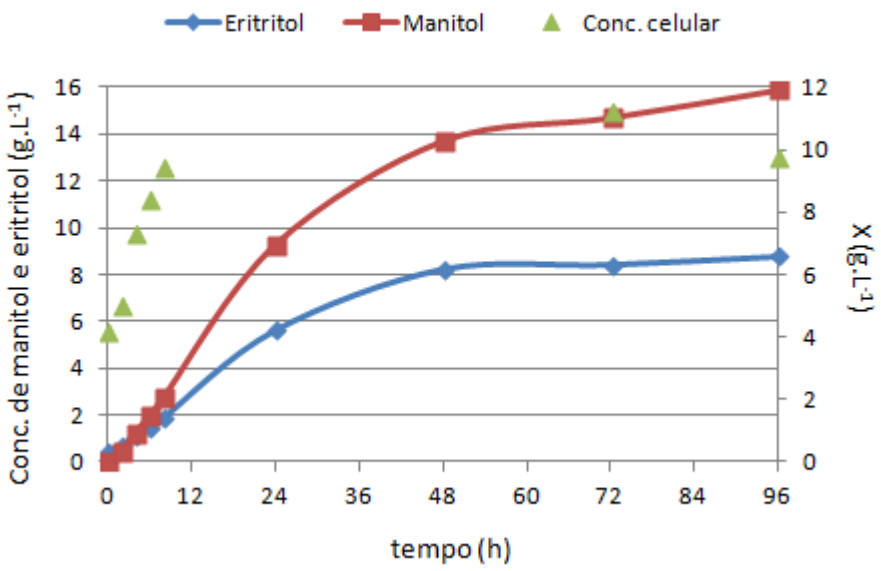

Figura 51 Concentração de manitol, eritritol e biomassa no cultivo de Y. lipolytica a 0,67 vvm, 650 rpm e C/N 50:1 por 96 horas.

5.7.3.2 Experimentos a 1,33 vvm

Aumentando a vazão de ar para 1,33 vvm a via de produção de polióis passa a ser desfavorecida. Os experimentos 2 (Figura 52) e 4 (Figura 54) apresentaram o mesmo perfil de produção destes compostos e assim como no caso anterior, associada ao crescimento. A concentração final de ambos compostos ficou em torno de 5 $g.L^{-1}$. Em contrapartida, no experimento 3 foram produzidos 11,39 e 7,19 $g.L^{-1}$ de manitol e eritritol, respectivamente. Essa maior produção pode ser uma reposta à concentração inicial de substrato, uma vez que a carga microbiana inicial foi aproximadamente duas vezes menor que as demais. A Tabela 11 mostra um comparativo destes três experimentos.

Tabela 10 Concentração inicial de células, concentração final de eritritol e manitol e rendimento de glicerol em manitol e eritritol nos experimentos a 1,33 vvm, 650 rpm e C/N 50:1.

Experimento	X_0-X_F ($g.L^{-1}$)	$[Manitol]_f$ ($g.L^{-1}$)	$[Eritritol]_f$ ($g.L^{-1}$)	$Y_{manitol/glicerol}$ (g g-1)	$Y_{eritritol/glicerol}$ (g g-1)
2	4,71-10,98	4,75	4,62	0,388	0,390
3	1,85-5,78	11,39	7,19	0,370	0,219
4	3,8-11,01	4,97	5,08	0,274	0,257

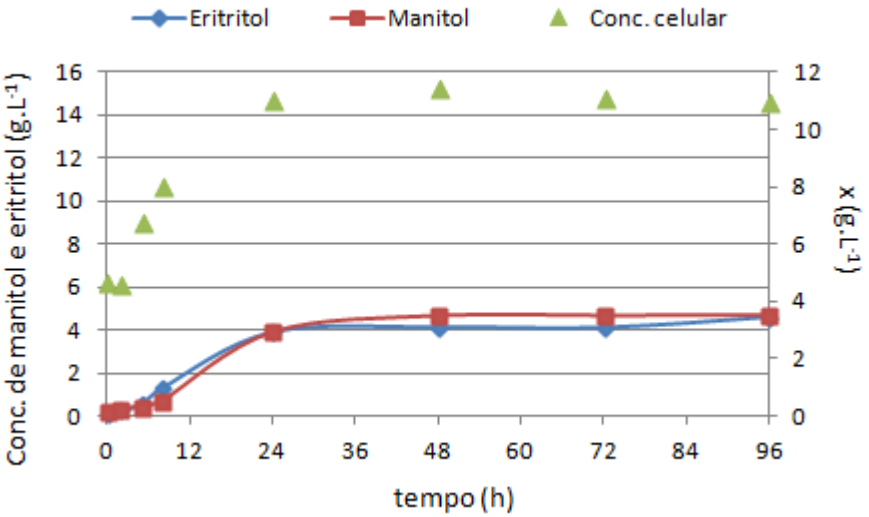

Figura 52 Concentração de manitol, eritritol e biomassa no cultivo de *Y. lipolytica* a 1,33 vvm, 650 rpm e C/N 50:1 por 96 horas (Experimento 2[a]).

