UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Programa de Pós-Graduação de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos
Escola de Química

Tese de Doutorado

PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR *Yarrowia lipolytica* A PARTIR DE GLICEROL E ANÁLISE PROTEÔMICA

Luana Vieira da Silva

RIO DE JANEIRO
NOVEMBRO/2014

PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR *Yarrowia lipolytica* A PARTIR DE GLICEROL E ANÁLISE PROTEÔMICA

Luana Vieira da Silva

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO CURSO 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 DOUTOR EM CIÊNCIAS.

Orientadores:

Priscilla Filomena Fonseca Amaral, D.Sc.

Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc.
Marcia Regina Soares da Silva, DSc.

RIO DE JANEIRO
NOVEMBRO/2014

PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR *Yarrowia lipolytica* A PARTIR DE GLICEROL E ANÁLISE PROTEÔMICA

Luana Vieira da Silva

Tese de doutorado submetida ao corpo docente do curso 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 Doutor em Ciências.

Aprovada por:

Orientador (es):

_____

Prof[a]. Priscilla Filomena Fonseca Amaral, D.Sc.

_____

Prof[a]. Maria Alice Zarur Coelho, D. Sc.

_____

Prof[a]. Marcia Regina Soares da Silva, DSc.

Banca Examinadora

_____

Karen Signori Pereira, DSc.

_____

Gizele Cardoso Fontes Santanna, DSc.

_____

Leda Maria Fortes Gottschalk, DSc.

_____

Rodrigo Pires do Nascimento, DSc.

_____

Marta Antunes Pereira Langone, DSc.

RIO DE JANEIRO
NOVEMBRO/2014

DA SILVA, LUANA VIEIRA

Produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* a partir de glicerol e análise proteômica / Luana Vieira da Silva. – Rio de Janeiro, 2014.

xviii, 126 p, 29,7 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2014.

Orientador(es): Priscilla Filomena Fonseca Amaral
Maria Alice Zarur Coelho
Marcia Regina Soares da Silva

1. Glicerol. 2. Ácido Cítrico. 3. *Yarrowia lipolytica*. 4. Proteoma Mitocondrial

I. Amaral, Priscilla Filomena Fonseca; Coelho, Maria Alice Zarur e Da Silva, Marcia Regina Soares

II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Escola de Química.

DEDICATÓRIA

“Bem-aventurado o homem que encontra sabedoria, e o homem que adquire conhecimento, pois ela é mais proveitosa do que a prata, e dá mais lucro do que o ouro. Mais preciosa é do que os rubis; tudo o que podes desejar não se compara a ela”.

Provérbios 3. 13-15

“A sabedoria é suprema; portanto, adquire a sabedoria. Sim, com tudo o que possuis adquire o entendimento. Estima-a e ela te exaltará; abraça-a, e ela te honrará”.

Provérbios 4. 7-8

DEDICO a minha família, aos meus pais Cida e Zeli e agradeço pelo carinho e incentivo.

AGRADECIMENTO

Não poderia terminar esta minha longa jornada sem agradecer a presença concreta do meu alicerce, DEUS.

Aos meus pais, que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões e peço mil desculpas pelas preocupações que causei.

Agradeço também aos meus irmãos, meus tios e minha cunhada por todo incetivo dispensado em minha vida.

Obrigada meus sobrinhos Denis, Ana Beatriz e Rafaela pelos pequenos gestos que me fazem sentir imensamente feliz e alegre quando estou com vocês.

Agradeço as minhas orientadoras Priscilla, Maria Alice e Márcia pela orientação, pela paciência e pelos ensinamentos.

Ao professor do IQ/UFRJ Cláudio Ortiz pela colaboração no isolamento da mitocôndria da levedura utilizada neste estudo.

À professora Maria Helena por ter me ajudado na reta final dos experimentos.

Ao pesquisador Marcelo Tanaka do INCA.

Paty, obrigada por me ceder seus ouvidos e pelos seus conselhos. Ô menina sábia!!!

Ao grupo BIOSE, Paty, Roberta, Tatiana, Kelly, Tamires, Gizele, Bernardo, Mariana, Etel, Roseli, Fernanda, Ariane, Verônica, Caê e todos os alunos de iniciação científica, pela ajuda e amizade.

Não posso deixar de agradecer a minha aluna de IC, Gabrielle, que esteve comigo no meu último ano de doutorado e as companhias noturnas de Caê e Gabi do Bernardo.

Ao laboratório de Microbiologia Molecular e Proteínas (LaMMP) do Instituto de Química por abrir as suas portas para que eu pudesse preparar as amostras para a espectrometria de massas, em especial as alunas Rosane, Gizele e Isabele.

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para esse trabalho.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

E finalmente não menos importante, muito pelo contrário, agradeço ao Tiago, aluno da professora Márcia, que sempre se mostrou gentil em me ensinar todo o procedimento para o Massas. Tiago, sua ajuda foi fundamental!!!! Ele me mostrou que ainda existem pessoas dispostas a ajudar mesmo sem receber algo em troca.

RESUMO

DA SILVA, Luana Vieira. **Produção de ácido cítrico por Y*arrowia lipolytica* a partir de glicerol e análise proteômica.** Orientadoras: Priscilla Filomena Fonseca Amaral, Maria Alice Zarur Coelho e Marcia Regina Soares da Silva. Rio de Janeiro. 2014. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos).

Este trabalho teve como objetivo melhorar o rendimento e aperfeiçoar a produtividade do processo de produção de ácido cítrico, que é um produto amplamente usado em produtos alimentícios, farmacêuticos, cosméticos e em outros produtos industriais, via fermentação microbiológica por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 e estudar o proteoma mitocondrial desta cepa. Foram realizados experimentos utilizando glicerol PA e duas fontes de glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel como fonte de carbono. No estudo sobre a influência da fonte de glicerol bruto, foi observado que a quantidade de ácido cítrico e biomassa produzidas por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 é influenciada pelo processo que gera a matéria-prima usada. A influência na produção de ácido cítrico por limitação do crescimento celular foi investigada variando a concentração de extrato de lêvedo inicial como fonte de nitrogênio e, em concentração inicial de extrato de levedura de 0,1705 g/L, a produção do composto de interesse foi de 4,35 g/L, sendo ligeiramente maior em relação aos outras concentrações de extrato de lêvedo testadas. A influência da presença de sulfato de amônio no meio de cultivo foi avaliada e constatou-se que houve maior consumo de glicerol (72% em 94 h), redução da concentração e produtividade de ácido cítrico e estímulo da produção do ácido isocítrico em 1,74 vezes nesta condição, comparando com o ensaio realizado na ausência de sulfato de amônio. A redução da concentração dos íons ferro e manganês não favoreceu a produção de ácido cítrico. A concentração de ácido isocítrico foi reduzida para 3 g/L em 98 h de fermentação quando a concentração do sal $FeCl_3$ foi reduzida para 0,006 g/L. Em biorreator, a maior produção de ácido cítrico ocorreu com agitação do sistema em 550 rpm. O composto sesamol na concentração 1,5 mM reduziu a produção de ácido cítrico, a concentração celular e a quantidade de lipídeo total da célula. Para verificar o proteoma mitocondrial de células de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, foram propostos os meios de cultivo YPG como experimento controle e o meio composto por 30 g/L de glicerol PA, 01705 g/L de extrato de lêvedo e meio mineral tamponado, no qual a levedura do presente estudo tem habilidade de produzir ácido cítrico. O protocolo de isolamento de mitocôndria proposto por Meisinger *et al.* (2005) foi adaptado para essa levedura devido às características específicas dessa espécie. Após a eletroforese unidimensional das proteínas presentes no extrato mitocondrial puro de células cultivadas em meio YPG e meio que favorece a produção de ácido cítrico, verificou-se uma diferença na abundância de proteínas na região próxima à 45 kDa, 30 kDa e 14 kDa. Os peptídeos provenientes das bandas dos géis 1D foram analisados no espectrômetro de massas do tipo ESI-Q/TOF, permitindo a

identificação de 45 e 47 proteínas para a fração mitocondrial obtida de células cultivadas em YPG e no meio que favorece a produção de ácido cítrico, respectivamente, sendo 13 proteínas comuns às duas condições de cultivo.

Palavras-Chave: 1. Glicerol. 2. Ácido Cítrico. 3. *Yarrowia lipolytica*. 4. Proteoma Mitocondrial

ABSTRACT

DA SILVA, Luana Vieira. **Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* from glycerol and proteomic analysis.** Advisors: Priscilla Filomena Fonseca Amaral, Maria Alice Zarur Coelho e Marcia Regina Soares da Silva. Rio de Janeiro. 2014. D.Sc. Thesis (Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos).

This study aimed to enhance the yield and the productivity of citric acid production process, which is a product widely used in food, pharmaceutical, cosmetics and other industrial products via microbial fermentation by *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 and to study the mitochondrial proteome of this strain. Glycerol PA and two sources of crude glycerol from biodiesel production as a carbon source were performed. In the study on the influence of the source of crude glycerol, it was observed that the amount of citric acid and biomass produced by *Yarrowia lipolytica* 50682 IMUFRJ is influenced by the process that generates the raw material used. The influence on citric acid production by limiting cell growth was investigated by varying the initial concentration of yeast extract as nitrogen source and in an initial concentration of yeast extract 0.1705 g/L, the production of the compound of interest was 4,35 g/L, slightly higher compared to other yeast extract concentrations tested. The influence of the presence of ammonium in the culture medium was evaluated and it was found that there was greater consumption of glycerol in this condition (72% in 94 h), reduction in the concentration and productivity of citric acid and stimulating the production of isocitric acid to 1.74 times this condition, compared with the assay performed in the absence of ammonium sulfate. The reduction in the concentration of iron and manganese ions did not favor the production of citric acid. Isocitric acid concentration was reduced to 3 g/L at 98 h of fermentation when the salt concentration was reduced to FeCl3 0.006 g/L. In bioreactor, the highest production of citric acid was at 550 rpm. The sesamol in the concentration 1.5 mM reduced citric acid production, the cell concentration and the amount of lipid content of the cell. To check the mitochondrial proteome of *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, have proposed the YPG medium as a control experiment and medium composed of 30 g/L glycerol PA 01705 g/L yeast extract and mineral buffered medium in which the yeast this study has ability to produce citric acid. The protocol for isolation of mitochondria proposed by Meisinger *et al.* (2005) was adapted for this yeast due to the specific characteristics of this species. After the one-dimensional electrophoresis of proteins in pure mitochondrial extract of cells cultured in YPG medium and medium which advance the production of citric acid, there was a difference in protein abundance in the region close to the 45 kDa, 30 kDa and 14 kDa. The peptides of the bands from the gels 1D were analyzed in a mass spectrometer Q-type ESI/TOF, allowing the identification of 45 and 47 proteins to the mitochondrial fraction

obtained from cells cultured in YPG medium and medium which advance the production of citric acid, respectively, and 13 proteins common to both culture conditions.

Keyword: Glycerol. 2. Citric acid. 3. *Yarrowia lipolytica*. 4. Mitochondrial Proteome

Índice Geral

RESUMO vii
ABSTRACT ix
ÍNDICE DE TABELA xiv
ÍNDICE DE FIGURA xv
CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO 1

CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 3
2.1 ÁCIDO CÍTRICO 3
2.1.1 Evolução Histórica 3
2.1.2 Características e Aplicações 3
2.1.3 Mercado Mundial de Ácido Cítrico 5
2.2 PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO **7**
2.2.1 Micro-organismos Produtores de Ácido Cítrico 7
2.2.2 Matéria-prima e substrato 9
2.2.3 Fatores que influenciam a produção de ácido cítrico 10
2.2.4 Formas de condução do processo 11
2.2.5 Recuperação do Produto 13
2.3 Y*arrowia lipolytica* 13
2.3.1 Produção de Ácidos Orgânicos por *Yarrowia lipolytica* 14
2.3.1.1 Produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* 15
2.3.1.2 Produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* utilizando glicerol como Substrato 23
2.3.1.3 Mecanismo de Obtenção de Ácido Cítrico por *Yarrowia lipolytica* *25*
2.4 ANÁLISE DO PROTEOMA MITOCONDRIAL 28
2.4.1 Estudo Proteômico 31
2.4.2 Aplicação do estudo proteômico 32
2.4.3 Técnicas Aplicadas ao estudo do proteoma 35
2.4.3.1 Eletroforese Bidimensional 35
2.4.3.2 Espectrometria de Massas 36

CAPÍTULO 3 - PROPOSTA DE TRABALHO 38

CAPÍTULO 4 - MATERIAIS E MÉTODOS 39
4.1 MATERIAIS 39
4.2 EQUIPAMENTOS 39
4.3 MICRO-ORGANISMO 39

4.3.1 Preservação da cultura 40
4.3.2 Obtenção do inóculo 40
4.4 PRODUÇÃO MICROBIOLÓGICA DE ÁCIDO CÍTRICO UTILIZANDO GLICEROL PROVENIENTE DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL 40
4.4.1 Experimentos Preliminares 40
4.4.2 Experimentos em Biorreator 42
4.5 INFLUÊNCIA DE SESAMOL NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO 44
4.6 AMOSTRAGEM 44
4.7 ESTERILIZAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA E INSTRUMENTOS 44
4.8 MÉTODOS ANALÍTICOS 44
4.8.1 Quantificação da concentração celular 44
4.8.2 Quantificação de ácidos orgânicos 45
4.8.3 Quantificação do substrato glicerol 46
4.8.4 Determinação de lipídeo intracelular por citometria de fluxo 47
4.8.5 Correlação entre fluorescência emitida de células coradas com (*Nile Red*) NR e o teor de lipídeos 47
4.8.6 Determinação de pH 48
4.8.7 Isolamento de Mitocôndria da levedura *Yarrowia lipolytica* 48
4.8.8 Quantificação de Proteína 50
4.8.9 Estudo do Proteoma Mitocondrial de *Yarrowia lipolytica* 51
4.8.9.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-page) 51
4.8.9.2 Aquisição de Imagens 51
4.8.9.3 Espectrometria de Massa 52
4.9 DETERMINAÇÃO DOS RENDIMENTOS, PRODUTIVIDADE E RAZÃO ÁCIDO CÍTRICO:ISOCÍTRICO 54

CAPÍTULO 5 - RESULTADOS E DISCUSSÕES 55
5.1 EXPERIMENTOS PRELIMINARES 55
5.1.1 Influência da Fonte de Glicerol 55
5.1.2 Influência da Concentração de Extrato de Lêvedo 58
5.1.3 Influência da Presença de Sulfato de Amônio 59
5.1.4 Influência da Concentração de Ferro e Manganês 61
5.2 EXPERIMENTOS EM BIORREATOR 66
5.2.1 Influência da agitação na produção de ácido cítrico 66

5.3 ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO E ACÚMULO DE LIPÍDEOS DE CÉLULAS DE *Yarrowia lipolytica* CRESCIDAS NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE SESAMOL 71

5.4 PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Y. lipolytica* 76

CAPÍTULO 6 – CONCLUSÃO 96

CAPÍTULO 7 –SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 98

CAPÍTULO 8 –PUBLICAÇÕES 99

CAPÍTULO 9 –REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 101

ANEXO I 120

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 - Micro-organismos produtores de ácido cítrico..... 7
Tabela 4.1 - Composição dos reagentes utilizados no isolamento de mitocôndria da levedura *Yarrowia lipolytica*.....49
Tabela 5.1 - Parâmetros de produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica* na presença de 30 g/L de glicerol bruto, 0,1705 g/L de extrato de lêvedo e na ausência de sulfato de amônio..... 57
Tabela 5.2 - Crescimento celular, consumo de substrato e pH do processo de produção de ácido cítrico a partir de 30 g de glicerol (obtido de glicerol bruto) por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 em diferentes concentrações iniciais de extrato de levedura..... 59
Tabela 5.3 - Parâmetros de produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 na presença de 30 g/L de glicerol, em diferentes concentrações iniciais de extrato de levedura e em 94 h de fermentação..... 59
Tabela 5.4 - Parâmetros de produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 na presença de 30 g/L de glicerol, massa ajustada com a pureza (83%), na concentração de 0,1705 g/L de extrato de levedura e na ausência e presença de sulfato de amônio 60
Tabela 5.5 - Parâmetros de produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica* na presença de 45 g/L de glicerol bruto, 0,1 g/L de extrato de lêvedo e em diferentes concentrações dos íons ferro e manganês..... 62
Tabela 5.6 - Resultados dos ensaios utilizando as velocidades de agitação 350, 450, 550 e 650 rpm como variável.....70
Tabela 5.7 – Parâmetros Cinéticos no ponto de máxima concentração de ácido cítrico (170 h) obtidos pelos experimentos na ausência e presença de 1,5 mM sesamol em meio otimizado por Da Silva 2010. 74
Tabela 5.8 - Teor lipídico obtido em células de *Yarrowia lipolytica* quando submetidas à reação de transesterificação e determinados por Cromatografia Gasosa..... 75
Tabela 5.9 – Tempo de Retenção em minutos dos padrões de Ácidos Orgânicos injetados em HPLC..... 78
Tabela 5.10 – Proteínas detectadas somente em fração mitocondrial de células de *Y. lipolytica* cultivada em YPG e em meio para produção de ácido cítrico (Da Silva, 2010). 93

ÍNDICE DE FIGURA

Figura 2.1 - Representação da estrutura química do ácido cítrico.....3
Figura 2.2 - Vias metabólicas envolvidas no catabolismo de glicerol e biossíntese de lipídeos intracelulares e ácido cítrico extracelulares por *Yarrowia lipolytica*. Abreviaturas: TAG: triglicerídeos; GK: glicerol quinase; NAD^+-G-3-P-DH: NAD+-3-P glicerol desidrogenase; ACL: ATP-citrato liase; MD_c: malato desidrogenase (citoplasma); MD_m: malato desidrogenase (mitocondrial); PD: piruvato desidrogenase; PC: piruvato carboxilase; CS: citrato sintase; ICDH: isocitrato desidrogenase; ACO: aconitase.....27
Figura 2.3 – Vias metabólicas que ocorrem na organela mitocôndria em células eucarióticas.....29
Figura 2.4- Ciclo de Krebs.....30
Figura 2.5-Ciclo do Glioxilato.....31
Figura 4.1 - Imagem de microscopia ótica da levedura *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 em aumento de 1000x utilizando microscópio ótico Nikon Eclipse E200.....40
Figura 4.2-Foto do Biorreator de bancada (Multigen, New Brunswick Scientific Co., EUA) com capacidade de 2 L.....43
Figura 4.3 - Tipo de impelidor utilizado: turbina tipo *Rushton* com pás retas verticais 43
Figura 4.4 - Curva de peso seco para quantificação da concentração celular de *Yarrowia lipolytica* através de medidas de absorvância em espectrofotômetro *Shimadzu* modelo *UV-1800*.....45
Figura 4.5- Curva padrão para quantificação dos ácidos cítrico e isocítrico.....46
Figura 4.6 - Curva padrão para quantificação de glicerol.....47
Figura 4.7 - Correlação entre fluorescência emitida por células coradas com Nile Red (lipídeos neutros – FL2 e lipídeos polares – FL3) e o teor de lipídeos totais obtidos por reação de transesterificação seguida de Cromatografia Gasosa (MARTINS, 2013). 48
Figura 5.1 - Cinética da concentração celular e do pH da condição experimental: 30 g/L de glicerol bruto obtido da rota etílica, catalisado por NAOH, sem ajuste de massa com a pureza de 81%, 0,1705 g/L de extrato de levedura (g/L), ausência de sulfato de amônio (DA SILVA, 2010) (A linha de cada curva não representa dados experimentais, representa uma tendencia do perfil).....56
Figura 5.2 - Cinética da concentração celular e do pH da condição experimental: 30 g/L de glicerol bruto obtido da rota metílica, catalisado por KOH, com ajuste de massa com a pureza de 83%, 0,1705 g/L de extrato de levedura (g/L), ausência de sulfato de amônio

(A linha de cada curva não representa dados experimentais, representa uma tendência do perfil).....56
Figura 5.3 - Cinética da concentração celular, do consumo de glicerol, produção de ácidos cítrico e isocítrico e do pH para o cultivo de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 em shaker na presença de 45 g/L de glicerol bruto, sem ajuste da massa com a pureza (83%), 0,1 g/L de extrato de lêvedo e nas condições de $FeCl_3$: 0,090 g/L e $MnSO_4.H_2O$: 0,060 g/L. Os pontos das curvas representam a média dos ensaios realizados em duplicata. (A linha de cada curva não representa dados experimentais, representa uma tendência do perfil).....63
Figura 5.4 - Cinética da concentração celular, do consumo de glicerol, produção de ácidos cítrico e isocítrico e do pH para o cultivo de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 em shaker na presença de 45 g/L de glicerol bruto, sem ajuste da massa com a pureza (83%), 0,1 g/L de extrato de lêvedo e nas condições de $FeCl_3$: 0,030 g/L e $MnSO_4.H_2O$: 0,010 g/L. Os pontos das curvas representam a média dos ensaios realizados em duplicata. (A linha de cada curva não representa dados experimentais, representa uma tendência do perfil).....64
Figura 5.5 - Cinética da concentração celular, do consumo de glicerol, produção de ácidos cítrico e isocítrico e do pH para o cultivo de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 em shaker na presença de 45 g/L de glicerol bruto, sem ajuste da massa com a pureza (83%), 0,1 g/L de extrato de lêvedo na condição de $FeCl_3$: 0,030 g/L e $MnSO_4.H_2O$: 0,005 g/L. Os pontos das curvas representam a média dos ensaios realizados em duplicata (A linha de cada curva não representa dados experimentais, representa uma tendência do perfil).....64
Figura 5.6 - Cinética da concentração celular, do consumo de glicerol bruto e do pH em $FeCl_3$: 0,006 g/L e $MnSO_4.H_2O$: 0,010 g/L (A linha de cada curva não representa dados experimentais, representa uma tendência do perfil).....65
Figura 5.7 - Cinética do processo de produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* em biorreator a 350 rpm (A linha de cada curva não representa dados experimentais, representa uma tendência do perfil).....67
Figura 5.8 - Cinética do processo de produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* em biorreator a 450 rpm (A linha de cada curva não representa dados experimentais, representa uma tendência do perfil).....67
Figura 5.9 - Cinética do processo de produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* em biorreator a 550 rpm (A linha de cada curva não representa dados experimentais, representa uma tendência do perfil).....68
Figura 5.10 - Cinética do processo de produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* em biorreator a 650 rpm (A linha de cada curva não representa dados experimentais, representa uma tendência do perfil).....68