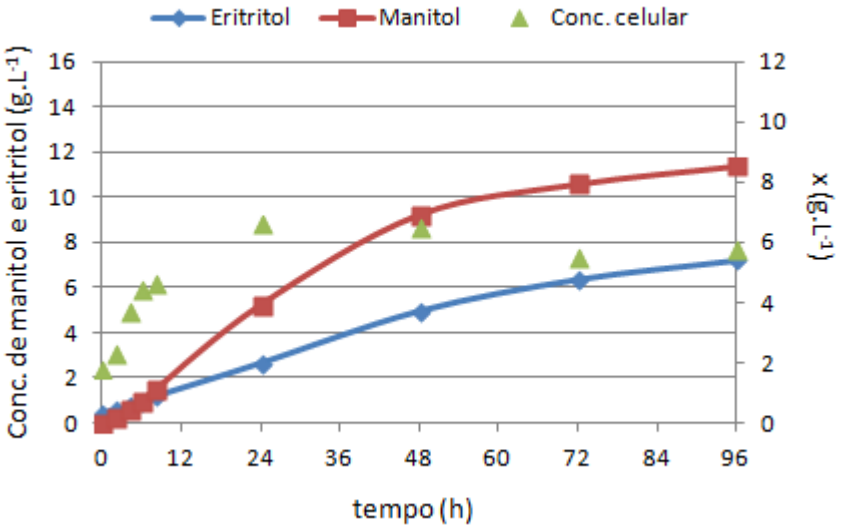

Figura 53 Concentração de manitol, eritritol e biomassa no cultivo de *Y. lipolytica* a 1,33 vvm, 650 rpm e C/N 50:1 por 96 horas (Experimento 3[b]).

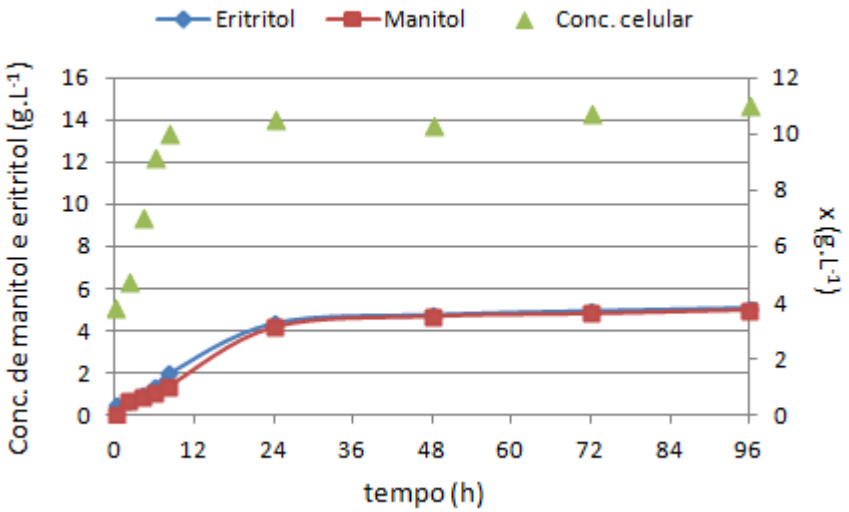

Figura 54 Concentração de manitol, eritritol e biomassa no cultivo de *Y. lipolytica* a 1,33 vvm, 650 rpm e C/N 50:1 por 96 horas (Experimento 4[b]).

5.7.3.3 Experimentos a 2,0 vvm e 2,0 vvm por 24 horas e 0,67 vvm (24-96h).

A produção de manitol e eritritol a 2,00 vvm (6; Tabela 12) e 2,00 vvm na fase exponencial e 0,67 vvmna fase estacionária (7; Tabela 12) foi similiar em termos de concentração final obtida. No entanto, o rendimento de glicerol nesses produtos foi superior na primeira estratégia, devido à produção de bio-óleo ter sido maior quando aplicada a estratégia de redução da aeração na fase estacionária. Já para o experimento 5 (Tabela 12), a baixa concentração inicial de células intensificou o efeito da concentração inicial de substrato no metabolismo microbiano, favorecendo uma maior produção destes compostos.

Tabela 11 Concentração inicial de células, concentração final de eritritol e manitol e rendimento de glicerol em manitol e eritritol nos experimentos a 2,00 vvm , 650 rpm e C/N 50:1.

Experimento	X_0-X_f ($g.L^{-1}$)	$[Manitol]_f$ ($g.L^{-1}$)	$[Eritritol]_f$ ($g.L^{-1}$)	$Y_{manitol/glicerol}$ ($g\ g^{-1}$)	$Y_{eritritol/glicerol}$ ($g\ g^{-1}$)
5	0,43-6,19	5,35	7,73	0,258	0,372
6	4,6-10,00	2,93	4,41	0,237	0,365
7[a]	3,61-10,12	2,06	3,97	0,090	0,155

[a]2,00 e 0,67 vvm (24-96h)

5.7.3.4 Efeito do aumento da relação C/N

De um modo geral, para favorecer a produção de manitol e eritritol, submete-se a levedura a um estresse osmótico provocado por altas cargas iniciais de substrato e de um sal, comumente NaCl. Entretanto, nas condições de processo do presente trabalho, apenas a alta

concentração inicial de glicerol (196,86 g.L^{-1}) foi suficiente para desviar a rota metabólica no sentido de produção destes compostos. Ao final de 96 horas de cultivo obteve-se 33,56 g.L^{-1} de eritritol e 8,03 g.L^{-1} manitol no meio extracelular (Figura 55).

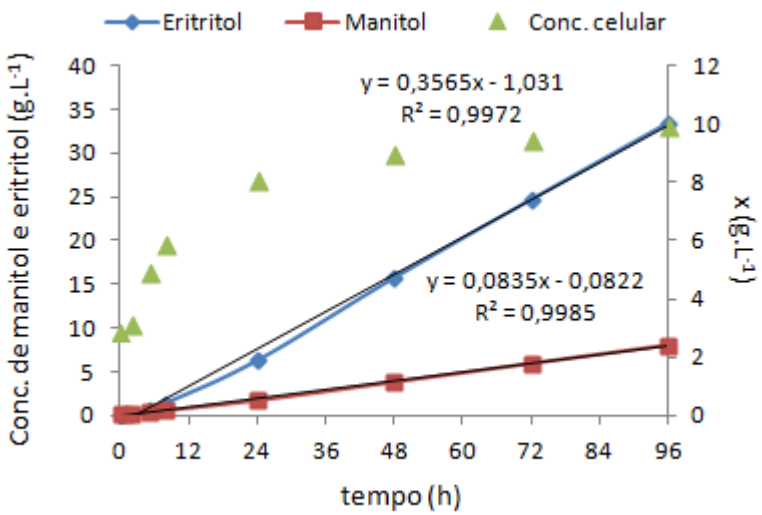

Figura 55 Concentração de manitol, eritritol e biomassa no cultivo de *Y. lipolytica* a 2,0 vvm, 650 rpm e C/N 100:1 por 96 horas.

DO NASCIMENTO (2016) utilizando a mesma cepa de *Y. lipolytica* em cultivo em microplaca, obteve um rendimento de glicerol em manitol e eritritol inferior ao observado neste trabalho mesmo utilizando quantidade similar de glicerol inicial (Tabela 13).

Tabela 12 Comparação de rendimento de glicerol em manitol e eritritol para diferentes concentrações de NaCl.

Referência	$[glicerol]_0$ (g.L^{-1})	$[NaCl]_0$ (g.L^{-1})	$Y_{manitol/glicerol}$ (g g^{-1})	$Y_{eritritol/manitol}$ (g g^{-1})
Este trabalho	196,86	0,5	0,165	0,693
DO NASCIMENTO (2016)	200	32	0,010	0,477

Esse resultado sugere que uma diferente combinação de componentes no meio de cultivo pode favorecer a produção de solutos compatíveis sem a necessidade de indução de estresse osmótico por altas concentrações de NaCl. O Quadro 4 mostra os componentes de meio de cultivo dos dois trabalhos.

Quadro 4 Diferentes meios de cultivo para produção de eritritol e manitol.

Este trabalho	DO NASCIMENTO (2016)
$(NH_4)_2SO_4$	NH_4Cl
KH_2PO_4	$CuSO_4.5H_2O$
K_2HPO_4	$MnSO_4.H_2O$
$MgSO_4.7H_2O$	$MgSO_4.7H_2O$
NaCl	NaCl
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	Extrato de lêvedo
Glicerol	Glicerol
Cloridrato de tiamina	-

TOMASZEWSKA et al. (2014), estudaram a influência da adição de tiamina e biotina na produção de eritritol por *Y. lipolytica*, obtendo uma produção de 73 $g.L^{-1}$ desse poliól com a adição 0,2 $mg.L^{-1}$ de tiamina suplementada com 0,04 $mg.L^{-1}$ de biotina. Assim como, utilizando apenas 0,2 $mg.L^{-1}$ de tiamina a produção foi de 16,5 $g.L^{-1}$ de eritritol, aproximadamente metade da concentração obtida neste trabalho, onde a concentração de tiamina utilizada foi de 0,3 $mg.L^{-1}$.

Além disso, neste trabalho o meio utilizado não foi tamponado, diferentemente do meio utilizado por DO NASCIMENTO (2016) (pH 3,0). A produção de citrato extracelular foi suficiente para redução do pH, que permaneceu na faixa de 3,0 e 4,0 após 24 horas de cultivo (Figura 56).

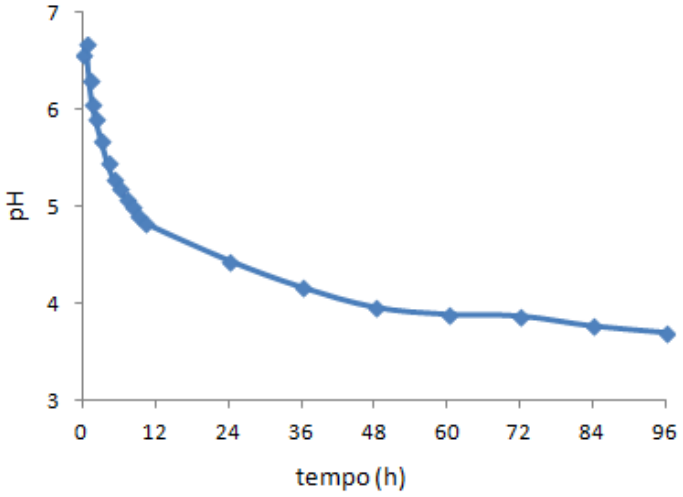

Figura 56 Variação de pH no cultivo de *Y. lipolytica* a 2,0 vvm, C/N 100:1 e 650 rpm.