Figura 5.11– Perfil de concentração celular, consumo de glicerol, produção de ácidos cítrico e isocítrico e pH do experimento com *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 em shaker, utlizando o meio otimizado por Da Silva (2010) na ausência de sesamol. Os pontos das curvas representam a média dos ensaios realizados em triplicata. (A linha de cada curva não representa dados experimentais, representa uma tendência do perfil).....72
Figura 5.12– Perfil de concentração celular, consumo de glicerol, produção de ácidos cítrico e isocítrico e pH do experimento com *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 em shaker, utlizando o meio otimizado por Da Silva (2010) na presença de sesamol 1,5 mM. Os pontos das curvas representam a média dos ensaios realizados em duplicata. (A linha de cada curva não representa dados experimentais, representa uma tendência do perfil).....73
Figura 5.13 – Resultados obtidos para medida de fluorescência do *Nile Red* de células de *Yarrowia lipolytica* crescidas durante 170 h em meio ausente e presente de 1,5 mM de sesamol.....75
Figura 5-14 - Perfil do teor de lipídeos polares e neutros de células da levedura *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 cultivada em meio otimizado por Da Silva (2010) na ausência e presença de sesamol a 28ºC, 250 rpm durante 170 horas.....76
Figura 5.15 – Perfil de consumo de glicerol, concentração celular e pH por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 cultivada em meio YPG e em agitador rotatório (shaker) (A linha de cada curva não representa dados experimentais, representa uma tendência do perfil).....78
Figura 5.16 - Cromatograma em HPLC do padrão Ácido Cítrico na concentração 20 g/L.....78
Figura 5.17 - Cromatograma em HPLC do padrão Ácido Isocítrico na concentração 10 g/L.....79
Figura 5.18 - Cromatograma em HPLC do meio YPG no tempo 0 horas de processo..... 79
Figura 5.19 - Cromatograma em HPLC do meio YPG após 48 horas de processo.....80
Figura 5.20 - Microscopia ótica com aumento de 1000X de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 cultivada em YPG após 48 h de cultivo, sem tratamento com a enzima zymolyase 20-T.....81
Figura 5.21 - Microscopia ótica com aumento de 1000X de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 cultivada em YPG após 48 h de cultivo, submetida ao tratamento com a enzima zymolyase 20-T por 45 min.....81
Figura 5.22 – Microscopia ótica com aumento de 1000X de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 cultivada em meio otimizado por Da Silva (2010) após 96 h de cultivo, sem tratamento com a enzima zymolyase 20-T.....81

Figura 5.23 - Microscopia ótica com aumento de 1000X de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 cultivada em meio otimizado por Da Silva (2010) após 96 h de cultivo, submetida ao tratamento com a enzima zymolyase 20-T por 45 min.....82
Figura 5.24 – Resultado da centrifugação do gradiente de densidade com sacarose a 134.000 *g* por 1 h a 2ºC da fração mitocondrial isolada de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682.....83
Figura 5.25 - Perfil 1-DE das proteínas extraídas das frações mitocôndrias puras de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682. (A) 1. Proteínas de mitocôndria de células cultivadas em YPG; (M) Padrão de peso molecular. (B) 1. Proteínas de mitocôndria de células cultivadas em meio otimizado por Da Silva (2010); (M) Padrão de peso molecular. A quantidade de proteínas aplicada em cada coluna foi de 100 µg.....84
Figura 5.26 - Número total de proteínas comuns e de proteínas únicas para cada fração mitocondrial de células de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 cultivadas em YPG e em meio otimizado por Da Silva (2010).....85
Figura 5.27 - Classificação, baseada no KEGG, em categorias de proteínas identificadas pelo modo em frações mitocondriais de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682. (■) Proteínas de fração mitocondrial de células cultivadas em experimento controle (YPG); (■) Proteínas de fração mitocondrial de células cultivadas em experimento de produção de ácido cítrico, Da Silva (2010). Os números acima das colunas representam o número de proteínas identificadas para cada categoria.....86
Figura 5.28 – Resumo da localização subcelular de todas as proteínas identificadas na fração mitocondrial de células de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 cultivada em experimento controle (YPG).....88
Figura 5.29 – Resumo da localização subcelular de todas as proteínas identificadas na fração mitocondrial de células de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 cultivada em experimento otimizado por Da Silva (2010) para produção de ácido cítrico.....88
Figura 5.30 – Participação do componente E2 do complexo enzimático piruvato desidrogenase (EC:2.3.1.12) na via metabólica ciclo de Krebs.....91

1 INTRODUÇÃO

A alta demanda de energia no mundo industrializado e no setor doméstico, bem como os problemas de poluição causados devido ao vasto uso de combustíveis, têm resultado em uma crescente necessidade de desenvolver fontes de energias renováveis sem limites de duração e de menor impacto ambiental que os meios tradicionais existentes, estimulando, assim, a busca de fontes alternativas para produção de combustíveis (GERIS *et al.*, 2007).

Como exemplo, tem-se o biodiesel, que pode ser obtido por diferentes processos tais como o craqueamento, a esterificação ou pela transesterificação de óleos vegetais. Com um gerenciamento seguro da colheita dessa matéria-prima renovável, é possível obter um suprimento contínuo de biodiesel. A produção industrial deste biocombustível, contudo, leva a obtenção de grandes quantidades de glicerol como um subproduto.

Alguns pesquisadores demonstraram que glicerol bruto pode ser usado como fonte única de carbono para a produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* (RYWIŃSKA *et al.*, 2013). Logo, a bioconversão deste subproduto adiciona significativo valor à produtividade do biodiesel pelas indústrias (PAPANIKOLAOU *et al.*, 2002; RYMOWICZ *et al.*, 2006; DA SILVA *et al.*, 2009) e pode ser considerado importante matéria-prima para a produção de ácidos orgânicos.

O ácido cítrico é um ácido orgânico tricarboxílico fraco e encontrado como um constituinte natural de uma variedade de frutas cítricas (GREWAL e KALRA, 1995). Este ácido é utilizado em larga escala nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos devido as suas propriedades como acidulante, conservante, regulador de pH e antioxidante, possuindo assim grande valor comercial (TRAN *et al.*, 1998; WANG, 1998; RYMOWICZ *et al.*, 2008; LAZAR *et al.*, 2011).

Industrialmente, o ácido cítrico é produzido por fermentação submersa por cepas do fungo filamentoso *Aspergillus niger*, tendo sacarose como fonte de carbono (PAPANIKOLAOU *et al.*, 2002; RYMOWICZ *et al.*, 2006; LEVINSON *et al.*, 2007; RYMOWICZ *et al.*, 2008; DA SILVA *et al.*, 2009). O volume de produção deste ácido por fermentação está aumentando continuamente em uma taxa anual de 5% (FINOGENOVA *et al.*, 2005; FRANCIELO *et al.*, 2008). Em 2013, sua produção alcançou 1,7 milhões de toneladas (ZHANG *et al.*, 2014).

Devido às suas inúmeras aplicações e aumento da demanda e consumo do ácido cítrico, processos alternativos de cultivo envolvendo espécies de levedura produtoras de ácido cítrico estão sendo desenvolvidos, como por exemplo, o uso da levedura *Y. lipolytica* (KARASU-YALCIN *et al.*, 2010). Como o ácido cítrico é uma *comoditie* é necessário utilizar matéria-prima barata e disponível na produção industrial, como o glicerol bruto.

A condição necessária para a produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica* é a limitação do seu crescimento celular sob condições de excesso de carbono e deficiência de nitrogênio no meio de cultivo (PAPANIKOLAOU *et al.*, 2002; FICKERS *et al.*, 2005; RYMOWICZ *et*

al., 2006). A escolha da cepa, o tipo de substrato, as condições de crescimento como temperatura, aeração, concentração e fontes de carbono e nitrogênio, fosfato, elementos traços e pH são fatores que influenciam diretamente a produção de ácido cítrico (PAPAGIANNI, 2004; KARASU-YALCIN *et al.*, 2010). A desvantagem do uso de *Y. lipolytica*, especialmente cepas selvagens, para a produção comercial de ácido cítrico é a secreção simultânea de ácido isocítrico, que pode atingir níveis acima de 50% do total de ácido produzido.

O ácido cítrico é um metabólito intermediário do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), que ocorre na matriz mitocondrial e uma grande quantidade de trabalho tem se concentrado nesse ciclo para explicar o seu acúmulo. Pesquisadores têm afirmado que a inativação de uma enzima que degrada o citrato, por exemplo, a aconitase ou a isocitrato desidrogenase, é essencial para ao acúmulo de ácido cítrico. No entanto, a presença de um conjunto completo de enzimas dos ciclos do ácido cítrico e do glioxilato durante a fermentação do ácido cítrico tem sido demonstrada (FINOGENOVA *et al.*, 2002; PAPAGIANNI, 2007).

Dentro deste contexto, o presente trabalho visou o estudo da produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* em diferentes condições de cultivo a partir de glicerol PA e glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel por via biotecnológica. Inicialmente, verificou-se a influência da relação carbono-nitrogênio, presença de sulfato de amônio e das concentrações dos íons manganês e ferro na obtenção de ácido cítrico em *shaker* e a partir da melhor condição iniciou-se o estudo em biorreator a fim de identificar a velocidade de agitação mais promissora. A análise proteômica da mitocôndria da levedura cultivada em duas condições diferentes de cultivo foi proposta a fim de verificar a sua relação com a produção de ácido cítrico no sistema fermentativo, possibilitando posterior manipulação nas vias mais relevantes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ácido Cítrico

2.1.1 Evolução Histórica

A descoberta do ácido cítrico foi atribuída ao alquimista islâmico Jabir Ibn Hayyan no oitavo século depois de Cristo e foi isolado e cristalizado pela primeira vez a partir de suco de limão pelo químico sueco Karl Wilhelm Scheele em 1784. Sua produção comercial começou na Inglaterra em 1860 na forma de citrato de cálcio extraído de limão importado da Itália (GREWAL e KALRA, 1995; PAPAGIANNI, 2007).

Em 1880, Grimoux e Adams sintetizaram o ácido cítrico a partir de glicerol e Wehmer (1893) relatou que certos fungos do gênero *Citromyces* (hoje incluídos no gênero *Penicillium*) eram capazes de elaborar e secretar ácido cítrico a partir de açúcar (LIMA *et al.*, 2001; SOCCOL *et al.*, 2006; PAPAGIANNI, 2007).

Em 1917, o químico americano James Currie descobriu que certos cultivos de *Aspergillus niger* podiam ser produtores eficientes de ácido cítrico em processo de fermentação em superfície. *Aspergillus niger* era conhecido como produtor de ácido oxálico, mas o baixo pH (2,5 – 3,5) usado no trabalho de Currie suprimiu a formação dos ácidos oxálico e glucônico. Em 1923, a indústria Pfizer nos Estados Unidos iniciou a produção em escala industrial usando esta técnica (GREWAL e KALRA, 1995; PAPAGIANNI, 2007). Na década de 1950, foi desenvolvida nos Estados Unidos uma técnica mais eficiente que o processo anterior, a fermentação submersa (GREWAL e KALRA, 1995), que é atualmente o modo de condução mais utilizado no processo de obtenção de ácido cítrico em larga escala.

2.1.2 Características e Aplicações

O ácido cítrico ou citrato de hidrogênio, de nome oficial ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxilíco, é um ácido orgânico tricarboxílico fraco com peso molecular de 210,14 Da (PAPAGIANNI, 2007). Esse ácido é um metabólito intermediário pertencente ao ciclo de Krebs e é encontrado como um constituinte natural de uma variedade de frutas cítricas como limão, laranja, abacaxi, pêra, pêssego e figo (GREWAL e KALRA, 1995). Sua fórmula química é $C_6H_8O_7$ conforme ilustrado na Figura 2.1.

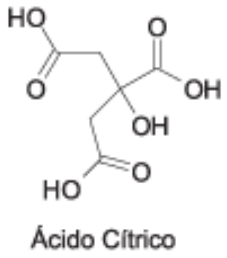

Figura 2.1 - Representação da estrutura química do ácido cítrico (LIMA *et al.*, 2010).

Devido a presença de três grupamentos carboxílicos, o ácido cítrico possui três valores de pKa: pH 3,1, 4,7, e 6,4 (PAPAGIANNI, 2007) e sua acidez é gerada por estes três grupos carboxilas (-COOH), que podem perder um próton em soluções. Como conseqüência, forma-se o íon citrato, que é um bom controlador de pH de soluções ácidas. Os íons citrato formam sais com cátions. O citrato de cálcio, por exemplo, é um importante sal, geralmente utilizado na preservação e condimentação dos alimentos. Além disso, citratos podem quelar íons metálicos e, portanto, podendo ser utilizado como conservantes e suavizadores de água (NELSON e COX, 2002).

Na temperatura ambiente, o ácido cítrico é um pó cristalino branco. Pode existir na forma anidra e como monohidrato, que contém uma molécula de água para cada molécula de ácido cítrico. A forma anidra se cristaliza em água quente, enquanto que a forma monohidratada do ácido cítrico se cristaliza em água fria. O monohidrato pode ser convertido na forma anidra aquecendo-se acima de 74 °C. Quimicamente, o ácido cítrico compartilha as características de outros ácidos carboxílicos. Quando aquecido acima de 175 °C, se decompõe produzindo dióxido de carbono e água (NELSON e COX, 2002).

O ácido cítrico é amplamente utilizado em produtos alimentícios (70%), farmacêuticos (12%), cosméticos e em outros produtos industriais (18%) devido às suas propriedades como acidulante, conservante, regulador de pH, aromatizante e antioxidante. É utilizado também como aditivo funcional em detergentes e cosméticos (TRAN *et al*., 1998; WANG, 1998; RYMOWICZ *et al.*, 2008; LAZAR *et al.*, 2011). Seu emprego em alimentos representa 55 a 65% do mercado total de acidulantes, contra 20 a 25% pelo ácido fosfórico e 5% correspondendo ao ácido málico (MAGNUSON e LASURE, 2004).

É comumente utilizado como conservante natural (antioxidante), conhecido também como acidulante INS 330, dando um sabor ácido e refrescante em alimentos e bebidas (RYMOWICZ *et al.*, 2008). O ácido cítrico é um aditivo alimentar versátil e inócuo. É aceito mundialmente como GRAS (Generally Recognized As Safe/ Geralmente Reconhecido como Seguro) pela *United States Food and Drug Administration* e aditivo alimentício seguro pelo "Experts Committee FAO (Food and Agriculture Organization/ Organização para Alimentação e Agricultura) e WHO (World Health Organization/Organização Mundial da Saúde), sem restrições à quantidade (SOCCOL *et al.*, 2006).

Na indústria de alimentos, esse ácido é usado em larga escala na fabricação de refrigerantes, sobremesas, conservas de frutas, geléias, doces, vinhos, na composição de sabores artificiais de refrescos em pó e na preparação de alimentos gelatinosos (GREWAL e KALRA, 1995).

Devido à sua capacidade de complexação com metais pesados como o ferro e o cobre, é utilizado em instalações industriais. Essa propriedade tem conduzido a crescente utilização como estabilizante de óleos e gorduras para reduzir a sua oxidação catalisada por esses metais

e esta propriedade aliada ao baixo grau de corrosividade a certos metais, tem permitido seu uso na limpeza de caldeiras e instalações especiais (GREWAL e KALRA, 1995).

Na indústria farmacêutica, é usado como estabilizante do ácido ascórbico devido à sua ação quelante. Nos antiácidos e analgésicos efervescentes, o ácido cítrico é usado juntamente com carbonatos e bicarbonatos para gerar CO_2 (GREWAL e KALRA, 1995) e atua como coagulante em transfusão sanguínea (LIMA *et al.*, 2001).

Na indústria de cosméticos é usado para ajustar o pH de loções adstringentes, como seqüestrante em cremes de lavagem ("rinse") e fixadores de cabelo (LIMA *et al.*, 2001). No setor de embalagens, ésteres de ácido cítrico, como trietil, tributil e acetildibutil, são usados como plastificantes não tóxicos nas películas plásticas de embalagens de alimentos (RODRIGUES, 2006). Em galvanoplastia, o ácido cítrico é usado em curtumes e na reativação de poços de petróleo, sendo empregado como agente sequestrante (LIMA *et al.*, 2001).

Há um interesse crescente em aumentar a produção de ácido cítrico devido a muitas aplicações. Os estudos revelam o potencial uso de ácido cítrico em biopolímeros, em *drug delivery*, em engenharia de tecidos para o cultivo de uma variedade de células e em muitas outras aplicações biomédicas e ambientalmente sustentáveis, como o uso de ácido cítrico para a remoção eficiente de resíduos de fluxo pós-solda por militares (ROBIN *et al.*, 1995; ASHKAN *et al.*, 2010; GUILLERMO *et al.*, 2010).

2.1.3 Mercado mundial de Ácido Cítrico

O ácido cítrico é uma *comoditie*, produzida e consumida em todo o mundo. Devido às suas inúmeras aplicações e aumento da demanda e consumo, o volume de produção de ácido cítrico por fermentação está aumentando continuamente em uma taxa anual de 5% (FINOGENOVA *et al.*, 2005; FRANCIELO *et al.*, 2008). Embora seja uma das fermentações industriais mais antigas, a produção mundial continua em rápida crescente. Em 1997, foi registrada uma produção global de 736.000 toneladas (QUÍMICA e DERIVADOS, 1997, *apud* VANDENBERGHE *et al.*, 1999), mais de 1,4 milhões de toneladas em 2007 (ANASTASSIADIS *et al.*, 2008) e 1,7 milhões de toneladas em 2013 (ZHANG *et al.*, 2014). Este valor excede a produção de qualquer outro ácido orgânico obtido por micro-organismo e o consumo deste ácido cresce principalmente devido ao seu emprego em alimentos e bebidas (GOLDBERG *et al.*, 2006; RYMOWICZ *et al.*, 2008).

Os principais produtores de ácido cítrico na América do Norte e na Europa Ocidental incluem ADM, Cargill, Tate & Lyle, DSM e Junbunzlauer. Gadot Biochemical Industries de Israel e Anhui BBCA Biochemical da China também são grandes fornecedores. A intensa competição e preços relativamente baixos fizeram com que muitos fabricantes pequenos de ácido cítrico da América do Norte e da Europa fechassem seus negócios na última década.

Consequentemente, grandes produtores se beneficiaram com a economia de escala (SOCCOL *et al.*, 2006).

O mercado de ácido cítrico esteve sob pressão por mais de dois anos e continua oscilando com a queda dos preços de $2/kg para $0,70-0.80/kg. Vários produtores, incluindo a ADM e a Tate & Lyle, diminuiram os níveis de produção e há dois anos Aktiva fechou uma fábrica na República Checa, como resultado das condições adversas de mercado. Fornecedores chineses comercializam a sua produção de ácido cítrico no menor preço possível, a fim de trazer divisas e isso faz com que seja extremamente difícil para os fornecedores europeus competirem (SOCCOL *et al.*, 2006).

Com o propósito de atender a demanda do mercado consumidor latino-americano, a CARGILL inaugurou no Brasil em 2000, no complexo industrial de Uberlândia (MG), uma unidade para a produção de ácido cítrico (SANTOS, 2008), com capacidade de 48 mil toneladas/ano (REVISTA CARGILL, 2011). A previsão é que a fábrica em Minas Gerais receba investimentos de mais de 75 milhões de reais para elevar a produção de ácido cítrico, amidos modificados e ração animal (http://www.cargill.com.br/pt/noticias/NA31306201.jsp, publicada pela Reuters em 19/03/2014 e acessada em 15 de julho de 2014).

A Ásia é o maior consumidor de ácido cítrico, sendo responsável por aproximadamente 28% do consumo mundial em 2012. China é o maior participante no mercado do ácido cítrico, sendo responsável por 59% da produção mundial em 2012. Este país também foi responsável por 69%, 74% e 12% da capacidade mundial, exportação e consumo, respectivamente, em 2012. Esta tendência deverá continuar no período de 2013 a 2018, com crescimento significativo no consumo chinês. O consumo de ácido cítrico em outros países asiáticos deverá crescer a uma taxa média anual de cerca de 4% de 2012 a 2018, em grande parte como resultado do uso em bebidas e alimentos. Em outros países da Ásia, Índia, Indonésia e Tailândia são os maiores consumidores (http://www.ihs.com/products/chemical/planning/ceh/citric-acid.aspx, publicada em 2013 e acessada em 21 de julho de 2014).

A América do Norte é o segundo maior mercado de ácido cítrico, sendo responsável por 24% do consumo mundial em 2012. Durante o período de 2012 a 2018, a expectativa para o aumento do consumo de ácido cítrico é de 2,5% de taxa média anual e o resultado do aumento é decorrente do consumo de bebidas, principalmente no México e Estados Unidos (http://www.ihs.com/products/chemical/planning/ceh/citric-acid.aspx, publicada em 2013 e acessada em 21 de julho de 2014).