Em outro trabalho similar, TOMASZEWSKA; RYWINSKA & GLADKOWSKI (2012) estudaram a produção de polióis em diferentes cepas de *Y. lipolytica* em biorreator com meio

sem suplementação com NaCl. Estes experimentos foram conduzidos a 0,6 vvm de vazão de ar, 800 rpm de agitação e com concentração final de glicerol puro de 150 $g.L^{-1}$, condições de cultivo similiares a deste trabalho. As cepas mutantes A UV'1, mutação decorrente de exposição a luz ultravioleta, e Wratislavia K1, mutante acetato negativa, produziram 59,3 e 42 $g.L^{-1}$ de eritritol e 27, 6 e 12,8 $g.L^{-1}$ de manitol, respectivamente. Já a cepa selvagem A 15, produziu 28 $g.L^{-1}$ de eritritol e 23 $g.L^{-1}$ de manitol. Comparando este último resultado com o do presente trabalho, também utilizando cepa selvagem, observamos que a produção de manitol foi aproximadamente 3 vezes maior e a produção de eritritol relativamente próxima. No entanto, o experimento realizado por Tomaszewska, Rywinska e Gladkowski foi conduzido até que toda fonte de carbono fosse consumida enquanto que neste estudo ainda havia 148 $g.L^{-1}$ de glicerol remanescente no meio ao fim de 96 horas, ou seja, praticamente a concentração inicial de substrato utilizada pelo trabalho citado.

5.8 Considerações Finais

De forma geral, o presente trabalho estudou a influência da vazão de ar imposta ao sistema na produção de bio-óleo e outros produtos metabólicos, tais como ácido cítrico (em equilíbrio com ácido isocítrico), manitol e eritritol. Para tal, o parâmetro de agitação do sistema foi fixado em 650 rpm, condição que apresentou maiores valores de k_La sem agitação demasiadamente rigorosa. Além disso, com a relação carbono/nitrogênio mantida em 50:1, variou-se a vazão de ar de 0,67 a 2,0 vvm, utilizando-se também uma estratégia de redução da aeração em fase estacionária. Nestas condições, os valores de k_La permaneceram na faixa de 80 a 110 h^{-1}. Graficamente, pode-se observar que os valores obtidos nas diferentes vazões de ar estudadas são relativamente iguais considerando o desvio padrão das medidas (Figura 57).

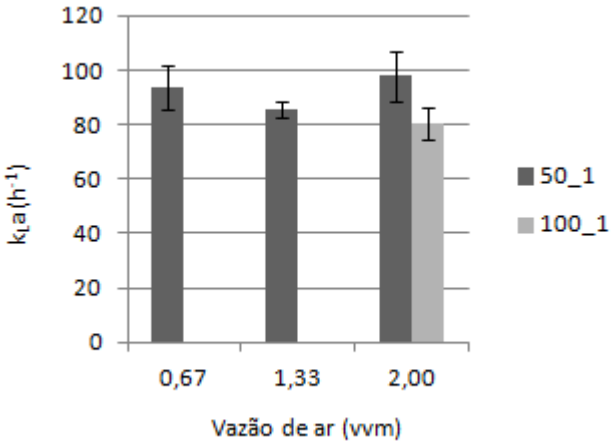

Figura 57 kLa do sistema a 650 rpm em diferentes aerações e relação carbono/nitrogênio inicial.

Outra condição estudada consistiu no aumento da relação carbono/nitrogênio para 100:1 mantendo-se a vazão de ar a 2,0 vvm. Neste caso, o valor de k_La foi bem próximo ao observado em meio 50:1 a 1,33 vvm.

Embora a variação do k_La tenha sido sutil comparando-se as diferentes condições, o aumento da vazão de ar do sistema resultou no favorecimento de diferentes rotas metabólicas e consequentes mudanças no perfil dos produtos gerados. A Tabela 14 mostra de forma resumida os melhores resultados obtidos nas condições de processo estudadas.

Tabela 13 Concentração inicial de glicerol e células e produção de ácido cítrico/isocítrico, manitol, eritritol e bio-óleo em diferentes vazões de ar. Experimentos com C/N 50:1 , 650 rpm e a 28º C.

Experimento	Vazão de ar (vvm)	X_0-X_f ($g.L^{-1}$)	[Ác.cítrico/ isocítrico]$_f$ ($g.L^{-1}$)	[Manitol]$_f$ ($g.L^{-1}$)	[Eritritol]$_f$ ($g.L^{-1}$)	LT/LN em 96h (Fluorescência de NR)	CET (LN) em 96h ($g.L^{-1}$)
1	0,67	4,21-9,79	3,50	15,91	8,78	-	2,38
3	1,33	1,85-5,78	3,04	11,39	7,19	-	0,60
7	2,0 e 0,67 (24-96h)	3,61-10,12	0,75	2,06	3,97	926/366	-
8[a]	2,0	2,88-9,90	1,9	8,03	33,56	359/200	-

[a]C/N 100:1
CET – Concentração equivalente de trioleína
LT – lipídeos totais
LN – lipídeos neutros

Estes resultados sugerem que o aumento da aeração tem efeito negativo na produção bio-óleo, uma vez que os melhores resultados obtidos foram na condição de menor aeração (0,67 vvm), com produção de lipídeos neutros representando 24% em peso seco de biomassa gerada, e utilizando a estratégia de redução na vazão de ar para 0,67 vvm na fase estacionária, resultando em 926 de fluorescência de *Nile Red* para lipídeos totais em 96 horas de cultivo.

Ademais, na condição de 0,67 vvm também foram obtidas concentrações de ácido cítrico/isocítrico, manitol e eritritol, 3,5, 15,91 e 8,78 $g.L^{-1}$, respectivamente. Esta concentração de manitol foi a maior obtida neste trabalho em 96 horas de cultivo. Resultado semelhante foi observado em um dos experimentos a 1,33 vvm, 3,04, 11,39 e 7,19 $g.L^{-1}$, respectivamente. No entanto, não é possível afirmar que o aumento na aeração para 1,33 vvm tenha estimulado esse perfil de produção, uma vez que outros dois experimentos nesta mesma vazão de ar apresentaram valores inferiores a estes e similares entre si (Tabela 6). Um fator que pode explicar este desvio de perfil é a diferença na razão entre concentração inicial de substrato e concentração inicial de células, que neste caso foi praticamente duas vezes maior que nos casos anteriormente citados.

Por fim, a imposição de alta concentração inicial de substrato (aproximadamente 200 $g.L^{-1}$) aumentou a pressão osmótica do meio de cultivo favorecendo a produção de solutos compatíveis em detrimento da produção de bio-óleo, sem necessidade de indução de estresse osmótico por adição de NaCl. A produção de manitol foi de 8,03 $g.L^{-1}$ e a de eritritol foi de 33,56 $g.L^{-1}$, a maior observada neste trabalho.

6 Conclusões

Mediante as observações feitas ao longo deste trabalho, pode-se concluir que:

- A determinação do k_La depende do equipamento utilizado, sendo observadas diferenças no valor deste parâmetro da ordem de 77 h^{-1} em água a 0,67 vvm de aeração e 800 rpm de agitação.

- Para sistemas com agitação superior a 500 rpm, o aumento de vazão de ar pouco influência no valor de k_La obtido.

- Embora a vazão de ar provoque mudanças sutis no valor de k_La, essa variação já é suficiente para favorecimento de determinada via metabólica.

- Na determinação de teor lipídico por citometria de fluxo, a estratégia de manter o cultivo a 2,0 vvm durante a fase exponencial com posterior redução para 0,67 vvm na fase estacionária mostrou-se promissora, provocando um aumento de aproximadamente 3 vezes (925,91) no sinal de fluorescência obtido para lipídeos totais em 96 horas de cultivo quando comparado ao cultivo a 1,33 vvm ou a 2,0 vvm e relação C/N 100:1.

- Na determinação por espectrofluorimetria, a melhor produção de óleo foi observada na menor condição de aeração (0,67 vvm), chegando em torno de 24 % em peso seco de biomassa gerada.

- Com os experimentos realizados não foi possível obter uma boa correlação entre as duas metodologias aplicadas para determinação do teor lipídico.

- Para as mesmas condições de processo, a adição de carga microbiana duas vezes menor no inóculo induz a produção de manitol e eritritol.

- A adição de alta concentração inicial de glicerol (~200 $g.L^{-1}$) com suplementação de 0,3 $mg.L^{-1}$ de tiamina foi suficiente para induzir a produção de eritritol sem indução de estresse osmótico por altas concentrações de NaCl, chegando a produção de 33,56 $g.L^{-1}$ de eritritol em 96 horas de cultivo.

7 Sugestões para trabalhos futuros

- Avaliar a produção de bio-óleo substituindo glicerol PA por glicerol bruto como fonte de carbono.

- Avaliar a influência de menores valores de k_La na produção de bio-óleo.

- Avaliar o efeito da relação carbono/nitrogênio para razões inferiores a 50:1 na produção de bio-óleo.

- Testar adaptações no meio de cultivo utilizado neste trabalho visando a produção de eritritol e manitol.

- Aumentar o tempo de cultivo para verificar o perfil de produção de polióis após 96 horas.

8 Referências Bibliográficas

ABIOVE - Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais. **Biodiesel: oportunidades e desafios no longo prazo**. Disponível em: http://www.abiove.org.br/. Acessado em: 7 de janeiro de 2017.

AMARAL, P.F.F. **Produção de lipase de *Yarrowia lipolytica* em biorreator multifásico**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2007.

AMARAL, P.F.F.; FERREIRA, T.F.; FONTES, G.C.; COELHO, M.A.Z. **Glycerol valorization: New biotechnological routes**. Food and bioproducts processing. v.87. p.179-186. Brasil, 2009.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Enginnering Fundamentals**. Second edition. Ed. McGraw-Hill Book Company. Singapore, 1986.

BEOPOULOS,A.; CESCUT, J.; HADDOUCHE,R.; URIBELARREA,J.; MOLINA-JOUVE, C.; NICAUD, J. ***Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production**. Progress in Lipids Research. Elsevier. v. 48. p. 375-387, 2009a.

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

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

BERTOZZINI, E; GALLUZZI, L; PENNA, A; MAGNANI, M. **Application of standard addition method for the absolute quantification of neutral lipids in microalgae using Nile red**. Journal of Microbiological Methods. Italy, 2011.

BORZANI, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia. Engenharia Química**. Volume 3. Edgard Blücher. São Paulo, 1975.