A Europa Ocidental é o terceiro maior mercado de ácido cítrico, respondendo por quase 23% do consumo mundial em 2012. Está previso um consumo a uma taxa média anual de 1,7% durante 2012-2018 (http://www.ihs.com/products/chemical/planning/ceh/citric-acid.aspx, publicada em 2013 e acessada em 21 de julho de 2014).

Um crescimento elevado está previsto para os mercados em desenvolvimento em 2012-2018. O consumo de ácido cítrico na África e no Oriente Médio deve crescer a taxas médias anuais de 2,7% e 3,3%, respectivamente. Já o consumo na América Central e na América do Sul deverá crescer a uma taxa média anual de 3,9%. Em todos os mercados em desenvolvimento, bebidas e alimentos respondem pela maior parte do crescimento (http://www.ihs.com/products/chemical/planning/ceh/citric-acid.aspx, publicada em 2013 e acessada em 21 de julho de 2014).

2.2 Produção de Ácido Cítrico

2.2.1 Micro-organismos Produtores de Ácido Cítrico

Um grande número de micro-organismos como bactérias, fungos filamentosos e leveduras tem sido utilizado em uma variedade de substratos para a produção biológica de ácido cítrico, sendo indicados na Tabela 2.1 (CROLLA e KENNEDY, 2004; ANDRÉ *et al.*, 2007; FORSTER, 2007; PAPAGIANNI, 2007).

Tabela 2.1 - Micro-organismos produtores de ácido cítrico

Fungos filamentosos	*Aspergillus niger, A. awamori, A. clavatus, A. nidulans, A. fonsecaeus, A. luchensis, A. phoenicus, A. wentii, A. saitoi, A. flavus, Absidia sp., Acremonium sp., Botrytis sp., Eupenicillium sp., Mucor piriformis, Penicillium citrinum, P. janthinellu, P. luteum, P. restrictum Talaromyces sp,. Trichoderma viride, Ustulina vulgaris*
Leveduras	*Candida tropicalis, C. catenula, C. guilliermondii, C. intermédia, Pichia, Debaromyces, Kloekera, Saccharomyces, Zygosaccharomyces, Yarrowia lipolytica, Hansenula, Torula, Torulopsis,*
Bactérias	*Arthrobacter paraffinens, Bacillus licheniformis, Corynebacterium ssp*

Fonte: DHILLON *et al*. (2011)

Entretanto, a maior parte destes micro-organismos não é capaz de produzir rendimentos comercialmente aceitáveis devido ao fato de que o ácido cítrico é um metabólito do metabolismo de energia e o seu acúmulo em quantidades apreciáveis é o resultado de severas irregularidades no metabolismo causado por deficiências genéticas ou desequilíbrios metabólicos (SANCHEZ-RIERA, 2010). Entre as estirpes referidas, o fungo *A. niger* permanece em destaque como micro-organismo para a produção comercial porque produz mais ácido cítrico por unidade de tempo (SOCCOL *et al.*, 2006).

Linhagens de *A. niger* que são utilizadas industrialmente na produção de ácido cítrico não estão disponíveis gratuitamente e apenas algumas podem ser obtidas a partir de coleções

de cultura internacionais (SOCCOL *et al.*, 2006). Cepas mutantes de *Aspergillus niger* também são usadas na produção comercial de ácido cítrico (JIANLONG *et al.*, 2000). Entre as técnicas utilizadas para esta modificação tem-se γ-radiação, radiação UV e químicos mutagênicos (SOCCOL *et al.*, 2006).

Embora em escala industrial, o procedimento convencional de produção de ácido cítrico utilize *Aspergillus niger* e melaços como substrato (LOTFY *et al.*, 2007), durante os últimos 30 anos, o interesse de pesquisadores em usar processos alternativos de cultivo envolvendo espécies de levedura produtoras de ácido cítrico cresceu (KARASU-YALCIN *et al.*, 2010) uma vez que a demanda por ácido cítrico tem aumentado. Os gêneros de leveduras que são conhecidos por produzir ácido cítrico a partir de várias fontes de carbono incluem *Candida*, *Hansenula*, *Pichia*, *Debaromyces*, *Torula*, *Torulopsis*, *Kloekera*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces* e *Yarrowia* (SOCCOL *et al.*, 2006; PAPAGIANNI, 2007).

A produção de ácido cítrico por levedura é realizada em cultura submersa (SANCHEZ-RIERA, 2010), utilizando principalmente processos batelada, mas também em cultura contínua e com células imobilizadas (ARZUMANOV *et al.*, 2000).

Existem vários estudos demonstrando a capacidade de cepas de leveduras em produzir grande quantidade de ácido cítrico a partir de n-alcanos e carboidratos (AKIYAMA *et al.*, 1973; RANE e SIMS, 1996; CROLLA e KENNEDY, 2004). Durante as décadas de 1960 e 1970, os hidrocarbonetos eram relativamente baratos e, por isso, foram usados na produção comercial de ácido cítrico por leveduras. Porém esta produção não é mais econômica, mas as leveduras estão sendo estudadas para produzir ácido cítrico a partir de outras matérias-primas.

Especificamente *Yarrowia lipolytica*, *Candida guillermondii* e *Candida oleophila* têm sido aplicadas para a produção de ácido cítrico usando várias fontes renováveis ou resíduos como matérias-primas (FINOGENOVA *et al.*, 2005; RYMOWICZ *et al.*, 2006). Contudo, as únicas espécies conhecidas que são capazes de maximizar a produção de ácido cítrico destes substratos são as cepas selvagens e mutantes de *Y. lipolytica*. Essa levedura bem como o fungo *A. niger* são considerados como produtores potenciais de ácido cítrico (RYMOWICZ *et al.*, 2008).

O uso de leveduras do gênero *Candida* ou *Yarrowia* apresenta algumas vantagens em relação ao fungo filamentoso, como: maior resistência a elevadas concentrações de substratos, maior taxa de conversão, maior produtividade, melhor controle do processo devido à natureza unicelular da levedura (FICKERS *et al.*, 2005) e maior tolerância a íons metálicos, permitindo o uso de matéria-prima menos refinada (RANE e SIMS, 1993; KAMZOLOVA *et al.*, 2006). A produção de ácido cítrico pela levedura poderá ser no futuro uma alternativa ao *A. niger*, especialmente se a biomassa de levedura tornar-se um aditivo à alimentação dos animais e não um subproduto do processo (ROBAK *et al.*, 2007).

A produção convencional de ácido cítrico é um processo complexo e ecologicamente inseguro devido às características do melaço utilizado como matéria-prima, que exige pré-

tratatamento para remoção dos metais Fe^{+2} ou Mn^{+2} com ferrocianeto, por exemplo, concentrados de ácidos e álcalis que são usados durante todo o processo (FINOGENOVA *et al.*, 2005).

Uma desvantagem do uso da levedura *Yarrowia lipolytica* é a produção simultânea de ácido isocítrico durante a fermentação, sendo que a proporção de produção entre os ácidos cítrico e isocítrico pode variar de 1:1 para 20:1 de acordo com a estirpe de levedura, fonte de carbono e concentração de micronutrientes (RANE e SIMS, 1993). O ácido isocítrico possui habilidade tamponante e quelante inferior em comparação ao ácido cítrico e a cristalização do ácido cítrico durante o processo de purificação é prejudicada por contaminações com ácido isocítrico em níveis acima de 5% (RYWINSKA *et al.*, 2011).

A seleção de uma cepa de levedura com alta razão de produção de ácido cítrico: ácido isocítrico tem sido relatada como a principal etapa de um processo de produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* (YALCIN *et al.*, 2010). Roehr *et al.* (1996) constataram que a razão entre produção de ácido cítrico: ácido isocítrico é influenciada pelo tipo de micro-organismo, fonte de carbono e concentração dos micronutrientes acessíveis à levedura. A seleção de cepas mutantes de levedura com baixa atividade de aconitase tem sido usada na tentativa de reduzir a produção de ácido isocítrico (PAPAGIANNI, 2007).

2.2.2 Matéria-prima e Substrato

Atualmente, a produção de ácido cítrico em escala industrial por *A. niger* é realizada utilizando meios de produção contendo sacarose (VENTER *et al.*, 2004; RYMOWICZ *et al.*, 2006; LAZAR, *et al.*, 2011), milho hidrolisado, caldo de cana, melaço decationizado e açúcar cristal usando fermentação submersa (LEANGON *et al.*, 2000; KUMAR *et al.*, 2003) por empresas como ADM (*Archer, Daniels, Midland Company*), *Cargill*, *Tate & Lyle*, DSM *Nutritional Products*, *Junbunzlauer*, *Israel's Gadot Biochemical Industries*, *China's Anhui BBCA Biochemical*.

No Brasil, o melaço é preferencialmente utilizado como fonte de carbono para a produção microbiana de ácido cítrico devido ao seu custo relativamente baixo e elevado teor de açúcar (40-55%). Porém, a presença de elementos traços nesta matéria-prima influencia fortemente o acúmulo de ácido cítrico por *A. niger* e a produção elevada deste ácido somente é possível se houver um controle rigoroso da disponibilidade destes elementos, principalmente na fermentação submersa (SOCCOL *et al.*, 2006).

A composição do melaço depende de vários fatores como a variedade da beterraba e da cana utilizadas como matéria-prima na obtenção de açúcar, os métodos de cultivo destas matérias-primas, as condições de armazenagem e o manuseio (transporte, variações de temperatura), etc. Ambos os melaços, de cana e beterraba, são adequados para a produção de ácido cítrico. No entanto, o melaço de beterraba é preferível ao de cana de açúcar devido ao seu baixo conteúdo de traços de metais, fornecendo melhores rendimentos de produção do

que o melaço de cana. Entretanto, existem variações consideráveis de rendimento dentro de cada tipo. Geralmente, o melaço de cana contém metais (ferro, cálcio, magnésio, manganês, zinco) que retardam a síntese do ácido cítrico e, portanto, há necessidade de algum pré-tratamento para redução dos mesmos para ser utilizado como matéria-prima (SOCCOL *et al.*, 2006). Vários processos de tratamento e purificação de melaço foram desenvolvidos para a remoção de traços de metais (SOCCOL *et al*., 2006). Por exemplo, utiliza-se ferrocianeto e ácido fosfórico ou EDTA em resinas permutadoras de íons para diminuir os teores de Fe^{+2} ou Mn^{+2} em melaço (LEANGON *et al*., 2000; KUMAR *et al*., 2003). Portanto, alguns fatores devem ser considerados no momento da escolha da matéria-prima tais como o seu custo e a necessidade de um pré-tratamento que a torne adequada para uso na fermentação.

Em escala laboratorial, estão sendo utilizados como matérias-primas hidrocarbonetos, resíduos agroindústrias, e materiais ricos em amido (HANG e WOODAMS, 1998; JIANLONG *et al*. 2000; MOURYA e JAUHRI, 2000; VANDENBERGHE *et al.*, 2000; AMBATI e AYYANNA, 2001).

Uma variedade de resíduos agro-industriais e subprodutos também tem sido investigada como matéria-prima para a produção de ácido cítrico, como bagaço de mandioca, casca de café, farelo de trigo, bagaço de maçã, resíduos de abacaxi, casca de kiwi, bagaço de uva, resíduos de citrinos, etc, utilizando técnicas de fermentação em estado sólido (SOCCOL *et al.*, 2006).

A procura crescente de produção de biodiesel conduz à produção de quantidades abundantes de glicerol bruto como um produto secundário (WEN *et al.*, 2009). Este subproduto apresenta potencial como matéria prima para a produção de ácido cítrico (MAKRI *et al.*, 2010). Estudos realizados por Papanikolaou e Aggelis (2009), Makri *et al.* (2010) e Rymowicz *et al.* (2010) mostraram que *Y. lipolytica* cultivada em glicerol bruto produziu altas quantidade de ácido cítrico. O baixo custo do glicerol devido a grande quatidade gerada no processo de obtenção de biodiesel pode alavancar a produção industrial de ácido cítrico por *Y. lipolytica* no futuro (DHILLON *et al.*, 2011).

2.2.3 Fatores que influenciam a produção de ácido cítrico

A produção de ácido cítrico por *A. niger* é influenciada por uma série de parâmetros de cultura, dentre eles traços de íons metálicos, concentração de nitrogênio e álcoois inferiores (MATTEY, 1999).

A. niger exige certos metais traço para o crescimento (MATTEY, 1999), porém alguns íons metálicos ($Fe^{2+,}$ Mn^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}) são conhecidos por serem inibidores da produção de ácido cítrico por *A. niger* em fermentação submersa, mesmo com uma concentração muito baixa (KAPOOR *et al.*, 1987).

Como exemplo entre os elementos traços, os sais de ferro são essenciais para a produção de ácido cítrico, pois ativam a produção de acetil-CoA, que é importante para a

produção de ácido cítrico (MILSOM e MEERS 1985). Porém, a concentração excessiva de ferro ativa a aconitato hidratase (aconitase), enzima responsável pela produção de ácido isocítrico, sendo que a produção deste subproduto na fermentação é indesejada uma vez que reduz o rendimento do ácido cítrico (DHILLON *et al.*, 2011).

A presença do íon manganês (Mn^{2+}) no meio nutriente desempenha um papel chave no acúmulo de uma grande quantidade de citrato por *A. niger*. Uma pesquisa feita por Roehr *et al.* (1996) confirmou o papel regulador chave do íon Mn^{2+}. O anabolismo celular de *A. niger* é prejudicado em condições com deficiência total de manganês e/ou limitação de nitrogênio e de fosfato. O manganês também demonstrou ser importante em muitas outras funções celulares, mais notavelmente na síntese da parede celular, na esporulação e produção de metabolitos secundários (SHU e JOHNSON, 1948).

A produção de ácido cítrico também é influenciada pela concentração de nitrogênio, que em valor elevado, propicia o crescimento fúngico e o consumo de substrato, diminuindo o acúmulo de ácido cítrico (VANDENBERGHE *et al.*, 1999).

Álcoois inferiores adicionados em matérias-primas brutas que contém carboidratos aumentam a produção de ácido cítrico. Metanol, etanol, n-propanol, isopropanol ou acetato de metila neutralizam o efeito negativo dos metais na produção de ácido cítrico em quantidades cerca de 1 a 5% (KUBICEK e RÖHR, 1986). Contudo, a quantidade ótima de metanol e etanol depende da estirpe e da composição do meio (INGRAM e BUTTKE, 1984).

Haq *et al*. (2003), Sikander e Haq (2005), Rivas *et al*. (2008), Suzelle *et al.* (2009) e Nadeem *et al.* (2010) investigaram o papel de metanol ou etanol no rendimento de ácido cítrico produzido por *A. niger* e observaram que o aumento da produção de ácido cítrico através da adição de etanol pode ser atribuído à degradação lenta de ácido cítrico, devido à redução da atividade aconitase. A adição de etanol também resulta no ligeiro aumento na atividade de outras enzimas pertencentes ao ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). Outra explicação para o aumento da produção de ácido cítrico é a possibilidade de etanol ser convertido para acetil- CoA, um substrato metabólico necessário para a formação do ácido cítrico (DHILLON *et al.*, 2011).

O papel exato do metanol no aumento da produção de ácido cítrico ainda não está claro. Este álcool não é metabolizado/assimilado por *A. niger* e o seu efeito estimulante na produção de ácido cítrico pode ser explicado, pois aumenta a permeabilidade da membrana da célula provocando mais excreção de ácido cítrico a partir de células do micélio. Além disso, a adição de metanol alterou um pouco a atividade de algumas enzimas do ciclo de ácido tricarboxílico, favorecendo o acúmulo de ácido cítrico (DHILLON *et al.*, 2011).

2.2.4 Formas de condução do processo

A síntese de ácido cítrico através da fermentação é o processo mais econômico e amplamente utilizado para obtenção deste produto. Noventa e nove por cento do ácido cítrico

produzido mundialmente são obtidos por fermentação (KUFORIJI *et al.*, 2010). O processo de obtenção de ácido cítrico por fermentação apresenta vantagens como operação simples e estável, requerimento de sistemas de controle menos sofisticados, menor consumo de energia e pouca influência de falhas de energia no funcionamento da planta (SOCCOL *et al.*, 2006). O fungo filamentoso *A. niger* é preferencialmente utilizado, pois possui alto potencial de produção de ácido cítrico (DHILLON *et al.*, 2011).

A produção industrial de ácido cítrico por fermentação pode ser conduzida por três formas: fermentação em estado sólido, fermentação em superfície e fermentação submersa (YOKOYA, 1992; VANDENBERGHE, 2000).

A fermentação em estado sólido, originalmente desenvolvido no Japão, consiste em uma bioconversão em meio sólido empregando-se geralmente farelo de arroz ou resíduos de frutas, que após tratamento, são inoculados com uma suspensão de esporos, sendo utilizada uma linhagem específica de *Aspergillus niger* (YOKOYA, 1992; VANDENBERGHE, 2000).

O processo de fermentação em superfície foi o primeiro método empregado para obtenção biotecnológica de ácido cítrico em grande escala (GREWAL e KALRA, 1995). Nesta operação, o micélio do fungo *A. niger* cresce sobre a superfície do meio de cultura líquido e estático, que se encontra em bandejas de alumínio de elevada pureza contendo uma camada de meio de 5 a 20 cm de altura. Estas bandejas são colocadas em câmaras ventiladas, onde há circulação de ar esterilizado, o qual é responsável pelo fornecimento de oxigênio assim como pela retirada do calor produzido durante o processo fermentativo e a temperatura é mantida entre 28 – 30ºC (GREWAL e KALRA, 1995).

A fermentação submersa é a técnica mais utilizada para a produção de ácido cítrico, onde o fungo se desenvolve inteiramente submerso no meio de cultura líquido sob agitação, que serve para assegurar a homogeneidade tanto da distribuição dos micro-organismos quanto dos nutrientes. Estima-se que cerca de 80% da produção mundial é obtida através deste modo de condução (SOCCOL *et al.*, 2006) utilizando *A. niger* crescido em meio contendo glicose ou sacarose (VANDENBERGHE *et al.*, 1999; KUMAR *et al.*, 2003) em tanques agitados de 40-200 m^3 ou fermentadores airlift de 200-900 m^3 de capacidade (WAITES *et al.*, 2001). Este processo de fermentação empregado em larga escala requer instalações mais sofisticadas e controle rigoroso. Por outro lado, apresenta diversas vantagens, como maior produtividade e rendimento, custos operacionais mais baixos e menor risco de contaminação. A fermentação submersa pode ser realizada em batelada simples, batelada alimentada ou sistemas contínuos, embora seja mais freqüente o uso da batelada simples (SOCCOL *et al.*, 2006). Normalmente, a fermentação submersa para obtenção de ácido cítrico ocorre entre 5 e 12 dias, dependendo das condições de processo.

O método de fermentação utilizado influencia no rendimento de produção de ácido cítrico com a mesma estirpe do fungo *A. niger*. Assim, uma estirpe que produz bons rendimentos na fermentação sólida ou superfície líquida não é necessariamente um bom

produtor na fermentação submersa. Desse modo, cada um dos métodos e de matéria-prima de interesse industrial deve ser testado com a estirpe de estudo (YOKOYA, 1992) e uma ampla gama de substratos pode ser empregada para a produção eficiente e viável de ácido cítrico de acordo com o tipo de fermentação (DHILLON *et al.*, 2011).

2.2.5 Recuperação do Produto

Um dos processos convencionais de recuperação e purificação de ácido cítrico produzido por fermentação é a precipitação com carbonato de cálcio e ácido sulfúrico (PAZOUKI e PANDA, 1998).

Neste processo, após separação por filtração do micélio presente no caldo fermentado, a recuperação do ácido cítrico produzido por *A. niger* é realizada por precipitação ao adicionar carbonato de cálcio para formar citrato de cálcio tetrahidratado. O precipitado é recuperado por filtração e tratado com ácido sulfúrico, formando sulfato de cálcio (gesso), que é filtrado. O licor obtido com ácido cítrico regenerado é tratado com carvão ativado e resinas de troca iônica para eliminação das impurezas. O licor é concentrado em cristalizadores à vácuo a 20 - 25ºC e centrifugado para a separação dos cristais. Estes cristais são colocados em câmaras de secagem, trabalhando a temperatura de até 36,5ºC, para obter-se o ácido cítrico monohidratado. Acima desta temperatura, obtém-se o ácido cítrico anidro (SOCCOL *et al.*, 2006).

Este processo convencional de recuperação e purificação necessita de grandes quantidades de produtos químicos, aumentando o custo do processo e gera quantidades consideráveis de resíduos prejudiciais ao meio ambiente: para $1x10^3$ Kg de ácido cítrico produzido, aproximadamente 30 m^3 de CO_2, $40x10^3$ Kg de águas residuais e $2x10^3$ kg de gesso são gerados (JINGLAN *et al.*, 2009).

Para eliminar a produção de CO_2 e gesso como subprodutos poluentes, muitas técnicas de separação como extração por solventes (PAZOUKI e PANDA 1998), extração supercrítica com CO_2 (SHISHIKURA *et al.*, 1992, *apud* DHILLON *et al.*, 2011), eletrodiálise (PINTO *et al.*, 2002; WIDIASA *et al.*, 2004; *apud* DHILLON *et al.*, 2011) e separação por membrana (FRIESEN *et al.*, 1991) foram estudadas como possíveis métodos para recuperação e purificação de ácido cítrico.