BRÍGIDA, A.I.S.; AMARAL, P.F.F.; COELHO, M.A.Z.; GONÇALVES, L.R.B. **Lipase from *Yarrowia lipolytica*: Production, characterization and application as an industrial biocatalyst**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. V. 101. P. 148-158. March, 2014.

CHHETRI, A.B.; WATTS, K.C.; ISLAM, M.R. **Waste cooking oil as an alternative feedstock for biodiesel production**. Energies. Canada, 2008.

CHRISTOPHE, G.; KUMAR, V.; NOUAILLE, R.; GAUDET, G.; FONTANILLE, P.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; LARROCHE, C. **Recent developments in microbial oils**

production: a possible alternative to vegetable oils for biodiesel without completion with human food? Brazilian Archieves of Biology and Technology. v. 55. p. 29-46. Brasil, 2012.

CIRIMINNA, R. PINA, C.D., ROSSI, M., PAGLIARO, M. **Understanding the glycerol market**. Eur. J. Lipid Technol. v.116. p.1432-1439, 2014.

DA SILVA, L.V. **PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR *Yarrowia lipolytica* UTILIZANDO GLICEROL COMO FONTE DE CARBONO**. Dissertação de mestrado. Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Brasil, 2010.

DA SILVA, L.V.; COELHO, M.A.Z.; AMARAL, P.F.F., FICKERS, P. **PRODUÇÃO DE ERITRITOL POR *Yarrowia lipolytica* USANDO MILHOCINA COMO FONTE DE NITROGÊNIO E NUTRIENTES**. XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Fortaleza. Setembro, 2016.

DAS NEVES, L.C.M. **Obtenção da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase utilizando *Saccharomyces cerevisiae* W303-181**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2003.

DEÁK, T. **HANDBOOK OF FOOD SPOILAGE YEASTS.** Second Edition. CRC Press Book. p. 91. United States of America, 2008.

DO NASCIMENTO, F.V. **PRODUÇÃO DE ERITRITOL POR *Yarrowia lipolytica* 50682 em SISTEMAS MINIATURIZADOS**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2016.

DUTRA, K.R. **Transição Dimórfica em *Yarrowia lipolytica*: Ação da auxina e óxido nítrico**. Dissertação de mestrado. Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 2010.

EPE – Empresa de Pesquisa Energética. **Análise de conjuntura de biocombustíveis**. **Ano 2015**. Disponível em: http://www.epe.gov.br/. Acessado em: 17 de dezembro de 2016.

FABISZEWSKA, A.U.; KOTYRBA, D.; NOWAK, D. **Assortment of carbon sources in medium for *Yarrowia lipolytica* lipase production: A statistical approach**. Ann Microbiol. v. 65. p. 1495-1503, 2015.

FLORES, C.-L.; RODRÍGUEZ, C.; PETIT, T.; GANCEDO, C. **Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts**. FEMS Microbiology Reviews. v. 24. p. 507-529. Spain, 2000.

FONTES, G.C.; AMARAL, P.F.F.; NELE, M.; COELHO, M.A.Z.. **Factorial design to optimize biosurfactant production by *Yarrowia lipolytica***. Journal of Biomedicine and Biotechnology. Brazil, 2010.

FONTES, G.C.; RAMOS, N.M.; AMARAL, P.F.F.; NELE, M.; COELHO, M.A.Z. **RENEWABLE RESOURCES FOR BIOSURFACTANT PRODUCTION BY *Yarrowia lipolytica***. Brazilian Journal of Chemical Engineering. V. 29. P. 483-493. July-September, 2012.

FUKUDA, R. **Metabolism of Hydrophobic Carbon Sources and Regulation of It in n-Alkane-Assimilating Yeast *Yarrowia lipolytica***. Biosci. Biotechnol. Biochem. v. 77. p. 1149-1154. Japan, 2013.

GAO, C.; YANG, X.; WANG, H.; RIVERO, C.P.; LI, C.; CUI, Z.; QI, Q.; LIN, C.S.K. **Robust succinic acid production from crude glycerol using engineered *Yarrowia lipolytica***. Biotechnology for Biofuels, 2016.

GOMES, N.C.R.L. **Efeito do oxigénio na biotransfomação de lípidos em aromas pela levedura *Yarrowia lipolytica***. Dissertação de Mestrado. Universidade do Minho. Portugal, 2005.

GONÇALVES, F.A.G.; COLEN, G., TAKAHASHI, J.A. ***Yarrowia lipolytica* and Its Mutiple Applications in the Biotechnological Industry**. Review Article. Hindawl Publishing Corporation. The Scientific World Journal, 2014.

HAEGLER, A.N. e MENDONÇA-HAEGLER, L.C. **Yeast from marine and stuarine waters with different levels of pollution in the State of Rio de Janeiro, Brazil**. Appl. Environ. Microbiol., v. 41, p.173-178, 1981.

HAJNY, G. J.; SMITH, J.H.; GARVER, J.C. **Erythritol Production by a Yeastlike Fungus**. Applied Microbiology. v. 12. p. 240-246. May, 1964.

HARZEVILI, F.D. ***Yarrowia lipolytica*: An Overview**. Biotechnological Applications of the Yeast Yarrowia lipolytica. Part of the series Springer Briefs in Microbiology, pp.1-16, Iran, 2014.