2.3 ***Yarrowia lipolytica***

Yarrowia lipolytica é um micro-organismo estritamente aeróbio, eucariótico, do reino Fungi, pertencente à classe dos Ascomicetos, subclasse Hemiascomicetos. Foi originalmente classificada como *Candida lipolytica* e depois reclassificada como *Endomycopsis lipolytica*, *Saccharomycopsis lipolytica* e, finalmente, *Yarrowia lipolytica*. Esta levedura pode ser isolada de substratos ricos em proteínas e lipídeos, como produtos das indústrias de laticínios, de shoyu, produtos de saladas que contenham carne ou camarão (BARTH e GAILLARDIN,

1997), queijos ou salsichas, linguiças e chouriços (FICKERS *et al*., 2005) e também em produtos avícolas crus (ISMAIL *et al*., 2001). *Y. lipolytica* é uma das espécies predominantes em queijos *Camembert* e *blue-veined*. Seu crescimento nestes produtos está relacionado com as suas atividades extracelulares proteolíticas e lipolíticas e com a sua capacidade de crescer nas temperaturas de 5 a 10 ºC. Algumas cepas também têm sido isoladas de solos, água de esgoto e ambientes poluídos com petróleo (KIM *et al*., 2000; FICKERS *et al*., 2005).

Um grupo designado por leveduras "não-convencionais" foi adotado para diferenciar as leveduras pertencentes a este grupo das leveduras mais comumente utilizadas como, por exemplo, S*accharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*, que são, portanto, consideradas leveduras "convencionais" (BARTH e GAILLARDIN, 1997; FICKERS *et al.*, 2005). Estes dois grupos se diferenciam em relação à fisiologia, genética, biologia molecular e aplicação biotecnológica (ZINJARDE, 2014). A levedura *Yarrowia lipolytica* é a espécie mais estudada do grupo das leveduras "não-convencionais" principalmente por não apresentar patogenicidade (BARTH e GAILLARDIN, 1997; FICKERS *et al*., 2005) e tem sido utilizada como modelo para o estudo de secreção protéica, biogênese de peroxisomas, dimorfismo (KAWASSE *et al*., 2003), degradação de substratos hidrofóbicos (FERREIRA, 2009), complexos mitocondriais, acúmulo de lipídeos, produção de lipase, síntese de ácidos orgânicos (ZINJARDE, 2014) e em muitos outros campos (FICKERS *et al*., 2005). A seqüência total dos seis cromossomos de *Y. lipolytica* foi determinada permitindo sua admissão nos estudos de genoma, transcriptoma e proteoma (FICKERS *et al*., 2005).

O interesse por *Y. lipolytica*, em meados dos anos 1960, foi devido à sua capacidade em utilizar substratos hidrofóbicos, especialmente alcanos como fonte de carbono para a produção de proteína microbiana (SCP – *Single Cell Protein*) bem como os metabólitos do ciclo do ácido cítrico como os ácidos cítrico e α-cetoglutárico. Isto resultou em um amplo conhecimento de seu cultivo em fermentadores de larga escala (FICKERS *et al*., 2005, FINOGENOVA *et al.*, 2005).

Y. lipolytica foi classificada como *Generally Regarded As Safe* (GRAS) pela American *Food and Drug Administration* (FDA), apresentando potenciais de aplicação industrial tais como na produção de proteínas de micro-organismos unicelulares (SCP), *single cell oil* (SCO), aromas de pêssego, damasco e morango e ácido cítrico (TSUGAWA, *et al.*, 1969; FICKERS *et al*., 2005). Além disso, *Y. lipolytica* secreta várias enzimas para o meio, como proteases, lipases, RNases, esterases e fosfatases, em quantidades interessantes para aplicações industriais e todas de grande interesse biotecnológico (NICAUD *et al*., 2002; ZINJARDE, 2014).

2.3.1 Produção de Ácidos Orgânicos por *Yarrowia lipolytica*

A levedura *Y. lipolytica* tem a capacidade de produzir e secretar no meio de cultura uma ampla variedade de ácidos orgânicos em condições limitantes de crescimento e excesso

de carbono (ZINJARDE, 2014). Dentre estes ácidos, incluem-se os intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico, tais como o ácido cítrico, o ácido isocítrico, o ácido α-cetoglutárico e ácido pirúvico (BARTH e GAILLARDIN, 1997; KAMZOLOVA *et al.*, 2003; FICKERS *et al.*, 2005; RYMOWICZ *et al.*, 2008). Sendo esses ácidos de grande interesse comercial, os estudos para aumento de produção por via microbiológica utilizando tais leveduras, continuam até hoje.

As fontes de carbono utilizadas neste processo são alcanos, óleos vegetais, gorduras, etanol, melaços, amidos hidrolisados e glicerol, por serem fontes de baixo custo (PAPANIKOLAOU *et al.*, 2002; FICKERS *et al.*, 2005; RYMOWICZ *et al.*, 2006). O processo ocorre em condições limitantes de crescimento celular causado por diferentes fatores de nutrição, tais como a fonte de nitrogênio, tiamina, fosfato ou sais de compostos minerais (fósforo, enxofre e magnésio). Em condições de esgotamento de nitrogênio, há secreção de ácido cítrico e isocítrico, enquanto que a limitação de tiamina (uma vitamina que não é sintetizada por essa levedura, mas é necessária para a atividade da α-cetoglutarato desidrogenase) em baixo pH causa secreção principalmente de ácido α-cetoglutárico e ácido pirúvico (FICKERS *et al.*, 2005).

Otto *et al.* (2013) abordam o estado atual do campo de produção de ácidos orgânicos por *Yarrowia lipolytica*. Seu estudo relata que cepas selvagens de *Yarrowia lipolytica* tem habilidade de produzir ácido fumárico e ácido málico em certas condições, a partir de diferentes fontes de carbono, porém ainda em baixa concentração (inferior a 10 g/L). Vários mutantes estão sendo selecionados e as cepas recombinantes construídas de modo a melhorar as quantidades de ácido produzidas ou mudar o espectro de ácidos secretados.

2.3.1.1 Produção de Ácido Cítrico por *Yarrowia lipolytica*

O bioprocesso para produção de ácido cítrico utilizando *Y. lipolytica* tem várias vantagens em relação à produção usando *A. niger*, que inclui a utilização de uma variedade maior de substrato (logo seria possível a seleção de substratos de baixo preço) e uma menor sensibilidade à baixa concentração de oxigênio dissolvidos e metais, permitindo assim o uso de substratos menos refinado e maior rendimento do produto (LIU *et al.*, 2010). Estas capacidades podem levar a uma redução significativa nos custos do tratamento de matérias-primas e de resíduos e nos custos de recuperação do produto (ANTONUCCI *et al.*, 2001). Portanto, a levedura *Y. lipolytica* apresenta uma alternativa à tradicional produção de ácido cítrico por *A. niger* a partir de melaço, que acumula grandes quantidades de rejeitos sólidos e líquidos (CROLLA e KENNEDY, 2004; VENTER *et al.*, 2004; FINOGENOVA *et al* ., 2005; RYMOWICZ, *et al* ., 2008).

A escolha do micro-organismo, o tipo de substrato, as condições de crescimento como temperatura, aeração, concentração e fontes de carbono e nitrogênio, fosfato, elementos traços e pH são fatores que influenciam diretamente a produção de ácido cítrico (PAPAGIANNI,

2004; KARASU-YALCIN *et al.*, 2010). Logo, a otimização destes parâmetros é de fundamental importância para avaliar o desempenho da cepa em diferentes condições de processo (SOCCOL *et al.*, 2006). O uso de aditivos, cepas mutantes (para aumentar a produção de ácido cítrico ou melhorar a razão citrato: isocitrato) e geração de linhagens recombinantes (para aumentar os rendimentos ou aumentar a faixa de substratos utilizados) também são alguns dos parâmetros pesquisados na tentativa de aumentar a síntese de ácido cítrico por *Y. lipolytica* (ZINJARDE, 2014).

Como já mencionado anteriormente, a desvantagem do uso de cepas de *Y. lipolytica* na produção comercial de ácido cítrico é a produção simultânea de ácido isocítrico, o qual é um metabólito indesejado no processo. Portanto, pesquisadores estão buscando soluções para minimizar ou erradicar a produção deste composto. A maximização de ácido cítrico pode ser alcançada através da otimização das condições de meio de cultivo e operacionais, otimizando a cinética de crescimento celular e de produção de ácido cítrico e estudando as vias bioquímicas envolvidas na regulação da produção dos ácidos cítrico e isocítrico por *Y. lipolytica*.

Influência da fonte de carbono na produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica*:

Células de *Y. lipolytica* são capazes de sintetizar ácido cítrico a partir de várias fontes de carbono como alcanos, glicose, etanol, óleos vegetais, glicerol (CROLLA e KENNEDY, 2004; VENTER *et al*., 2004; FINOGENOVA *et al.*, 2005; RYMOWICZ *et al*., 2008), frutose, glicerol bruto (ARZUMANOV *et al.*, 2000; PAPANIKOLAOU *et al.*, 2008) e águas residuais da produção de azeite (SARRIS *et al.*, 2011).

Um processo de produção de ácido cítrico a partir de óleo de colza foi introduzido pela companhia *Archer Daniels Midland* (Decatur, III., USA) (BARTH *et al*., 2003; FICKERS *et al.*, 2005). Stottmeister *et al.* (1982) e Kruse *et al.* (2004) obtiveram uma produção de até 250 g/L de ácido cítrico pelo processo de fermentação em batelada alimentada utilizando 20% de alcanos ou óleo de girassol como fonte de carbono e utilizando *Y. lipolytica*. O rendimento da produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica* (NRRL Y-1095) em glicose variou de 0,38-0,77 g/g, dependendo da concentração de biomassa e de nitrogênio utilizada (NH_4Cl e extrato de lêvedo) (RANE e SIMS, 1996).

Altas concentrações finais de ácido cítrico entre 105,4 g/L e 116,8 g/L foram obtidas por Arzumanov *et al*. (2000) em batelada e em bateladas sucessivas utilizando *Y. lipolytica* e etanol como substrato e 120 g/L de ácido cítrico foram produzidas usando etanol por Kamzolova *et al*. (2003). Kamzolova *et al*. (2005) produziram cerca de 135 g/L de ácido cítrico com a cepa *Y. lipolytica* 187/1 a partir de óleo vegetal como matéria-prima. Neste caso, quantidades significativas de lipase extracelular foram produzidas simultaneamente.

Em um meio de cultivo contendo 200 g/L de glicerol bruto, foi possível produzir 0,69 g de ácido cítrico/g de glicerol consumido utilizando a cepa mutante *Y. lipolytica* Wratislavia

AWG7. O rendimento em ácido cítrico obtido para a cepa *Y. lipolytica* Wratislavia K1 foi menor e igual a 0,45g/g, que também produziu eritritol em rendimento elevado. Logo, reduzindo a produção de ácido cítrico (RYWIŃSKA *et al.*, 2009).

As condições para obtenção máxima de ácido cítrico por *Y. lipolytica*, utilizando petróleo como matéria-prima, foram estudadas e o rendimento do processo foi influenciado pelo método de alimentação do hidrocarboneto, pela concentração de componentes minerais, pela aeração (pO_2) e pH do meio. Os estudos permitiram desenvolver um método para a produção de citratos (misturas de citrato de sódio e isocitrato de sódio) e a sua concentração total foi de 102 g/L (rendimento de 142% do hidrocarboneto introduzido) (FINOGENOVA, 1982).

Influência da fonte de nitrogênio na produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica*:

A produção de ácido cítrico é influenciada pela natureza e concentração da fonte de nitrogênio utilizada no meio de cultivo, sendo uréia e sais de amônio as fontes mais utilizadas. As fontes de nitrogênio orgânica e inôrganica mais utilizadas por *Y. lipolytica* são extrato de lêvedo e cloreto de amônio, respectivamente (YALCIN *et al.*, 2010).

De acordo com Papanikolaou e Aggelis (2009), a produção de ácido cítrico ocorre principalmente quando a concentração de nitrogênio no meio de cultura torna-se limitada. A limitação de nitrogênio provoca diminuição rápida na concentração de AMP (monofosfato de adenosina), um regulador da enzima aloestérica NAD^+ (nicotinamida adenina dinucleotídeo) isocitrato-desidrogenase. Esta enzima catalisa a reação de transformação de ácido isocítrico em ácido alfa-cetoglutárico. Como conseqüência, o acúmulo de ácido cítrico na mitocôndria da célula, ao atingir um nível crítico, é secretado no citosol.

Karasu-Yalcin *et al.* (2010) utilizaram NH_4Cl como fonte de nitrogênio e as concentrações testadas variaram de 0 a 6 g/L. A máxima produção e produtividade de ácido cítrico foram obtidas com 2 g/L de NH_4Cl para as duas cepas estudadas: *Y. lipolytica* NBRC 1658 e *Y. lipolytica* 57. A diminuição da produção de ácido cítrico foi observada especialmente para *Y. lipolytica* NBRC 1658 em concentrações de NH_4Cl acima da concentração ideal.

Imandi *et al.* (2007) investigaram a produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica* a partir de glicerol bruto usando extrato de lêvedo como fonte de nitrogênio com uma concentração ótima em 0,2682 g/L.

Efeito da temperatura e pH na produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica*:

Sabe-se que a temperatura ótima para o crescimento celular e formação do produto pode ser diferente em alguns processos de fermentação. A temperatura ideal para a produção de ácido cítrico pode mudar em relação à cepa utilizada e das condições de fermentação. A faixa de temperatura relatada em várias pesquisas sobre a produção de ácido cítrico por

leveduras está entre 22-35°C. Karasu-Yalcin *et al.* (2010) observaram produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica* NBRC 1658 e *Y. lipolyica* 57 na temperatura de 35°C, porém os melhores resultados foram observados a 30°C no mesmo estudo para ambas as cepas. A máxima concentração celular foi obtida a 20°C para as duas linhagens.

O pH do meio de fermentação é conhecido como um dos parâmetros mais críticos para os processos de produção de ácido cítrico por leveduras. Relata-se que o pH inicial do meio de fermentação deve ser bem definido e otimizado em relação ao micro-organismo, substrato e técnica de produção utilizados (YALCIN *et al.*, 2010).

Karasu-Yalcin *et al.* (2010) estudaram o efeito do pH no crescimento e na produção de ácido cítrico por duas cepas de *Yarrowia lipolytica*: *Y. lipolytica* NBRC 1658 e *Y. lipolytica* 57, utilizando glicose como fonte de carbono. A faixa de pH inicial no meio de cultivo variou de 4,2 a 8,5. Para ambas as cepas, a concentração de ácido cítrico obtida foi elevada para a faixa de pH inicial de 5,2-7,0, reduzindo quando o pH inicial utilizado foi pH 8,5. A produção de ácido cítrico foi prejudicada no meio com o pH inicial de 4,2, sendo mais expressivo para a cepa *Y. lipolytica* NBRC 1658. A máxima produção de ácido cítrico obtida por *Y. lipolytica* NBRC 1658 foi 30,02 g/L no pH inicial 6,0, reduzindo para 1,21 g/L quando o pH inicial do meio era 4,2.

A concentração de íons hidrogênio exerce efeito sobre as atividades enzimáticas da célula e, consequentemente, influência a taxa específica de crescimento. Quando a fermentação para produção de ácido cítrico ocorre por leveduras, deve-se utilizar valor de pH inicial superior a 5, pois a concentração deste ácido decresce em pH inferior a 5 devido ao direcionamento do metabolismo das células para a formação de alguns poliálcoois como eritritol, arabitol e manitol em vez de ácido cítrico (MATTEY, 1992; ROEHR *et al.*,1993).

Anastassiadis e Rehm (2005) estudaram o efeito do pH na liberação do ácido cítrico por um sistema de transporte ativo específico presente na membrana de *Candida oleophila* e foi verificado que o sistema de transporte era um mecanismo pH-dependente e a máxima concentração de ácido cítrico foi obtida em pH 5.

Kamzolova *et al.* (2008) relataram que a produção de ácido cítrico e a proporção de ácido cítrico:ácido isocítrico dependia do pH do meio. Neste estudo, a cepa selvagem *Y. lipolytica* VKM Y-2373 produziu quantidades quase iguais de ácidos cítrico e isocítrico no pH 4,5, enquanto predominantemente acumulou ácido isocítrico no pH 6,0, utilizando óleo de girassol como fonte de carbono.

Indutores e Inibidores da produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica*:

A concentração dos elementos traços, tais como zinco, manganês, ferro, cobre e magnésio, no meio de cultivo também deve ser controlada, pois afetam a produção de ácido cítrico (SOCCOL *et al.*, 2006).

Karasu-Yalcin *et al.* (2010) estudaram o efeito de diferentes elementos traços na produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica* NBRC 1658 e *Y. lipolytica* 57, utilizando glicose como fonte de carbono. Verificou-se que a produção de ácido cítrico foi inibida para as concentrações utilizadas de ferro e cobre, enquanto o crescimento celular foi positivamente afetado pela adição destes minerais. Quando foi usado sal de manganês, um efeito negativo considerável sobre a produção de ácido cítrico foi observada especialmente para a cepa NBRC 1658. A produção de ácido cítrico pelas duas cepas foi afetada negativamente pela presença de sulfato de zinco no meio de cultivo, sendo mais evidente para a cepa NBRC 1658. O meio de cultivo utilizado neste estudo continha extrato de lêvedo, que possui todos os micronutrientes necessários para crescimento, incluindo os íons metais (DYAL e NARINE, 2005). Logo, este componente de meio provavelmente forneceu a quantidade destes íons necessária para a produção de ácido cítrico por estas cepas.

Quando a concentração de manganês ultrapassou 2 μg/L, houve diminuição de 20% na produção de ácido cítrico (KUBICEK, 2001). As concentrações destes íons dependem da sua proporção em relação a outros nutrientes, especialmente fosfato. A presença do íon ferro é essencial, pois ativa a produção de acetil-CoA, um precursor do ácido cítrico. Porém o excesso de ferro ativa a enzima aconitase, que catalisa a isomerização do citrato a isocitrato, portanto reduzindo a produção de ácido cítrico (CROLLA e KENNEDY, 2001).

Finogenova *et al.* (2002) descreveram que o principal fator determinante da produção de ácido cítrico em *Y. lipolytica* foi a limitação do crescimento celular por nitrogênio, enquanto a limitação em zinco ou ferro resultou em um insignificante crescimento celular sem a produção de ácido cítrico. Adicionando zinco ao meio, aumentou-se a produção de ácido cítrico. No mesmo estudo, também foi referido que a produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica* cultivada em etanol e em condições de limitação de crescimento celular por deficiência de nitrogênio no meio necessitou de elevadas quantidades de ferro intracelulares na gama de 0,2-2,5 mg/g. Em um teor de ferro intracelular de 7,0 mg/g, a produção de ácido cítrico foi completamente inibida.

Nos últimos anos, vários grupos de pesquisa tentaram alterar o meio de crescimento da cepa *Y. lipolytica* a fim de aumentar a produção de ácido cítrico (VENTER *et al.*, 2004). Através da adição de acetato de sódio na proporção de 1 para 3 em relação à massa de óleo de girassol, sendo esta a fonte de carbono utilizada, foi possível aumentar a proporção de ácido cítrico:ácido isocítrico significativamente de 1,7:1 na ausência de acetato para 3,7:1 na presença de acetato após 240 h de crescimento de *Yarrowia lipolytica* UOFS Y-1701 (VENTER *et al.*, 2004).

Akiyama *et al.* (1973) estudaram a produção de ácido cítrico e isocítrico por cepas selvagens de *Y. lipolytica* e verificaram que esta levedura secreta uma mistura dos dois ácidos com rendimento total de 130% em relação ao consumo de n-parafina, utilizado como fonte de carbono, e uma razão de 60:40 (ácido cítrico:ácido isocítrico) quando foi testada a cepa *Y.*

lipolytica ATCC 20114. Suplementando o meio de cultivo desta cepa com monofluoroacetato, este composto foi transformado em monofluorocitrato, que inibiu competitivamente a enzima aconitase, aumentando a proporção entre os ácidos cítrico e isocítrico para 85:15. Os pesquisadores isolaram uma cepa mutante incapaz de utilizar citrato como fonte de carbono, que passou por processo de mutagênese para se tornar uma cepa sensível ao composto fluoracetato com o objetivo de torná-la uma estirpe com baixa atividade para a enzima aconitase e o resultado obtido foi aumento de 145% do rendimento em relação ao substrato e aumento na razão entre os ácidos cítrico e isocítrico para 97:3.

Surfactantes químicos, como Triton X-100, afetam a permeabilidade das células de levedura e a produção de ácido cítrico. Em *Y. lipolytica* DSM 3286 e M7 permeabilizadas com o surfactante, a formação de ácido cítrico aumentou 1,4 a 1,8 vezes (MIRBAGHERI *et al.,* 2011). As concentrações finais variaram entre 75 e 85 g/L (0,80-0,84 g/g em termos de rendimento de conversão). Concluiu-se que o Triton X-100 pode ser utilizado para aumentar a eficiência da produção de ácido cítrico por cepas de *Y. lipolytica*.

Influencia de oxigênio na produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica*:

O efeito da pressão parcial de oxigênio (pO_2) foi testado na produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica* Y1095 em batelada utilizando glicose como fonte de carbono e o aumento de pO_2 de 20% para 80% de saturação durante a fase ativa de produção de ácido cítrico resultou em um aumento tanto na taxa específica de síntese de ácido cítrico (de 17 para 29 mg de ácido cítrico (g célula h)$^{-1}$) quanto na produtividade volumétrica (de 520 para 900 mg ácido cítrico (L.h)$^{-1}$), enquanto que o rendimento de ácido cítrico não foi afetado pela pO_2 (RANE e SIMS, 1994).

Finogenova *et al.* (1991) relataram que, reduzindo a pO_2 de 90-95% para 28-30% de saturação, o metabolismo de *Y. lipolytica* 704, um produtor de ácido isocítrico, foi alterado. Em valores elevados de pO_2 (60-95% de saturação), a levedura apresentou máxima taxa específica de crescimento celular e de rendimento do ácido isocítrico, enquanto em pO_2 de 28-30% de saturação, a taxa específica de crescimento de células reduziu a metade e não foi observado acúmulo do ácido.