HEJNA, A.H.; KOSMELA, P.; FORMELA, K.; PISZCYYK, L.; HAPONIUK, J.T. **Potencial applications of crude glycerol in polymer technology-current state and perspectives**. Renewable and sustainable energy reviews. v.66. p. 449-475. Poland, 2016.

KAMEDA, E.; MARTINS, F.F.; AMARAL, P.F.F.; VALONI, E.A.; COELHO, M.A.Z. **Flow citometry as a tool to verify media influence in bio-oil accumulation by *Yarrowia lipolytica***. Chemical Engineering Transactions. v. 38. Brazil, 2014.

KAVSCEK, M.; BHUTADA, G.; MADL, T.; NATTER, K. **Optimization of lipid production with a genome-scale model of *Yarrowia lipolytica***. BMC Systems Biology. Austria, 2015.

KIM, S.-Y.K.; LEE, K.-H., KIM, J.-H., OH, D.-K. **Erythritol production by controlling osmotic pressure in *Trigonopsis variabilis***. Biotechnology Letters. v. 19. p. 727-729. Korea. August, 1997.

KOVALCHUK, A. **Molecular Analysis of the LTR Retrotransposon Ylt1 from the Genome of Dimorphic Fungus *Yarrowia lipolytica***. Dissertation. Institute für Mikrobiologie. Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden. Germany, 2005.

KRZYCZKOWSKA, J. **The use of castor oil in production of γ-decalactone by *Yarrowia lipolytica* KKP 379**. CHEMINÉ TECHNOLOGIJA. Poland, 2012.

KUMAR, M.; SHARMA, M.P. **Selection of potencial oils for biodiesel production**. Renewable and sustainable energy reviews. v. 56. p. 1129-1138. Abril, 2016.

LEE, J.-K.; KOO, B.-S., KIM, S.-Y. **Fumarate-Mediated inhibition of Erythrose Reductase, a Key Enzyme for Erythritol Production by *Torula corallina***. Applied and Environmental Microbiology. v. 68. p. 4534-4538. September, 2002.

LOPES, R.S. **Seleção de cepas de *Yarrowia lipolytica* para a produção de bio-óleo**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2014.

LORENZINI, G.C. **Estudo da transferência de oxigênio em cultivo de *Bacillus megaterium***. Projeto Final de Curso de Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2012.

MAKRI, A.; FAKAS, S.; AGGELIS, G. **Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeated batch cultures**. Bioresource Technology. Greece, 2010.

MARTINS, F.F. **Fisiologia e quantificação de lipídios por citometria de fluxo em *Yarrowia lipolytica***. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2013.

MAX, B.; SALGADO,J.M.; RODRÍGUEZ, N.; CORTÉS, S.; CONVERTI, A.; DOMÍNGUEZ, J.M. **Biotechnological Production Of Citric Acid**. Brazilian Journal of Microbiology. v. 41. p. 862-875. May, 2010.

MIRÓNCZUK, A.M.; RAKICKA M.; BIEGALSKA, A.; RYMOWICZ, W., DOBROWOLSKI, A. **A two-stage fermentation process of erythritol production by yeast *Y. lipolytica* from molasses and glycerol**. Bioresource Technology. v. 198. p. 445-455. Poland, 2015.

MOELLER, L.; STREHLITZ, B.; AURICH, A.; ZEHNSDORF, A.; BLEY, T. **Optimization of Citric Acid Production from Glucose by *Yarrowia lipolytica***. Eng. Life Sci. v. 7. p. 504-511, 2007.

MORÍN, M.; MONTEOLIVA, L.; INSENSER, M.; GIL, C.; DOMÍNGUEZ, **A. Proteomic analysis reveals metabolic chances during yeast to hypha transition in *Yarrowia lipolytica***. Journal of Mass Espectrometry. V. 42. P. 1453-1462. Spain, 2007.

NICAUD, J. ***Yarrowia lipolytica***. Wiley Online Library, v.29, pp.409–418. França, 2012.

NIELSEN, J.; VILLADSEN, J.; LIDÉN, G. **Bioreaction Engineering Principles**. Second Edition. Kluwer Academic/Plenum Publishers. USA, 2002.

OLIVEIRA, F.D.; KAMEDA, E.; COELHO, M.A.Z. **Método para quantificação de lipídeos neutros em Yarrowia lipolytica utilizando *Nile Red***. XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Fortaleza, 2016.

PAGLIARO, M.; ROSSI, M. **The Future of Glycerol: New Uses of a Versatile Raw Material**. RSC Green Chemistry Book Series, 2008.

PAPANIKOLAOU, S.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; FAKAS, S.; KOMAITIS, M.; AGGELIS, G**. Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* cultivated on olive-mill wastewater-based media**. Bioresource Technology. v. 99. p. 2419-2428. May, 2008.

PAPANIKOLAOU, S.; MUNIGLIA, L.; CHEVALOT, I.; AGGELIS, G.; MARC, I. ***Yarrowia lipolytica* as a potencial producer of citric acid from raw glycerol**. Journal of applied Microbiology. v. 92. p. 737-744, 2002.

POLI, J. S.; DA SILVA, M.A.N.; SIQUEIRA, E.P.; PASA, V.M.D.; ROSA, C.A.; VALENTE, P. **Microbial lipid produced by *Yarrowia lipolytica* QU21 using industrial waste: A potential feedstock for diesel production**. Bioresource Technology. v. 161. p. 320-326. Brazil, 2014.