O efeito da concentração de oxigênio dissolvido no crescimento de uma cepa de *Y. lipolytica*, em meio de cultivo contendo etanol, foi observado por Kamzolova *et al.* (2003), que detectaram um aumento de 2,8 para 6,9 g/L na concentração celular e de 0 para 18,2 g/L de ácido cítrico com o aumento de pO_2 de 5% a 60% de saturação de oxigênio dissolvido e em baixa concentração de ferro (0,7 mg/mL). Contudo, quando a concentração de ferro foi aumentada no meio de cultivo para 3,5 mg/mL, a pO_2 variando de 5 a 60% de saturação não mostrou efeito na biomassa e na produção de ácido cítrico apenas até 20% de saturação. A máxima produção de ácido cítrico foi alcançada no meio rico com ferro (3,5 mg/L) e em 20% de saturação de oxigênio.

Kamzolova *et al*. (2003) avaliaram também as atividades das enzimas do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) e do ciclo glioxilato de *Y. lipolytica* em função da concentração de pO_2 e em condições de baixa (0,7 mg/L) e alta (3,5 mg/L) concentrações de ferro. Em pO_2 de 5% de saturação e uma baixa concentração de ferro, a atividade da citrato sintase (uma enzima-chave do ciclo de Krebs) foi 70% da atividade obtida na maior concentração de ferro usada. A atividade da aconitase hidratase (AH) sob essas condições também foi muito baixa (0,02 U/mg de proteína). Sob condições de baixa concentração de ferro, um aumento de pO_2 de 5% a 60% aumentou 5 vezes a atividade de AH e aumentando a concentração de ferro de 0,7 para 3,5 mg/L (maior concentração usada), em baixa pO_2 (5%), a atividade de AH aumentou 9 vezes, sugerindo que o ferro é um fator limitante da atividade da enzima ferro-dependente, AH. Neste estudo foi verificado que em baixo pO_2 e em baixa concentração de ferro (0,7 mg/L) as atividades das enzimas envolvidas no ciclo do glioxilato que ressistetizam o oxoalacetato foram substancialmente reduzidas: isocitrato liase reduziu 4-8 vezes e malato sintase reduziu 3-5 vezes. Kamzolova *et al*. (2003) citam eu seu artigo que há evidências na literatura de que uma diminuição em pO_2 inibe a isocitrato liase (ICL), prejudicando o mecanismo de ressíntese de oxaloacetato pelo ciclo glioxilato. Estes resultados evidenciam que as concentrações de ferro e de oxigênio têm um forte efeito sobre as atividades de enzimas envolvidas na síntese de ácido cítrico.

Utilização de cepas mutantes ou recombinantes na produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica*:

Finogenova e Glazunova (1982) produziram mutantes capazes de sintetizar apenas um dos ácidos, ácido cítrico ou isocítrico. A cepa utilizada para mutação foi *Candida* (*Yarrowia*) *lipolytica* 704, obtendo a cepa mutante N1(produtora de ácido cítrico) e a cepa mutante N2 (produtora de ácido isocítrico). A comparação fisiológica e bioquímica destes mutantes com a cepa selvagem permitiu um entendimento sobre os mecanismos bioquímicos envolvidos na síntese de cada ácido.

Posteriormente, Lozinov *et al.* (1982) desenvolveu uma tecnologia de produção de ácido cítrico e citrato de sódio utilizando a cepa mutante N1 obtida por Finogenova e Glazunova (1982) em meio com vaselina como fonte de carbono. A concentração de ácido cítrico obtida foi de 217 g/L (rendimento 145%). O sal foi utilizado como um aditivo para detergentes líquidos produzidos na fábrica *Spodriba* (Latvia).

Uma tecnologia de produção de ácido isocítrico foi desenvolvida conjuntamente pelo Departamento de Bioenergética do Instituto de Bioquímica e Fisiologia de Micro-organismos (IBPM, Rússia) e pela Fábrica Experimental de Produção de Preparações de bioquímicos (EFPBP; Riga, Latvia), que utilizou uma cepa selvagem *Y. lipolytica* utilizando alcano como fonte de carbono. O conhecimento das características fisiológicas e bioquímicas da biossíntese permitiu suprimir a síntese de ácido cítrico usando inibidores do ciclo do

glioxilato, obtendo uma maior produção de ácido isocítrico (ILLARIONOVA *et al.*, 1983, *apud* FINOGENOVA *et al.*, 2005). Uma linha de produção industrial de isocitrato de monopotássio foi criada em EFPBP (ROMANOVA *et al.*, 2000, *apud* FINOGENOVA *et al.*, 2005). O produto foi fornecido para vários locais na União Soviética e no exterior.

Algumas estirpes recombinantes estão sendo geradas para a produção de ácido cítrico. *Yarrowia lipolytica* recombinante 87 (com gene que codifica a enzima exo-inulinase) produziu 68,9 g/L de ácido cítrico e 4,1 g/L de ácido isocítrico em 312 h de fermentação utilizando inulina como fonte de carbono (LIU *et al.*, 2010). Esta cepa foi novamente submetida à técnica de engenharia genética e, quando o gene ATP-citrato liase (acl1) foi deletado e o número de cópias do gene isocitrato liase (icl1) foi aumentado, os conteúdos lipídico e de ácido isocítrico foram bastante reduzidos e a produção de ácido cítrico aumentou consideravelmente. Verificou-se também que a expressão do gene acl1 e a atividade da enzima ATP-citrato liase diminuiram e a expressão do gene icl1 e a atividade da enzima isocitrato liase foram promovidas. A produção obtida neste estudo foi de 84 g/L de ácido cítrico, 1,8% de ácido isocítrico em 214 h de fermentação. No final do processo, havia apenas 0,36% de açúcar redutor e 1% de açúcar total no meio fermentado, sugerindo que 89,6% do açúcar total foram utilizados para a produção de ácido cítrico e crescimento celular. Os dois estudos foram realizados sob as mesmas condições (LIU *et al*., 2013).

Alguns resíduos agrícolas estão sendo utilizados como substratos alternativos à produção de ácido cítrico. Wang *et al.* (2013) propuseram o uso de extrato de alcachofra de Jerusalém e a cepa geneticamente modificada *Y. lipolytica* 30 [inulinase recombinante, com supressão do gene acl1 que codifica a enzima citrato liase (ACL) e com aumento da cópia do gene icl1 que codifica a enzima isocitrato liase (ICL)] utilizada no estudo de Liu *et al.* (2013).

Devido o meio deficiente em fósforo favorecer a produção de ácido cítrico por *A. niger*, o íon magnésio ser necessário para o crescimento celular e formação de ácido cítrico por *A.niger* e a fonte e o meio deficiente em nitrogênio favorecer a produção de ácido cítrico (SANCHEZ-RIERA, 2010), Wang *et al.* (2013) realizaram a suplementação do extrato de alcachofra de Jerusalém com diferentes concentrações de sulfato de amônio, fosfato de potássio monobásico, magnésio e vitamina B1 na produção de ácido cítrico e os resultados mostraram que os componentes presentes naturalmente no extrato sem adição de quaisquer outros componentes eram apropriados para a produção de ácido cítrico com a estirpe de levedura estudada. A concentração inicial de açúcar total presente no extrato também foi avaliada e o melhor resultado foi obtido em 84,3 g/L de açúcares totais. A máxima produção de ácido cítrico foi de 68,3 g/L e o rendimento foi de 0,91 g/g em 336 h nas melhores condições de processo obtidas neste presente estudo.

Förster *et al*. (2007) utilizaram uma cepa recombinante de *Y. lipolytica* para produzir ácido cítrico em sacarose, inserindo o gene ScSUC2 de *S. cerevisiae* que expressa invertase.

A expressão de invertase foi aumentada em pH 6,0 e resultou na produção de 127-140 g/L de ácido cítrico e rendimento de 0,75-0,82 g/g.

2.3.1.2 Produção de Ácido Cítrico por *Yarrowia lipolytica* Utilizando Glicerol como Substrato

A alta demanda de energia no mundo industrializado e no setor doméstico, bem como os problemas de poluição causados devido ao vasto uso de combustíveis, têm resultado em uma crescente necessidade de desenvolver fontes de energias renováveis sem limites de duração e de menor impacto ambiental que os meios tradicionais existentes, estimulando, assim, a busca de fontes alternativas para produção de combustíveis (GERIS *et al.*, 2007).

Como exemplo, tem-se o biodiesel, cuja utilização permite reduzir as emissões de monóxido de carbono, comparados a combustíveis derivados do petróleo. É produzido a partir de óleos vegetais e gorduras animais, através da reação de transesterificação com o etanol ou metanol catalisada por hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio e durante esta reação para cada 10 kg de biodiesel produzido 1 kg de glicerol se torna disponível (MEESTERS *et al.*, 1996; THOMPSON *et al.*, 2005; JOHNSON e TACONI, 2007), constituindo o principal subproduto do processo de produção de biodiesel por transesterificação. Este composto é obtido sob a forma bruta, cujo valor é muito baixo devido à presença de diversas impurezas (THOMPSON *et al.*, 2005).

O glicerol bruto contém diferentes níveis de vários contaminantes como sabões alcalinos, metanol, hidróxidos, ésteres metílicos, microelementos (ferro, magnésio, cálcio, zinco), nitrogênio, fósforo e água (TERPEN, 2005). Dependendo do catalisador utilizado para a reação do biodiesel, o glicerol bruto pode conter 6-8% de sais inorgânicos. Vários métodos, tais como evaporação do álcool, remoção de produtos saponificados, neutralização, concentração, etc, são necessários para recuperar o glicerol como um subproduto (WILLKE e VORLOP, 2004). A maior parte de glicerol bruto possui de 60-90% de glicerol w/w, com quantidades variáveis de outros componentes (água, metanol e sais) (THOMPSON e HE, 2004, *apud* RYWIŃSKA *et al.*, 2013).

Considerando a necessidade por combustíveis renováveis e o aumento da demanda e produção de biodiesel, um excesso de glicerol está sendo disponibilizado no mundo e a bioconversão de glicerol adiciona significativo valor à produtividade do biodiesel pelas indústrias (PAPANIKOLAOU *et al.*, 2002; RYMOWICZ *et al.*, 2006 DA SILVA *et al.*, 2009).

Glicerol bruto tem sido usado com sucesso como fonte única de carbono para a produção de alguns produtos de valor agregado por várias bactérias, leveduras, fungos e microalgas em condições aeróbias e anaeróbias. *Yarrowia lipolytica* tem sido abordada em diversos estudos realizados em vários centros de pesquisa e nos últimos anos tem sido

especialmente relacionada para muitas aplicações em meio de cultivo contendo glicerol (RYWIŃSKA *et al.*, 2013).

Papanikolaou *et al*. (2002) investigaram a resposta bioquímica de *Yarrowia lipolytica* LGAM S(7)1 crescida nesta matéria-prima em diferentes razões molares carbono-nitrogênio para produzir metabólitos de grande valor industrial. O principal ácido orgânico produzido foi ácido cítrico, que em meio tamponado teve sua produção aumentada. Outros ácidos orgânicos produzidos em baixas quantidades foram isocítrico, acético e α-cetoglutárico. O crescimento de *Y. lipolytica* foi conduzido em shaker com meio de cultivo contendo razões molares (C/N) de 98 ou 147 e a concentração de ácido cítrico obtida nestas condições foi 11,9 e 13,7 g/L, respectivamente. A fim de aumentar a produção deste ácido orgânico, altas concentrações de glicerol proveniente da produção de biodiesel (80 e 120 g/L) e com altas razões C/N (261 e 388) foram testadas. O resultado foi satisfatório uma vez que a concentração de ácido cítrico aumentou para 33,6 e 35,1 g/L com rendimento de 0,44 e 0,42 g/g de glicerol consumido, respectivamente, em tempo de fermentação igual a 236 h.

Levinson *et al.* (2007) examinaram 27 cepas de *Y. lipolytica* bem como 5 cepas de três outras espécies (*Aciculoconidium aculeatum*, *Candida hispaniensis* e *Candida bentonensis*) na produção de ácido cítrico utilizando glicerol puro como fonte de carbono. As culturas foram crescidas em condições limitantes de nitrogênio. Nenhuma das 5 cepas de outras espécies produziram ácido cítrico, porém todas as cepas de *Y. lipolytica* foram capazes de produzir ácido cítrico em diferentes concentrações. A maior produção foi obtida utilizando *Y. lipolytica* NRRL YB-423, atingindo 21,6 g/L de ácido cítrico a partir de 40 g/L de glicerol (54% de rendimento). Utilizando essa cepa, a proporção entre os ácidos cítrico e isocítrico foi 11,3:1 enquanto que com as outras cepas de *Y. lipolytica* a proporção foi 2:1 e 6:1 nas mesmas condições de trabalho. O meio de crescimento para a cepa *Y. lipolytica* NRRL YB-423 foi otimizado variando a razão carbono e nitrogênio com o objetivo de aumentar a proporção de ácido cítrico e ácido isocítrico e foi concluído que o melhor resultado foi obtido na razão C/N entre 343 e 686.

Rymowicz *et al*. (2006) examinaram a capacidade de biossíntese de ácido cítrico por 3 cepas mutantes de *Yarrowia lipolytica*: AWG-7, 1.31 e K-1 utilizando glicerol proveniente da produção de biodiesel com o objetivo de selecionar a melhor cepa produtora e comparar os parâmetros cinéticos da biossíntese de ácido cítrico. Os resultados mostraram que a produção de ácido cítrico por estas leveduras está relacionada com as condições limitantes de nitrogênio e com excesso de fonte de carbono (200 g/L). A viabilidade celular destas leveduras não foi inibida pelo excesso de substrato, comportamento similar observado usando *Y. lipolytica* LGAM S(7)1 (PAPANIKOLAOU *et al*., 2003). Este comportamento não foi observado em *Candida curvata*, cujo meio de crescimento com alto valor de glicerol (120 g/L) inibiu seu crescimento quase completamente (MEESTERS *et al.*, 1996). Foi observado que a produção dos ácidos cítrico e isocítrico foi iniciada após o crescimento exponencial cessar (após 17 –

20 h de cultivo) para as 3 cepas mutantes. A mais alta taxa específica de produção de ácido cítrico (0,05 g/g.h) e o maior rendimento de ácido cítrico em termos de consumo de glicerol (0,62 g/g) foram alcançados usando a cepa 1.31, a partir da qual 124,5 g/L de ácido cítrico foram produzidos.

Lazar *et al.* (2011) estudaram a capacidade da cepa *Y. lipolytica* A-101-B56-5 (SUC^+ clone) em produzir ácido cítrico em biorreator, utilizando como substrato sacarose, mistura de glicose e frutose, glicose ou glicerol de grau técnico. A maior concentração de ácido cítrico foi alcançada por glicerol (57,15 g/L) com rendimento ($Y_{P/S}$) de 0,6 g/g.

Da Silva (2010) aperfeiçoou com auxílio de planejamento experimental a composição do meio de cultivo para a produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682. Inicialmente, trabalhou com concentrações elevadas de glicerol PA (150 a 250 g/L) e, ao contrário do que era observado na literatura, a melhor concentração de ácido cítrico foi obtida reduzindo a concentração de glicerol para 30 g/L, estabelecendo uma razão molar carbono-nitrogênio (C/N) de 714. Neste caso, a produção máxima de ácido cítrico obtida foi de 16,49 g/L utilizando glicerol PA como fonte de carbono, sendo o rendimento de ácido cítrico em relação a concentração inicial de glicerol utilizada igual a 0,55 g/g, e razão entre ácidos cítrico-isocítrico ($R_{AC/ISC}$) igual a 12:1. Foram produzidos 6,75 g/L de ácido cítrico utilizando como fonte de carbono o glicerol bruto oriundo da indústria de biodiesel na melhor condição obtida pelo planejamento experimental, mostrando ser um meio de cultura alternativo capaz de suportar o crescimento desta cepa de *Y. lipolytica* e a biossíntese do ácido cítrico.

Em outro estudo, Da Silva *et al.* (2011) aperfeiçoaram a produção de ácido cítrico a partir de glicerol bruto, utilizando a concentração de 45 g/L de glicerol e 0,1 g/L de extrato de lêvedo, obteve 9,22 g/L de ácido cítrico, 0,41 g de ácido cítrico/g de glicerol consumido e 0,1 g/L.h de produtividade volumétrica de ácido cítrico.

2.3.1.3 Mecanismo de Obtenção de Ácido Cítrico por *Yarrowia lipolytica*

Morgunov *et al.* (2004) investigaram o mecanismo de acúmulo de ácido cítrico pela levedura *Y. lipolytica* cultivada na presença de glicose e deficiência de nitrogênio. A limitação do crescimento da levedura pela fonte de nitrogênio diminuiu o conteúdo total de nucleotídeos e aumentou as razões de ATP/AMP e $NADH/NAD^+$. A enzima isocitrato desidrogenase NAD^+-dependente, uma enzima que tem um papel importante no ciclo do ácido tricarboxílico, foi isolada de células de *Y. lipolytica* e o efeito de alguns intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico na atividade dessa enzima sugere que o aumento da secreção de ácido cítrico pode ser causado pela inibição desta enzima devido à redução do conteúdo de AMP e aumento da razão $NADH/NAD^+$ nas células em limitação de nitrogênio.

É de conhecimento que o catabolismo de glicerol por leveduras estritamente aeróbias ocorre somente via glicólise Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP). A via glicerol kinase é responsável pela degradação do glicerol. A via catabólica de glicerol inclui fosforilação por

glicerol kinase e uma subsequente oxidação por flavina adenina dinucleotídeo (FAD)-dependente glicerol 3-fosfato desidrogenase(G-3-P-DH), localizada na superfície externa da membrana mitocondrial. A dihidroxiacetona 3-fosfato formada inicia a via glicolítica (RYMOWICZ *et al*., 2008).

Makri *et al.* (2010) analisaram a atividade metabólica de *Yarrowia lipolytica* ACA-DC 50109 cultivada em glicerol comercial em batelada alimentada para obtenção de ácido cítrico e através da análise das atividades enzimáticas, observaram que o glicerol foi assimilado somente pela via da fosforilação, em que as enzimas glicerol quinase e NAD^+-G-3-P-DH se fazem presentes, conforme é mostrado na Figura 2.2, uma vez que não foi detectada atividade para as enzimas envolvidas na via oxidativa: glicerol desidrogenase (G-DH) e glicerol 3-fosfato desidrogenase FAD^+ dependente (FAD^+-G-3-P DH).

Durante a fase de produção de ácido cítrico, a depleção de nitrogênio provoca um rápido decréscimo na concentração de AMP intracelular, devido a sua clivagem pela enzima AMP-desaminase. Com isto, a enzima isocitrato desidrogenase NAD^+-dependente (NAD^+-ICDH), enzima responsável por catalisar a descarboxilação oxidativa do ácido isocítrico em ácido α-cetoglutárico, perde a atividade, visto que a mesma é ativada alostericamente por AMP intracelular, com subsequente acúmulo de ácido cítrico no interior da mitocôndria. Quando a concentração de ácido cítrico alcança um valor crítico, o ácido cítrico é secretado para o citosol. Durante a fase lipogênica, o ácido cítrico do citosol é clivado por ATP-citrato liase (enzima chave do processo de acúmulo de lípideos) a oxaloacetato e acetil-CoA, precursor para biossíntese de ácidos graxos por micro-organismos oleaginosos (RATLEDGE e WYNN, 2002).

Durante a transição da fase lipogênica para a fase de produção de ácido cítrico quantidades significativas de glicerol foram convertidas em ácido cítrico simultaneamente a fase de degradação de lipídeos (*Lipid Turnover*). Nessa fase é observada a transformação dos ácidos graxos gerados na fase lipogênica em acetil-CoA, que entra na matriz mitocondrial e participa do ciclo de Krebs e, consequentemente, da produção de ácido cítrico. O direcionamento dos triacilglicerídeos para o ciclo de Krebs é decorrente da baixa atividade da enzima glicerol quinase. As mudanças metabólicas foram atribuídas aos níveis das atividades glicerol quinase e NAD^+-ICDH (MAKRI *et al.*, 2010).

A Figura 2.2 ilustra a biossíntese de ácido cítrico e lipídeo intracelular por *Y. lipolytica* quando a levedura é cultivada em meio contendo glicerol e nitrogênio limitante.