RAKICKA, M.; LAZAR, Z.; DULERMO, T.; FICKERS, P.; NICAUD, J.-M. **Lipid production by oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* using industrial by-products under different culture conditions**. Biotechnology for Biofuels. July, 2015.

RAKICKA, M.; RYWINSKA, A.; CYBULSKI, K.; RYMOWICZ, W. **Enhanced production of erythritol and mannitol by *Yarrowia lipolytica* in media containing surfactants**. Brazilian Journal of Microbiology. v. 47. p. 417-423, 2016.

RODRIGUES, N., LOSEKANN, L.D. **Análise da demanda por óleo diesel no Brasil (Demand analysis for diesel oil in Brasil)**. 5th Latin American Energy Economics Meeting, 2015.

RYWINSKA, A.; JUSZCZYK, P.; WOJTATOWICZ, M.; ROBAK, M.; LAZAR, Z.; TOMASZEWSKA, L.; RYMOWICZ, W. **Glycerol as a promising substrate for *Yarrowia***

***lipolytica* biotechnological applications**. SciVerse ScienceDirect. Biomass and Bioenergy. v. 48. p.148-166, 2013.

SÁ, T.N.M. **Produção De Ácido Cítrico Utilizando Glicerol Residual Da Produção De Biodiesel Como Substrato**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2011.

SAHA, B.C.; RACINE, F.M. **Biotechnologial production of mannitol and its applications.** Appl. Microbiol. Biotechnol. v. 89. p. 879-891, 2011.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**. Volume II. Engenharia Bioquímica. 1ª edição. Ed. Edgard Blücher. São Paulo, Brasil, 2001.

SCHULTZ, E.L.; DE SOUZA, D.T.; DAMASO, M.C.T. **The glycerol biorefinery: a purpose for Brazilian production**. Chemical and Biological Technologies in agriculture, 2014.

SHOW, P.L.; OLADELE, K. O.; SIEW, Q.Y., ZAKRY. F.A.A.; LAN, J.C.-W.L., LING, T.C. **Overview of citric acid production from *Aspergillus niger***. Frontiers in Life Science. v. 8. p. 271-283, 2015.

SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S., RODRIGUES, C.; PANDEY, A. **New Perspectives for Citric Acid Production and Application**. Citric Acid Production, Food Technol. Biotechnol. v. 44. p. 141-149, 2006.

TACCARI, M.; CANONICO, L.; COMITINI, F.; MANNAZZU, I.; CIANI, M. **Screening of yeasts for growth on crude glycerol and optimization of biomass production**. Bioresource Technology. V. 110. P. 488-485. Italy, 2012.

TALBOT, P.; GORTARES, M.P.; LENCKI, R.W.; NOÜE, J. **Absorption of CO_2 in algal mass culture systems: A different characterization approach**. Biotechnology and Bioengineering. v. 37. p. 834-842, 1991.

TAN, H.W. AZIZ, A.R.A.; AROUA, M.K. **Glycerol production and its applications as a raw material: A review**. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2013.

THEVENIEAU, F.; LE DALL, M.-T.; NTHANGENI, B.; MAUERSBERGER, S.; MARCHAL, R.; NICAUD, J.-M. **Characterization of *Yarrowia lipolytica* mutants affect in hydrophobic substrate utilization**. Fungal Genetics and Biology. v. 44. p. 531-542. Junho, 2007.

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.

TOMASZEWSKA, L.; RYWINSKA, A.; RYMOWICZ, W. **High selectivity of erythritol production from glycerol by *Yarrowia lipolytica***. Biomass & Bioenergy. v. 64. p. 309-320. Poland, 2014.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10ª edição. Ed. Artmed Editora AS. Porto Alegre, RS, 2012.

UL-HAQ, I.; ALI, S.; QADEER, M.A; IQBAL, J. **Citric acid fermentation by mutant strain os *Aspergillus niger* GCMC-7 using molasses based medium**. EJB Electronic Journal of Biotechnology. v. 5. Chile, 2002.

VANDENBERGHE, L.P.S.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A.; LEBEAULT, J.-M. **Microbial Production of Citric Acid**. Review, 1999. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/babt/v42n3/v42n3a01.pdf. Acessado em: 22/10/2016.

VEIGA-DA-CUNHA, M.; SANTOS, H.; SCHAFTINGEN, E.V. **Pathway and Regulation of Erythritol Formation in *Leuconostoc oenos***. American Society for Microbiology. v. p. 3941-3948. July, 1993.

WACHÉ, Y.; AGUEDO, M.; LeDall, M.-T., NICAUD, J.-M.; BELIN, J.-M. **Optimization of *Yarrowia lipolytica*'s β-oxidation pathway for γ-decalactone production**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. December, 2002.

WOLF, K. **Nonconventional Yeasts in Biotechnology. A Handbook**. Springer. Alemanha, 1996.

YARROW, D. **Four New Combinations in Yeasts**. Antoine van Leeuwenhoek, v.38, pp.357-360. Holanda 1972.

YU, Z.; DU, G., ZHOU, J.; CHEN, J. **Enhanced α-ketoglutaric acid production in *Yarrowia lipolytica* WSH-Z06 by an improved integrated fed-batch strategy**. Bioresource Technology. v. 114. p. 567-602. China, 2012.