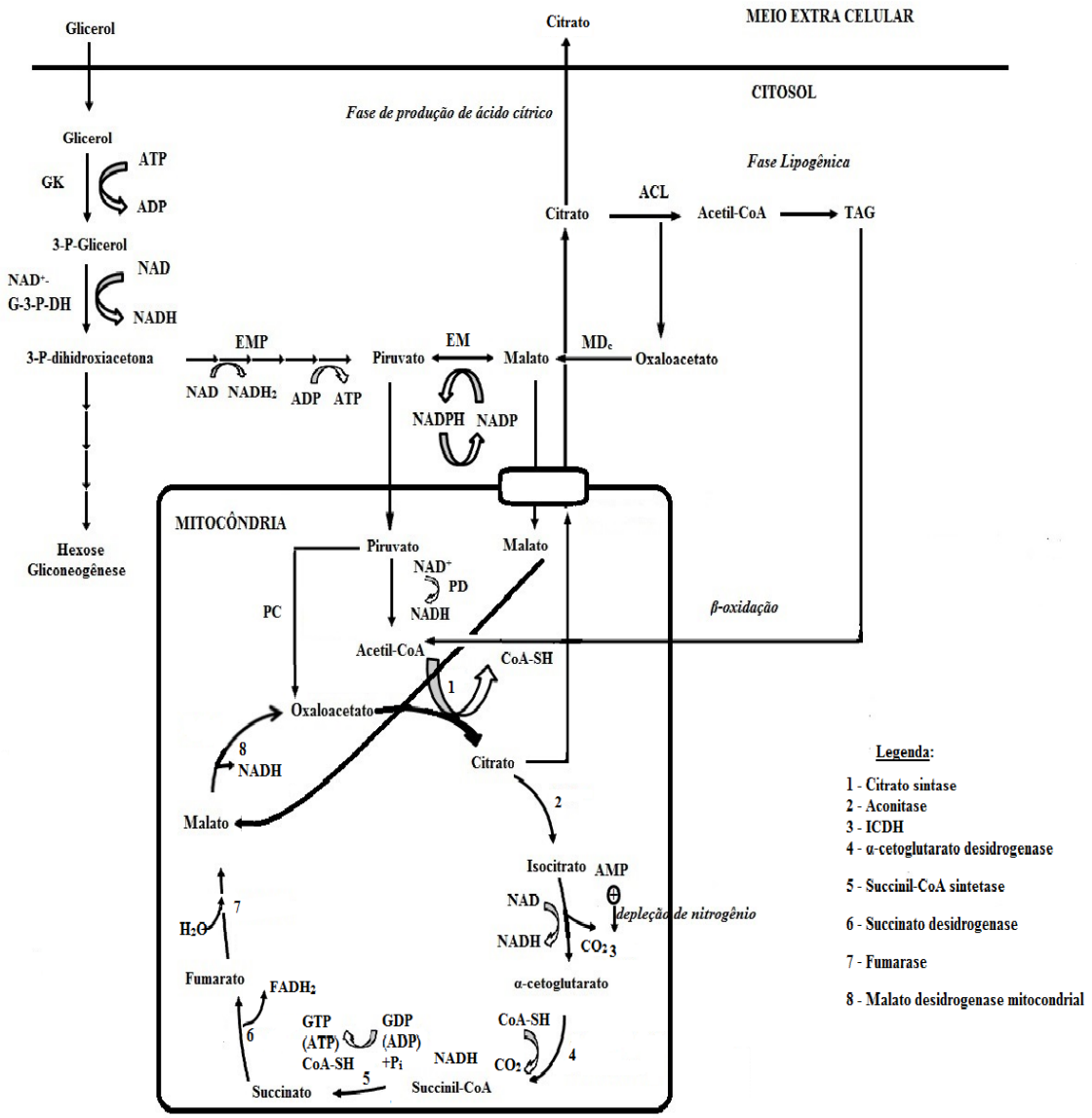

Figura 2.2 - Vias metabólicas envolvidas no catabolismo de glicerol e biossíntese de lipídeos intracelulares e ácido cítrico extracelulares por *Yarrowia lipolytica*. Abreviaturas: TAG: triglicerídeos; GK: glicerol quinase; NAD^+-G-3-P-DH: NAD+-3-P glicerol desidrogenase; ACL: ATP-citrato liase; MD_c: malato desidrogenase (citoplasma); PD: piruvato desidrogenase; PC: piruvato carboxilase; ICDH: isocitrato desidrogenase; EM: Enzima Málica

Holz *et al.* (2009) avaliaram a influência da atividade da enzima aconitase na produção de ácido cítrico e ácido isocítrico e a razão estabelecida entre estes ácidos ($R_{AC/ISC}$). Nesse estudo foram testadas a cepa nativa *Y. lipolytica* H222 e as cepas mutantes *Y. lipolytica* H222-S4(p67ICL1) T5 (modificada com o gene que codifica a enzima isocitrato liase) e H222-S4(p67ACO1) T1 (modificada geneticamente com o gene que codifica a enzima aconitase). Foram utilizados como substrato glicose, sacarose, glicerol e óleo de girassol. Foi demonstrado nesse estudo que, através do aumento da atividade da enzima aconitase devido à inserção do gene ACO1 na levedura, houve alteração significativa na razão entre os ácidos cítrico e isocítrico ($R_{AC/ISC}$) quando o substrato utilizado foi óleo de girassol. A produção de

ácido isocítrico para a cepa nativa variou entre 35 e 49% do total de ácido produzido (ácido cítrico somado com ácido isocítrico) e para a cepa H222-S4(p67ACO1) T1 variou de 66 a 71%. No entanto, em glicose, sacarose e glicerol como fontes de carbono, a formação de ácido isocítrico foi apenas moderado com um aumento de 8 a 12% para 13 a 17%, quando se utilizou a cepa mutante H222-S4(p67ACO1) T1. Estes resultados mostraram que a $R_{AC/ISC}$ por *Y. lipolytica* é dependente da fonte de carbono utilizada e que a alta atividade da aconitase promoveu maior aumento na produção de ácido isocítrico quando se utilizou óleo de girassol como substrato. Ao contrário destes resultados, utilizando a cepa *Y. lipolytica* H222-S4(p67ICL1) T5 houve redução significativa da produção de ácido isocítrico para 3 a 7% em todos os substratos testados, evidenciando que a a alta atividade da enzima isocitrato liase favorece a produção do ácido cítrico. Os níveis de expressão das enzimas aconitase e isocitrato liase parecem ter uma forte influência sobre a $R_{AC/ISC}$, em diferentes fontes de carbono, incluindo óleos vegetais, hexoses e glicerol. Portanto, merecem bastante atenção na tentativa de desvendar o mecanismo de acúmulo de ácido cítrico por *Y. lipolytica*.

Estudos demonstram que a enzima citrato sintase pode desempenhar um papel importante na produção de ácido cítrico (PAPAGIANNI, 2007). Kamzolova *et al.* (2008) verificaram um aumento da atividade da enzima citrato sintase em 30% e uma diminuição das atividades da aconitase hidratase e NAD-isocitrato desidrogenase na fase de biossíntese de ácido cítrico em relação a fase de crescimento da cepa mutante *Y. lipolytica* N 15 (identificada como mutante incapaz de utilização de citrato). Uma elevada atividade da citrato sintase e baixa atividade de outras enzimas do ciclo do ácido cítrico, incluindo aconitase hidratase e NAD-isocitrato desidrogenase, são necessárias para a produção elevada de ácido cítrico visto que o ácido cítrico formado no ciclo do ácido cítrico pode ser presumivelmente excretado da célula de levedura em vez de ser metabolizado através do ciclo (LIU *et al.*, 2013).

2.4 Análise do Proteoma Mitocondrial

As mitocôndrias são organelas citoplasmáticas presentes em células eucarióticas e são formadas por estruturas complexas, com duas membranas altamente especializadas, uma externa e outra interna. Possuem o espaço intermembranal e o espaço interno da matriz onde estão presentes o DNA mitocondrial, os ribossomos mitocondriais, os RNAs e várias enzimas. Essas organelas têm funções essenciais nas células eucarióticas como: a produção de energia (ATP) para as atividades do organismo, atuação na morte celular por apoptose, produção de calor e contribuição genética a partir do DNA mitocondrial. A grande transformação de energia e o consumo de oxigênio das células eucarióticas são possíveis através desta importante organela (Figura 2.3) (ALBERTS *et al.*, 2004).

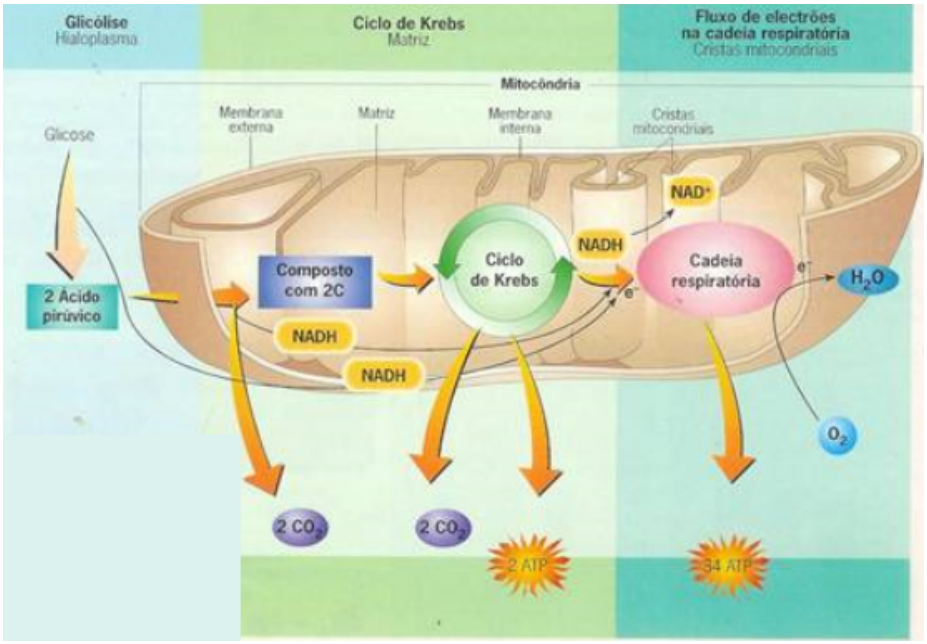

Figura 2.3 – Vias metabólicas que ocorrem na organela mitocôndria em células eucarióticas

As mitocôndrias de mamíferos, plantas e muitas espécies de leveduras possuem quatro complexos respiratórios ligados à sua membrana interna. Estes complexos participam da transferência de elétrons para o oxigênio, e, portanto, são considerados os componentes clássicos da cadeia respiratória. Estes são: NADH: ubiquinona oxido-redutase (complexo I), succinato: ubiquinona oxido-redutase (complexo II), ubiquinol: citocromo c oxido-redutase (complexo III) e citocromo c oxidase (complexo IV). A cadeia respiratória gera um gradiente de prótons utilizado pela F1F0-ATP sintase (complexo V) para sintetizar ATP (HATEFI, 1985; NICHOLLS e FERGUSON, 2002, *apud* GUERRERO-CASTILLO *et al.*, 2009).

O ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) ocorre na matriz mitocondrial e uma grande quantidade de trabalho tem se concentrado nesse ciclo para explicar o acúmulo de ácido cítrico. Pesquisadores têm afirmado que a inativação de uma enzima que degrada o citrato, por exemplo, a aconitase ou a isocitrato desidrogenase, é essencial para ao acúmulo de ácido cítrico. No entanto, a presença de um conjunto completo de enzimas dos ciclos do ácido cítrico e do glioxilato durante a fermentação do ácido cítrico tem sido demonstrada (FINOGENOVA, *et al.*, 2002; PAPAGIANNI 2007).

Um estudo comparativo entre as enzimas do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) e o ciclo do glioxilato na cepa mutante *Yarrowia lipolytica* N1capaz de produzir ácido α-cetoglutárico (KGA) e ácido cítrico mostrou que quase todas as enzimas do ciclo do TCA são mais ativas em condições que promovem a produção de KGA. A única exceção foi citrato sintase, cuja atividade foi maior em células de levedura que produzem ácido cítrico. A produção de ambos os ácidos foi acompanhada pela supressão das enzimas do ciclo do glioxilato. As atividades de malato desidrogenase, aconitase, isocitrato desidrogenase NADP

dependente e fumarase foram maiores nas células produtoras KGA do que nas células que produziram ácido cítrico (IL'CHENKO *et al.*, 2002).

Baseado nos estudos realizados e citados ao longo deste texto, que evidenciam a grande influência das enzimas pertencentes aos ciclos de Krebs e do glioxilato na produção de ácido cítrico, o estudo do proteoma da mitocôndria da levedura *Y. lipolytica* faz-se necessário para identificar o nível de expressão destas enzimas, verificando assim a respectiva influência no acúmulo de ácido cítrico.

Para identificar as enzimas pertencentes ao ciclo de Krebs e do ciclo do glioxilato, as Figuras 2.4 e 2.5 descrevem cada reação com as respectivas enzimas pertencente a cada ciclo, onde se observa a participação das enzimas citrato sintase, aconitase, isocitrato desidrogenase NAD^+- dependente, α-cetoglutarato desidrogenase, succinato sintetase (tiolase), succinato desidrogenase, fumarase, malato desidrogenase, isocitrato liase e malato sintase.

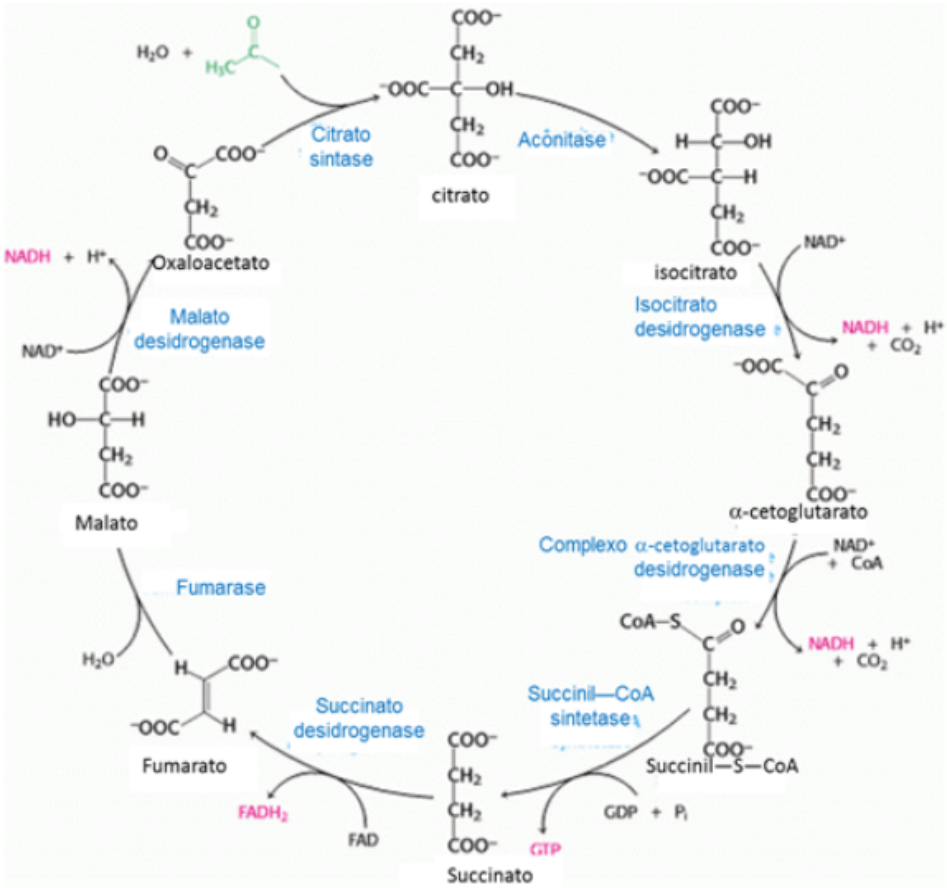

Figura 2.4- Ciclo de Krebs (adaptado de BERG, TYMOCZKO e STRYER, 2010, p.511).

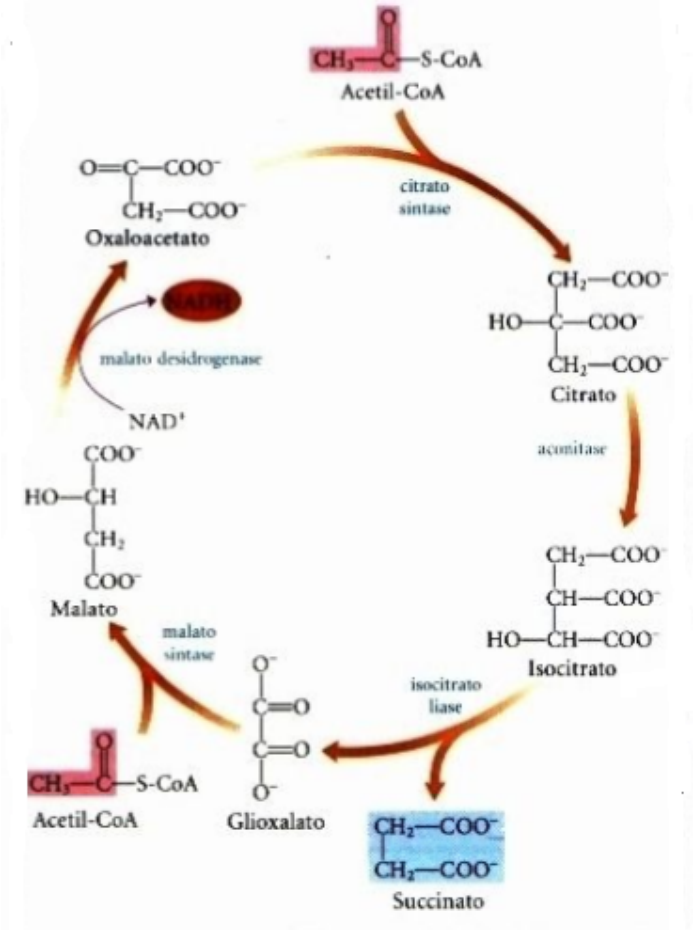

Figura 2.5. Ciclo do Glioxilato (NELSON e COX, 2002, p. 457, terceira parte).

2.4.1 Estudo Proteômico

O proteoma é o conjunto de proteínas expressas em um genoma ou tecido quando uma célula está sujeita a certo estímulo. Enquanto o genoma representa a soma de todos os genes de um indivíduo, o proteoma não é uma característica fixa de um organismo e é alterado com o estado de desenvolvimento da célula ou mesmo sob as condições nas quais o indivíduo se encontra (WILKINS *et al.*, 1996; WILKINS *et al.*, 1997; CIERO e BELLATO, 2002; SPEICHER, 2004). Além disso, pode ser vista como uma metodologia de seleção da biologia molecular, a qual tem como objetivo documentar a distribuição geral de proteínas da célula, identificar e caracterizar proteínas individuais de interesse e principalmente elucidar as suas associações e funções (KOLKMAN *et al.*, 2005).

Sendo assim, a proteômica fundamenta-se em princípios bioquímicos, biofísicos e de bioinformática para quantificar e identificar as proteínas expressas, pois elas se alteram conforme o desenvolvimento de um organismo assim como em resposta aos fatores do ambiente (WILKINS *et al.*, 1996; WILKINS *et al.*, 1997; CIERO e BELLATO, 2002). Portanto, proteômica é o método direto para identificar, quantificar e estudar as modificações

pós-traducionais das proteínas em uma célula, tecido ou mesmo organismos (CIERO e BELLATO, 2002).

A combinação da genética e de dados de uma grande variedade de *omics* (transcriptoma, proteoma, metaboloma) pode potencialmente conduzir a completa compreensão da biologia de um sistema ao nível molecular, sendo definida como biologia de sistemas (KOLKMAN *et al.*, 2005).

2.4.2 Aplicação do estudo proteômico

O estudo proteômico está sendo utilizado em diversas áreas de interesse. Na área da saúde, está sendo aplicado na investigação de marcadores moleculares em determinadas doenças indicando a resposta da célula ou tecido a estresses externos. Através da análise proteômica, pode-se fazer uma comparação do perfil protéico de uma célula cancerosa com uma célula sadia, ou de uma célula cancerosa cujo portador está sob tratamento médico. Outras pesquisas na área da saúde já foram ou estão sendo conduzidas como o proteoma do fígado, do rim e de diferentes organismos, como *Mycobacterium tuberculosis* (agente causador da tuberculose), *Plasmodium falciparum* (agente causador da malária) e *Helycobacter pylori* (agente causador da úlcera e gastrite) (CIERO e BELLATO, 2002).

Na área agronômica, arroz, trigo, cana-de-açúcar, eucalipto entre outras espécies estão sendo abordados no estudo proteômico. Micro-organismos causadores de impacto econômico na agricultura como *Rhizobium spp*, que é o organismo responsável pela fixação de nitrogênio atmosférico às leguminosas e *Xanthomonas spp*, responsável por doenças em citrinos e feijoeiros, estão sendo incluídos no estudo proteômico (CIERO e BELLATO, 2002).

Sickmann *et al.* (2003) realizaram um estudo para determinar o proteoma mitocondrial da levedura *Saccharomyces cerevisiae* com o propósito de estas proteínas servirem como caminho para elucidar doenças relacionadas a mitocôndria. As proteínas foram separadas por vários métodos independentes e analisadas no espectrofotômetro de massas tandem MS. 750 proteínas diferentes foram identificadas, indicando um envolvimento da mitocôndria em vários processos celulares. Todos os componentes conhecidos da via fosforilação oxidativa, do ciclo do ácido tricarboxílico, e as proteínas codificadas da mitocôndria foram encontrados. Com base nas proteínas mitocondriais descritas na literatura, calculou-se que as proteínas identificadas neste estudo representam 90% de todas as proteínas mitocondriais. A função de um quarto das proteínas identificadas ainda é desconhecida. Os autores explicam que o proteoma mitocondrial desta levedura pode fornecer uma base de dados importante para a análise de funções associadas à mitocôndria, podendo servir de base para a identificação das doenças mitocondriais.

Kolkman *et al.* (2006) compararam a resposta de *Saccharomyces cerevisi*ae cultivada em quimiostato em condição de limitação por fonte de carbono (glicose) ou por fonte de nitrogênio (sulfato de amônio) ao nível de proteoma. Um total de 928 proteínas foi

identificado, e seus respectivos pontos isoelétricos, pesos moleculares e localizações subcelulares. Em resposta a limitação por glicose, 51 proteínas foram super-reguladas e em resposta a limitação por sulfato de amônio, 51 proteínas foram super-reguladas. Sob limitação de glicose, as proteínas do ciclo do ácido cítrico (Mdh3p, Idp2p) e envolvidas na fosforilação oxidativa (CYC1p) foram superexpressas. Os genes envolvidos na via β-oxidação de ácidos graxos foram regulados positivamente em condição escassa de glicose. As proteínas envolvidas na fosforilação da glicose (Tpi1p, Tdh2p, Gpm1p, Pdc1p, Pdc5p) foram super-reguladas quando o nitrogênio foi o nutriente limitante. O nível de expressão das enzimas envolvidas na utilização de fontes alternativas de carbono, como ADH2, ACS1 ou MLS1 relacionadas à degradação de compostos como etanol e acetato e SUC2 e CYB2 para a degradação de sacarose e lactato, respectivamente, foi reduzido sob limitação de nitrogênio isto é, em excesso de glicose.

Morín *et al*. (2007) compararam o metabolismo de *Y. lipolytica*, quando cultivada em glicose ou *N*-acetilglicosamina como fontes de carbono para indução do crescimento das células na forma leveduriforme ou na forma de hifa, respectivamente, através do estudo proteômico, utilizando as técnicas eletroforese bidimensional e espectrometria de massa. Eles observaram diferentes níveis de expressão nos *spots* formados nos géis correspondentes às duas morfologias. A análise do gel revelou que, de 600 *spots* de proteínas detectados, 51 *spots* exibiram alterações estatisticamente reprodutíveis durante a transição da forma leveduriforme para hifa. O nível de expressão de duas proteínas aumentou mais que 2 vezes para as células na forma de hifa, 19 *spots* identificaram proteínas que foram sub-expressas para as células na forma de hifa (mais que 2 vezes), 22 *spots* não foram detectados para as células na forma de hifa e 8 *spots* ausentes para células que cresceram na forma leveduriforme. Este estudo mostrou que diferentes condições do processo interferem nos níveis de expressão das enzimas relacionadas ao metabolismo da levedura *Y. lipolytica*.

Morgner *et al.* (2008) desenvolveram uma nova ferramenta de ionização na espectrometria de massa, LILBID, que foi utilizada de forma satisfatória para determinar a massa total e a composição das 40 subunidades do complexo I da cadeia respiratória de *Yarrowia lipolytica*, mostrando ser um método robusto e conveniente para analisar misturas de proteínas complexas.

Guidi *et al*. (2010) realizaram um estudo proteômico para entender a adaptação do metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* durante o crescimento exponencial em três diferentes concentrações de glicose (0,5%, 2% e 20%), induzindo comportamento diáuxico das células da levedura em restrição de glicose. Expressões diferenciais de grupos de proteínas foram precebidas. A taxa de crescimento das células dimuiu durantes a fase inicial da fermentação em concentração elevada de glicose (20%). Em condição de restrição e em elevado teor de glicose, encontrou-se uma super-expressão de uma proteína (peroxirredoxina) envolvida na proteção contra o estresse oxidativo.

Insenser *et al.* (2010) utilizaram duas abordagens proteômicas diferentes para estudar as proteínas da superfície celular de *Saccharomyces cerevisiae*: na primeira abordagem, as proteínas fracamente associadas a componentes estruturais da parede celular foram liberadas através do tratamento das células inteiras com ditiotreitol, separadas por 2D-PAGE e identificadas por espectrometria de massa. Na segunda abordagem, as proteínas expostas à superfície das células (surfome) foram digeridas com tripsina e DTT e analisadas por LC-MS/MS. Noventa e nove proteínas diferentes foram identificadas. Estas proteínas foram classificadas em diferentes processos celulares: controle da organização da parede celular, resgate de células, defesa, virulência, destino de proteínas, síntese de proteínas e metabolismo. As proteínas da parede celular foram identificadas por ambos os protocolos, mas um número maior com a segunda abordagem. No entanto, apenas 20% das proteínas identificadas eram comuns a ambos os protocolos. Logo, para um conhecimento completo do proteoma da superfície da célula, diversas estratégias precisam ser utilizadas.

Andrés-Barrao *et al.* (2012) estudaram a resistência da bactéria ácido acética (BAA) *Acetobacter pasteurianus,* utilizada para a produção industrial de vinagre, à altas concentrações de ácido acético produzido durante a fermentação, através do estudo do proteoma. Neste estudo, utilizou-se 2D-DIGE para comparar o proteoma de *A. pasteurianus* LMG 1262T quando cresce em glucose ou etanol e na presença de ácido acético. Entre os spots de proteínas selecionados, foi observado um total de 53 proteínas diferentes expressas e que foram identificadas por espectrometria de massa MS/MS. O tamanho da BAA foi reduzida em aproximadamente 30% em comprimento, como consequência da acidez.

Franc *et al.* (2012) estudaram a composição de cadeias de N-glicano presentes na enzima recombinante ZmCKO1 (citocinina oxidase/desidrogenase) produzida em *Y. lipolytica* usando a ferramenta proteoma. A espectrometria de massas confirmou o seu caráter para manose e o sequenciamento glicopeptídeo pelo instrumento MALDI-TOF/TOF demostrou N-glicosilação em Asn52, 63, 134, 294, 323 e 338. As cadeias de glicanos contêm 3-14 resíduos de manose. Observou-se que Asn134 é parcialmente glicosilada. Asn338 foi o único local para realizar grandes ligações com glicano, excedendo a 25 resíduos de manose.

Giardina *et al.* (2012) estudaram, através da ferramenta proteoma usando a técnica de espectrometria de massa iTRAQ-labeling, as proteínas envolvidas no metabolismo da levedura *Saccharomyces cerevisiae.* Através dos mapas proteômicos, foram identificadas conhecidas e novas proteínas, que tiveram os seus níveis alterados nas células, quando estas cultivadas em meio contendo baixo teor de glucose foram abastecidas com glicose. As proteínas que foram super-reguladas foram subunidades ribossomais, proteínas envolvidas na tradução da proteína, e da membrana plasmática ATPase e as proteínas sub-reguladas incluem pequenas proteínas de choque térmico, proteínas mitocondriais, enzimas glicolíticas e enzimas gliconeogênicas.

Xiong *et al.* (2014) analisaram o proteoma global da cepa *Neurospora crassa* FGSC 2489 em resposta a seu crescimento em sacarose, Avicel (celulose cristalina) e meio sem fonte de carbono, com o propósito de buscar entendimento sobre os mecanismos regulatórios de transcrição e tradução envolvidos na produção de enzimas lignocelulósicas produzidas por este fungos. Dentro do proteoma de *N. crassa*, foram identificadas aproximadamente 3460 proteínas, das quais 25% (aproximadamente) não tinham sido identificadas e classificadas como "proteínas hipotéticas". A comparação entre o proteoma obtido das células cultivadas em Avicel versus meio isento de carbono revelou que um subconjunto de CAZymes aumentou, provavelmente para iniciar a degradação da celulose.

Através do estudo proteômico, Giardina *et al.* (2014) identificaram proteínas extracelulares (secretoma) quando *Saccharomyces cerevisiae* foi cultivada em meio contendo glicose. 347 proteínas foram identificadas na fração extracelular em meio contendo baixa concentração de glicose, incluindo enzimas metabólicas (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, 3-fosfoglicerato quinase, glicose-6-fosfato desidrogenase, piruvato-descarboxilase), proteínas envolvidas no estresse oxidativo (superóxido dismutase e tioredoxina), proteínas de choque térmico (Ssa1p, Hsc82p e Hsp104p) e proteínas com funções desconhecidas. A maior parte destas proteínas não continha sequências de sinal ER-Golgi típicos. Entretanto, os níveis de muitas destas proteínas extracelulares foram reduzidos quando as células foram transferidas para um meio contendo elevada concentração de glicose. Portanto, este estudo concluiu que o secretoma sofre alterações dinâmicas durante a transição das células de um meio deficiente para um meio rico em glicose e sugere que estas proteínas extracelulares são secretadas por via não clássica, pois a maior parte não contém sequências de sinal ER típicas.

2.4.3 Técnicas Aplicadas ao estudo do proteoma

Os estudos do proteoma têm-se desenvolvido principalmente através da tecnologia eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2DE) em conjunto com a espectrometria de massa.

2.4.3.1 Eletroforese Bidimensional

A técnica mais usada de separação de proteínas é o gel bidimensional (2D) que foi usado pela primeira vez por O´Farrell (1975). Na primeira dimensão as proteínas são separadas de acordo com seus pontos isoelétricos (focalização isoelétrica); e na segunda dimensão as proteínas são separadas com base em seus pesos moleculares. Um passo muito importante para a reprodutividade e resolução dos géis 2D foi dado quando foi introduzido o gradiente imobilizado de pH (IPG), em que o gel com o gradiente de pH fica imobilizado sobre uma fita de plástico. Atualmente, as fitas IPG estão disponíveis comercialmente. Os géis 2D podem ser corados de várias maneiras, sendo as mais comuns a coloração com azul

de Coomassie ou a impregnação com prata. A quantificação pode ser feita através da medida de intensidade da mancha no gel com programas de computador específicos.

Uma vez identificada uma mancha no gel 2D de interesse para estudo, essa mancha pode ser excisada com o gel, a proteína pode ser digerida com tripsina "no gel". A tripsina cliva as ligações peptídicas depois de lisina e arginina gerando assim um conjunto de peptídeos característicos de cada proteína. Estes peptídeos resultantes podem ser identificados através de espectrometria de massas. O resultado da análise é um mapa peptídico ou "*fingerprinting*", expresso em relação as suas razões de m/z (massa/carga), que quando comparado com banco de dados, fornece dados sobre a identificação e modificações pós-traducionais da proteína em questão.

2.4.3.2 Espectrometria de Massas

Apesar de a técnica eletroforese em gel 2D ter sido introduzida há 30 anos, a sua aplicação na área proteômica avançou desde o desenvolvimento de técnicas baseadas em espectrometria de massas, que permitiram a identificação de proteínas de alto rendimento (KOLMAN *et al.*, 2006).

Após a separação das proteínas por eletroforese, o procedimento seguinte consiste na identificação das macromoléculas de interesse. Recentemente, as estratégias no campo de análise proteômica têm sido ajudadas pela espectrometria de massa (MS). A MS permite identificar a proteína através da metodologia denominada "*peptide mass fingerprinting*", que é baseada na digestão da proteína de interesse, que foi recortada do gel, por uma enzima proteolítica (por exemplo, a tripsina) produzindo fragmentos denominados peptídeos. As massas desses peptídeos são então determinadas com grande acuidade (0,1-0,5 Da) por espectrometria de massa. As massas obtidas formam uma espécie de impressão digital ("*peptide mass fingerprinting*") da proteína analisada. *Softwares* especiais permitem comparar o "*peptide mass fingerprinting*" da proteína de interesse e os gerados teoricamente para todas as sequências de proteínas presentes nos bancos de dados. Se a sequência da proteína alvo estiver no banco de dados ela será imediatamente identificada (MANN *et al.*, 1993; PAPPIN, 1997).

Inicialmente a aplicação da MS estava restrita à análise de gases, de substâncias voláteis e de substâncias termicamente estáveis, pois as primeiras técnicas de ionização empregadas (ionização por elétrons e ionização química) são processos nos quais o analito é primeiramente vaporizado e a ionização só ocorre quando a molécula está na fase gasosa. Essa restrição impossibilitava a análise de biomoléculas, como proteínas, carboidratos e lipídeos, as quais não são voláteis e se degradam em alta temperatura de vaporização (KINTER e SCHERMAN, 2000).

Na década de 80, o desenvolvimento de técnicas de ionização mais brandas causou uma revolução na extensão das aplicações de MS. Essas técnicas foram principalmente as de

ionização por *electrospray* – ESI (FENN *et al.*, 1989, 1990) e de ionização e dessorção a laser assistida por matriz – MALDI (KARAS e HILLENKAMP, 1988). O termo “ionização branda” significa que os íons formados possuem baixa energia interna, o que permite a observação de espécies iônicas moleculares com pouca ou nenhuma fragmentação. As técnicas de ionização branda permitiram, portanto, a produção de íons com base em compostos de alta massa molecular e não-voláteis, estendendo a aplicação da MS a todos os tipos de moléculas (FERREIRA *et al.*, 2009).

3 PROPOSTA DE TRABALHO

O objetivo principal desta tese consistiu em verificar a produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, melhorar o rendimento e a produtividade do sistema, adotando diferentes ferramentas.

Objetivos específicos:

1. Avaliação da influência da origem do glicerol bruto gerado no processo de obtenção de biodiesel na produção de ácido cítrico;
2. Avaliação da composição do meio de produção de ácido cítrico através do emprego de duas fontes de nitrogênio diferentes (extrato de lêvedo e sulfato de amônio) e micronutrientes;
3. Verificação da influência de enzimas-chave no metabolismo de ácido cítrico através da adição de inibidor;
4. Estudo do proteoma mitocondrial de *Y. lipolytica* em duas condições experimentais diferentes de forma a investigar o papel de determinadas proteínas na produção de ácido cítrico, visando empregar esta metodologia como ferramenta no aumento da produção de ácido cítrico e obter dados que possibilitem uma futura modelagem metabólica e alteração das vias de produção.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Os componentes dos meios de cultivo utilizados são: peptona bacteriológica e extrato de lêvedo (*Oxoid* - Hampshire, UK), glicose P.A. (Vetec-RJ, Brasil), agar-agar (Vetec – RJ, Brasil), sulfato de amônio e glicerol P.A (Vetec – R.J, Brasil). *Antifoam* 204 foi adquirido em *Sigma-Aldrich CO* (MO, USA) com o propósito de controlar a formação de espuma no meio fermentativo. A matéria-prima utilizada como fonte de glicerol foi gentilmente cedida pelo CENPES, sendo proveniente de uma planta piloto de produção de biodiesel a partir de óleo de soja e metanol via catálise básica. Segundo o CENPES, o pré-tratamento do glicerol bruto foi apenas um processo de adequação do teor de água.

4.2 Equipamentos

Os equipamentos utilizados nos experimentos e nas análises são:

1) Incubador com agitação (shaker) (Tecnal TE – 420);
2) Capela de fluxo laminar BioFlux II 90A;
3) Centrífuga *Eppendorf* modelo *Centrifuge 5804R*;
4) Centrífuga *Fanem* modelo *204-NR*;
5) Ultracentrífuga Beckman Coulter 80K;
6) Rotor Beckman swinging bucket SW 41 Ti;
7) Espectrofotômetro *Bel Photonic* modelo *SP2000-UV*;
8) Espectrofotômetro *Shimadzu* modelo *UV-1800*;
9) Microscópio ótico Nikon Eclipse E200;
10) Biorreator de Bancada (Multigen, New Brunswick Scientific Co., EUA);
11) HPLC (High Pressure Liquid Chromatography), Waters 1525;
12) pHmetro de bancada digital Digimed, modelo DM-22;
13) Deionizador ORG 300 (IDEOXIMA);
14) Citômetro de fluxo Partec modelo Cyflowspace;
15) Sonicador Ultrasonic Cleaner;
16) Fonte para eletroforese digital GSR, 300 STD;
17) Speed Vac (Savant);
18) Espectrômetro de massas do tipo Q/TOF (Quadrupolo/aceleração ortogonal time of flight) com fonte de ionização electrosrpay (ESI) (Waters Corp.)

4.3 Micro-organismo

O micro-organismo utilizado no presente trabalho é uma cepa selvagem de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 (Figura 4.1) selecionada de um estuário no Rio de Janeiro, Brasil (HAEGLER e MENDONÇA-HAEGLER, 1981) e identificada pelo Instituto de Microbiologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

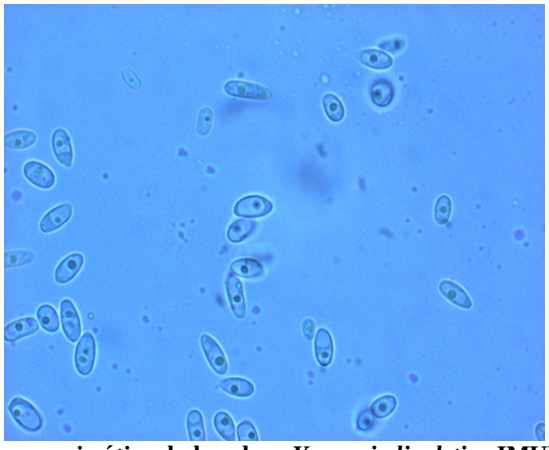

Figura 4.1. Imagem de microscopia ótica da levedura *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 em aumento de 1000x utilizando microscópio ótico Nikon Eclipse E200

4.3.1 Preservação da cultura

As células são conservadas por repiques regulares em tubo de ensaio com meio YPD ("*Yeast Extract*, *Peptone*, *Dextrose*") contendo (em p/v): extrato de lêvedo 1%, peptona 2%, glicose 2% e solidificado com agar 3%. Após incubação a 28 ºC (BARTH e GAILLARDIN, 1997) por 48 horas na estufa, as culturas são refrigeradas a 4ºC por 3 meses.

4.3.2 Obtenção do inóculo

A partir dos tubos contendo as células preservadas em meio sólido YPD (descrito no item 4.3.1) inocula-se, de forma estéril com uma alça de platina, em 200 mL de meio de cultivo YPD em erlenmeyers de 500 mL o qual é incubado em um agitador rotatório a 28ºC, 160 rpm de agitação por 72 h. Após este período, a absorvância (570 nm) de uma amostra desse cultivo é determinada e, em seguida, as células são centrifugadas de forma estéril a 1258 *g* por 5 minutos e ressuspensas, servindo de inóculo dos experimentos que serão descritos nos itens posteriores. O volume centrifugado desse inóculo é suficiente para obter-se a concentração inicial de células desejada em mg de peso seco de células por ml de meio de cultivo (mg p.s.cél/ml).

4.4 Produção Microbiológica de Ácido Cítrico utilizando glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel

4.4.1 Experimentos Preliminares

Os experimentos preliminares foram realizados utilizando água deionizada e meio mineral tamponado, constituído por KH_2PO_4: 12 g/L; Na_2HPO_4 .7H_2O: 22,66 g/L; $MgSO_4$.7 H_2O: 1,5 g/L; $CaCl_2$.2H_2O: 0,2 g/L; $FeCl_3$. 6H_2O: 0,15 g/L; $ZnSO_4$.7 H_2O: 0,02 g/L; $MnSO_4$.H_2O: 0,06 g/L. Estes experimentos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 1 litro contendo 400 mL de meio de cultivo, inoculados com células cultivadas em meio YPD, como descrito no item 4.3.2, em quantidade suficiente para obter uma concentração celular

inicial em mg p.s.cél/mL. Esses meios de cultivo foram incubados em um agitador rotatório (*shaker* Tecnal TE – 420) a 28 ºC e 250 rpm por 100 horas com amostragem diária.

Influência do tipo de glicerol bruto na produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica*:

Da Silva (2010) aperfeiçoou em frascos agitados as concentrações de glicerol P.A., extrato de lêvedo e velocidade de agitação por planejamento experimental a fim de maximizar a produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682, obtendo-se 16,49 g/L de ácido cítrico a partir de um meio de cultivo elaborado com água deionizada e meio mineral tamponado, 30 g/L de glicerol P.A, 0,1705 g/L de extrato de lêvedo à 250 rpm em agitador rotatório (shaker). Para testar a capacidade desta cepa de crescer em glicerol bruto e secretar ácido cítrico no meio de cultivo, Da Silva (2010) substituiu o glicerol PA por glicerol oriundo da indústria de biodiesel, que foi obtido da reação de transesterificação de óleo de soja com etanol, catalisada por NaOH e com 81% de pureza nesta condição experimental, e obteve a produção de 6,75 g/L e 1,58 g/L de ácidos cítrico e isocítrico respectivamente em 94 h de processo.

Portanto, com o propósito de avaliar a influência do tipo de glicerol bruto e, consequentemente, seus resíduos na produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682, neste presente estudo, foi testado o glicerol bruto oriundo da indústria de biodiesel obtido da reação de transesterificação de óleo de soja com metanol, catalisada por KOH com 83% de pureza. Esta condição experimental foi comparada ao resultado obtido por Da Silva (2010). A concentração inicial de células nos meios de produção foi aproximadamente de 1,0 mg p.s.cél/ml.

Influência da concentração de extrato de lêvedo na produção de ácido cítrico utilizando glicerol bruto como fonte de carbono por *Y. lipolytica*:

Ensaios foram realizados para testar a influência da concentração de extrato de lêvedo, fixando a concentração de glicerol bruto (obtido da reação de transesterificação de óleo de soja com metanol, catalisada por KOH com 83% de pureza) e variando a concentração inicial de extrato de lêvedo em 0,05 g/L, 0,1 g/L, 0,1705 g/L e 0,241 g/L. A concentração do glicerol no início do experimento foi ajustada para 30 g/L a partir do cálculo de pureza. A concentração inicial de células nos meios de produção foi aproximadamente de 1,0 mg p.s.cél/mL.

Influência da presença de sulfato de amônio no meio de cultivo na produção de ácido cítrico utilizando glicerol bruto como fonte de carbono por *Y. lipolytica*:

Para avaliar a influência da presença de sulfato de amônio no metabolismo de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 e produção de ácido cítrico, um teste foi realizado acrescentando 0,7 g/L de sulfato de amônio ao meio de cultivo na condição descrita por Da Silva (2010). O

glicerol bruto utilizado neste ensaio experimental foi obtido da transesterificação de óleo de soja com metanol, catalisado com o KOH**.** A concentração do glicerol no início do experimento foi ajustada para 30 g/L a partir do cálculo de pureza. A concentração inicial de células neste meio de produção foi aproximadamente de 1,0 mg p.s.cél/mL.

Influência da concentração de Ferro e Manganês no meio de cultivo na produção de ácido cítrico utilizando glicerol bruto como fonte de carbono por *Y. lipolytica*:

Para investigar a influência dos metais ferro e manganês na produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica*, a concentração destes íons, já presentes no meio mineral tamponado, foram reduzidas, sendo propostas as seguintes condições experimentais: fixou-se a concentração do sal cloreto férrico ($FeCl_3$) em 0,03 g/L para testar a influência do íon manganês ($MnSO_4.H_2O$) na produção de ácido cítrico, nos níveis 0,01 e 0,005 g/L. Os meios de cultivo foram preparados com 45 g/L de glicerol bruto (rota metílica), 0,1 g/L de extrato de lêvedo e os componentes do meio mineral tamponado. A concentração inicial de células nos meios de produção foi de 2,0 mg p.s.cél/mL.

4.4.2 Experimentos em Biorreator

Um biorreator de bancada (*Multigen, New Brunswick Scientific Co.,* EUA) com capacidade nominal de 2 L e 1,5 L de volume de trabalho foi utilizado. O equipamento possui sistema de aeração, agitação magnética, controle de temperatura e é provido de duas chicanas e duas turbinas do tipo *Rushton* com 6 pás retas verticais, como mostram as Figuras 4.2 e 4.3. O suprimento de oxigênio foi realizado com ar atmosférico com auxílio de um sistema de aeração submerso através de 12 orifícios na haste de agitação com 7 mm de diâmetro localizados a 1,82 cm de distância do fundo do biorreator. Antes de entrar no biorreator, o ar atravessou dois filtros (*Advantec, Toyo Roshi Kaisha,* Japão) com porosidade de 0,2 µm, para evitar possíveis contaminações. Uma sonda polarográfica de oxigênio (Lutron DO-5510, *Lutron Electronics Co., Inc*) foi utilizada para medição da concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultivo presente no biorreator. Através do uso desse aparelho, também foi possível verificar a temperatura em que se encontrava o meio de cultivo, atestando os valores que foram programados no biorreator. A solução eletrolítica foi trocada e a sonda calibrada a cada experimento.

Figura 4.2. Foto do Biorreator de bancada (Multigen, New Brunswick Scientific Co., EUA) com capacidade de 2 L

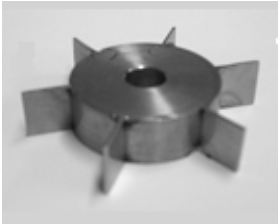

Figura 4.3. Tipo de impelidor utilizado: turbina tipo *Rushton* com pás retas verticais

Os experimentos de produção de ácido cítrico no biorreator foram realizados com glicerol bruto (obtido da reação de transesterificação de óleo de soja com metanol, catalisada por KOH com 83% de pureza), 0,1 g/L de extrato de levedura e ausência de sulfato de amônio. As concentrações dos sais $FeCl_3$ e $MnSO_4.H_2O$ foram mantidas iguais a 0,09 e 0,06 g/L, respectivamente (concentrações originais do meio mineral tamponado) e a concentração do glicerol no início do experimento foi ajustada para 30 g/L a partir do cálculo de pureza. O inóculo foi realizado com células cultivadas em meio YPD como descrito no item 4.3.2 e a concentração inicial de células nestes meios de produção foi aproximadamente de 1,0 mg p.s.cél/mL. O ensaio foi incubado à 28ºC (BARTH e GAILLARDIN, 1997) e a taxa de aeração fixada em 1,0 vvm. Esses experimentos foram realizados por 94 horas com amostragem diária.

<u>Influência da agitação</u>

Um estudo foi realizado com o objetivo de verificar a influência da velocidade de agitação nas variáveis de cultivo estudadas: crescimento celular, consumo de substrato e produção dos ácidos cítrico e isocítrico. As velocidades de agitação testadas foram: 350, 450, 550 e 650 rpm.

4.5. Influência de sesamol na produção de ácido cítrico

Para investigar a influência do reagente sesamol como inibidor de uma das enzimas chaves (enzima málica) da via de produção de lipídeo e, consequentemente, com o propósito de aumentar a produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* cultivada em glicerol PA, foram utilizados o meio descrito por Da Silva (2010) como experimento controle e esta mesma composição de meio suplementada com 1,5 mM de sesamol.

Os experimentos foram realizados em erlenmeyer de 1000 mL contendo 400 mL de meio a 28 °C e 250 rpm durante 170 horas. A concentração inicial de células foi cerca de 1,0 mg p.s.cél/mL. Foram retiradas amostras diariamente para acompanhar o acúmulo de lipídeos, a concentração de ácidos orgânicos, pH e concentração celular.

4.6 Amostragem

Em todos os experimentos realizados para produção de ácido cítrico foi realizada uma amostragem por dia durante o cultivo. O procedimento consiste em retirar duas alíquotas do meio de produção: uma para a obtenção da concentração celular e a outra alíquota (5 mL) é centrifugada a 1258 g durante 5 minutos e o sobrenadante congelado (-4 ºC) para posterior análise de ácido cítrico, ácido isocítrico e determinação do pH.

4.7 Esterilização de meios de cultura e instrumentos

Os meios sintéticos foram esterilizados em autoclave a 0,5 atm por 15 min. O biorreator, as pipetas, os tubos de centrífuga e outros instrumentos utilizados no manuseio do meio de cultivo foram esterilizados em autoclave a 1 atm por 20 min. O eletrodo de oxigênio passou por processo de assepsia à parte, mergulhando-o em uma solução de álcool etílico 70% (v/v) por 30 min.

4.8 Métodos Analíticos

4.8.1 Quantificação da concentração celular

A concentração celular foi acompanhada por medidas de densidade óptica a 570 nm e esses valores convertidos para mg p.s.cél/mL usando-se um fator de conversão previamente determinado em curva de peso seco. A curva de peso seco foi obtida através de uma suspensão de células em solução salina (água destilada com 0,9% (p/v) de NaCl). Desta suspensão, retirou-se uma amostra (10 mL), que foi filtrada em papel de filtro Millipore (0,45 µm), seca em luz de infravermelho por 30 minutos e, em seguida, pesada. Da mesma suspensão foram feitas diferentes diluições de modo a se obter concentrações celulares distintas. Em seguida, mediu-se o valor de absorvância em espectrofotômetro para cada concentração. Esses valores foram colocados em um gráfico para obtenção da curva de peso seco, conforme é apresentado na Figura 4.4.

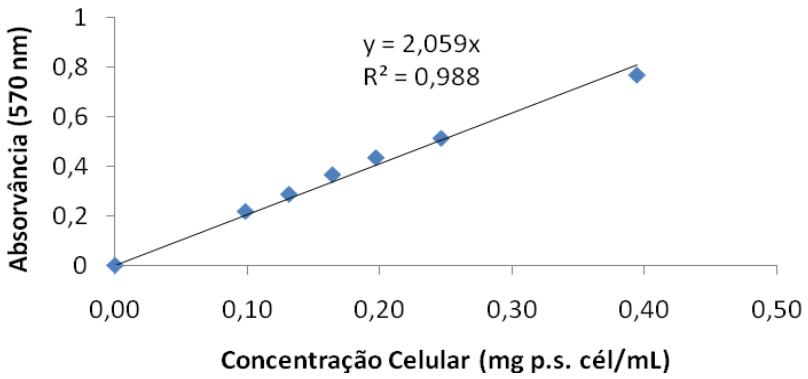

Figura 4.4. Curva de peso seco para quantificação da concentração celular de *Yarrowia lipolytica* através de medidas de absorvância em espectrofotômetro *Shimadzu* modelo *UV-1800*.

4.8.2 Quantificação de ácidos orgânicos

A determinação de ácidos orgânicos foi realizada em cromatógrafo de fase líquida de alta eficiência (*High Pressure Liquid Chromatography*, HPLC, Waters 1525) com sistema de dupla bomba e um detector ultra violeta com lâmpada de zinco a 214 nm. A coluna analítica utilizada é de polímero de octadecilsilano (YMC-Pack ODSAQ,S-5 µm, 12nm). A fase móvel consiste em 10 % de solução metanol (70 %) e 90 % de uma solução tampão KH_2PO_4 (pH 2,45), ambos previamente desgaseificadas em banho de ultrasom (Sonicador Ultrasonic Cleaner).

O procedimento consistiu em injetar a amostra previamente filtrada por membrana de 0,45 µm de porosidade na coluna, que foi arrastada a uma vazão de 0,5 m/min. A temperatura da coluna foi mantida constante e igual a 35 ºC em forno. Os resultados foram registrados em cromatograma gerado pelo software cromatográfico *Breeze* e a quantificação das concentrações dos ácidos presentes nas amostras foi realizada através de curvas analíticas feitas através de soluções com padrões dos ácidos cítrico e isocítrico (Figura 4.5).

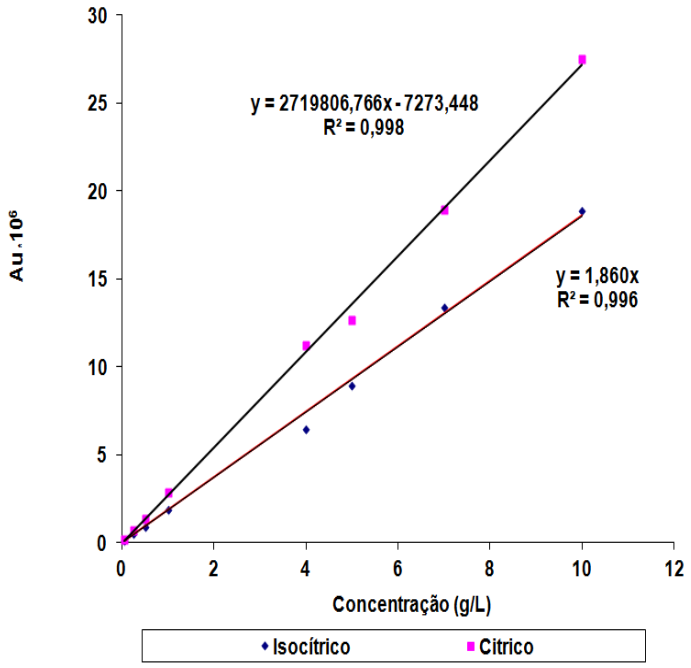

Figura 4.5. Curva padrão para quantificação dos ácidos cítrico e isocítrico

4.8.3 Quantificação do substrato glicerol

A quantificação de glicerol foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Waters®). Para realização desta análise utilizou-se coluna *Aminex*® HPX- 87H, 300 x 7,8 mm (*Bio-Rad Laboratories Ltd*) acoplada a uma pré-coluna trocadora de cátions (*Bio-Rad Laboratories Ltd*), detector de índice de refração (Waters 2414), bomba binária (Waters 1525), forno e módulo controlador de temperatura (Waters) e software cromatográfico *Breeze*. A fase móvel utilizada foi H_2SO_4 5mM com vazão de 0,8mL/min, e a temperatura da coluna mantida a 60 °C. As amostras foram filtradas em membrana (Waters) com diâmetro de 0,45 µm e injetadas para a quantificação através do uso da curva padrão (Figura 4.6).

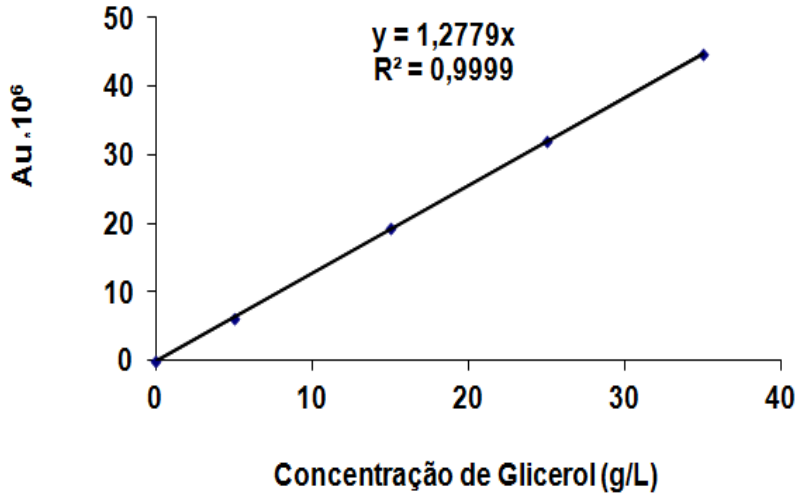

Figura 4.6. Curva padrão para quantificação de glicerol

4.8.4 Determinação de lipídeo intracelular por citometria de fluxo

A quantidade de lipídeos totais foi avaliada através do detector de fluorescência laranja FL2 (utilizado para analisar lipídeos neutros) e do detector de fluorescência vermelha FL3 (utilizado para analisar lipídeos polares) do citômetro de fluxo Partec modelo Cyflowspace equipado com laser de 488 nm. Esta avaliação só é permitida quando a análise é realizada em associação ao fluorocromo *Nile Red* (NR). NR emite fluorescência a 580 e 610 nm quando dissolvido em lipídeos neutros e polares, respectivamente. A análise citométrica foi efetuada segundo protocolo descrito por Martins (2013). A concentração de cada amostra foi ajustada por diluição com água Milli-Q para obtenção de concentração celular dentro da faixa de linearidade definida por Martins (2013). A análise dos citogramas foi realizada utilizando o software FlowMax 2009 versão 2.7.

4.8.5 Correlação entre fluorescência emitida de células coradas com (*Nile Red*) NR e o teor de lipídeos

Martins (2013) realizou uma correlação entre a fluorescência emitida por células coradas com Nile red (NR) e o teor de lipídeos, que foram determinados por cromatografia gasosa. A Figura 4.7 apresenta a correlação entre fluorescência do NR medida através do citômetro de fluxo e o teor de lipídeos por CG. Os dados apresentaram um coeficiente de correlação de 0,9929 representados pela equação: y = 137,13x – 391,45.

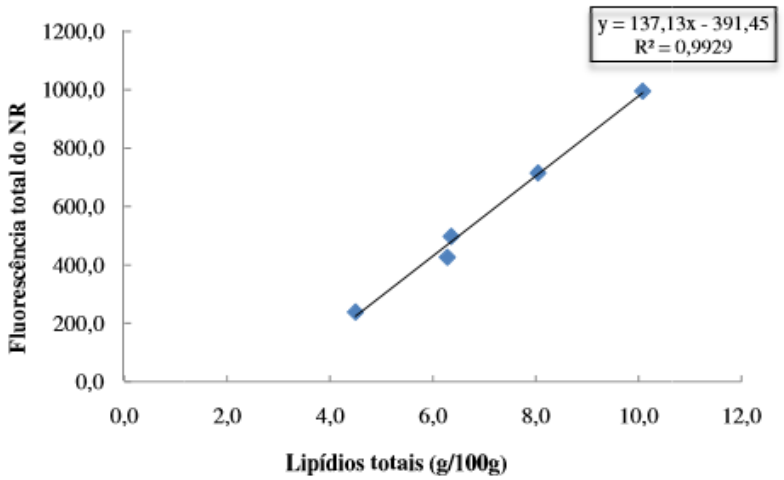

Figura 4.7. Correlação entre fluorescência emitida por células coradas com Nile Red (lipídeos neutros – FL2 e lipídeos polares – FL3) e o teor de lipídeos totais obtidos por reação de transesterificação seguida de Cromatografia Gasosa (MARTINS, 2013).

A curva padrão estabelecida por Martins (2013) e mostrada na Figura 4.7 foi utilizada no presente trabalho para quantificar a produção de lipídeo nos experimentos realizados na condição definida por Da Silva (2010) na ausência e presença de 1,5 mM de sesamol.

4.8.6 Determinação de pH

O pH das amostras livres de células dos experimentos foi determinado utilizando-se um pHmetro da marca Digimed, modelo DM-22, previamente calibrado com tampões padrão 7,0 e 4,0 na temperatura ambiente (25 °C).

4.8.7 Isolamento de Mitocôndria da levedura *Yarrowia lipolytica*

A melhor condição experimental descrita por Da Silva (2010) foi utilizada para o cultivo de células de *Y. lipolytica*, que foram coletadas para o estudo do proteoma mitocondrial. Neste cultivo, foi utilizado o glicerol PA.

Como estudo controle, *Yarrowia lipolytica* foi cultivada em YPG, contendo (em p/v): 3% de glicerol PA, 1% de extrato de lêvedo e 2% de peptona. Este experimento foi cultivado por 46 h. Neste meio, a cepa não apresentou capacidade de produzir ácido cítrico.

Para ambos os experimentos, foi utilizado um volume total de 4 L de meio de cultivo para obtenção de células. O estudo do proteoma foi feito com todas as proteínas presentes na mitocôndria, inclusive as enzimas participantes do ciclo de Krebs. Portanto, foi realizado o isolamento da organela mitocôndria primeiramente para posterior estudo do proteoma mitocondrial.

O isolamento da mitocôndria foi realizado como descrito em Meisinger *et al.* (2005) com algumas modifcações. Os reagentes utilizados no isolamento da mitocôndria estão discrimados na Tabela 4.1:

Tabela 4.1 - Composição dos reagentes utilizados no isolamento de mitocôndria da levedura *Yarrowia lipolytica*

Tampão DTT	100mM de Tris-H_2SO_4, pH 9,4, 10 mM de ditiotreitol(DTT), pré-aquecido a 30ºC
Tampão Zymolyase	1,2 M de sorbitol e 20 mM de tampão fosfato de potássio, pH 7,4
Enzima	Zymolyase-20T
Tampão de homogeneização	0,6 M de sorbitol, 10 mM de Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM de ácido etilenodiaminatetracético (EDTA), 1 mM de fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF), 0,2% (p/v) de BSA
Tampão SEM	250 mM de sacarose, 1 mM de EDTA, 10 mM de MOPS-KOH, pH 7,2
Tampão EM	1 mM de EDTA, 10 mM de MOPS-KOH, pH 7,2

Formação de esferoplasto

Com um volume total de 4 L de meio de cultivo, os seguintes passos foram seguidos:

1. Centrifugaram-se as células a 3.000 g por 5 minutos e descartou-se o sobrenadante. As células depositadas foram lavadas com água destilada. Centrifugou-se a 3.000 g por 5 minutos e descartou-se o sobrenadante. Então, a massa úmida das células foi determinada;
2. A massa de células foi resuspensa em tampão DTT pré-aquecido (2mL/g de massa úmida de células) e submetida a agitação de 80 rpm por 20 minutos;
3. A suspensão da etapa 2 foi centrifugada a 3.000*g* por 5 min e a massa formada foi resuspensa em tampão Zymolyase (7 mL/g de massa úmida de células determinada na etapa 2);
4. As células foram centrifugadas como na etapa 3 e resuspensas em tampão Zymolyase (7 mL/g de massa úmida) contendo 10 mg da enzima Zymolyase-20T por grama de massa úmida de células. A suspensão foi agitada a 100 rpm a 30ºC por 45 min;
5. As células foram separadas por centrifugação a 3.000*g* por 5 min e lavadas com tampão Zymolyase (7 mL/g de massa úmida de células).

Rompimento da Membrana celular pelo Método de Homogeneização

Todo o procedimento para isolamento da mitocôndria do esferoplasto foi realizado a 4 ºC e as soluções necessárias nestas etapas e a centrífuga foram mantidas nesta temperatura. As seguintes etapas foram seguidas para promover o rompimento da membrana celular:

1. A suspensão obtida na etapa 5 descrita no item **Formação de Esferoplasto** foi centrifugada a 3.000*g* por 5 min e o precipitado formado foi ressolubilizado em tampão de

homogeneização (6,5 mL/g de massa úmida de células). O material lisado foi mantido a 4ºC para evitar proteólise;

2. Os esferoplastos foram homogeneizados com 15 strokes com auxílio de um potter (homogeneizador de vidro) em gelo. Após a homogeneização, a amostra foi diluída 2 vezes com tampão de homogeneização;

3. O material homogeneizado foi centrifugado a 1.500*g* por 5 min para separar o debris e núcleo. O sobrenadante foi coletado;

4. Centrifugou-se o sobrenadante a 4.000*g* por 5 min. O precipitado foi descartado;

5. A fração mitocondrial bruta foi isolada por centrifugação do sobrenadante obtido na etapa 4 a 12.000*g* por 15 min;

6. A fração mitocondrial bruta obtida na etapa 5 foi recontituída com tampão SEM.

Para a verificação do rompimento da parede celular foi realizada análise morfológica por microscopia óptica das células rompidas.

Purificação da fração mitocondrial em um gradiente de densidade com Sacarose

A suspensão da fração mitocondrial obtida na etapa 6 no método de homogeneização foi mantida em gelo até iniciar a purificação, que foi realizada por um gradiente de densidade com sacarose.

1. Preparou-se 8,5 mL de gradiente de densidade com uma camada inferior de 1,5 mL com 60% (p/v) de sacarose dissolvida em tampão EM; uma segunda camada de 4 mL de 32% (p/v) de sacarose dissolvido em tampão EM; 1,5 mL de 23% (p/v) de sacarose dissolvido em tampão EM e uma camada superior de 1,5 mL de 15% (p/v) de sacarose dissolvido em tampão EM;

2. A concentração de proteína da suspensão mitocondrial foi ajustada para 5 mg/mL com tampão SEM e tratada com 10 strokes em um potter;

3. O topo do gradiente de sacarose foi carregado com a amostra obtida na etapa 2 (0,2-1 mL) e centrifugado a 134.000*g* por 1 h a 2 ºC;

4. A mitocôndria purificada foi recuperada com auxílio de pipeta Pasteur da interface 60%/32% do gradiente de sacarose;

5. A mitocôndria foi diluída com 2 volumes de tampão SEM e centrifugada a 10.000 *g* a 2 ºC por 15 min. O pellet mitocondrial formado foi resuspenso em tampão SEM e a concentração de proteína ajustada para 5-10 mg/mL com SEM;

6. A amostra foi rapidamente congelada em nitrogênio líquido e armazenada a -50 ºC.

4.8.8 Quantificação de Proteína

Após a fração mitocondrial ser reconstituída no reagente de extração de proteína tipo 4 da Sigma-Aldrich, que contém uréia, tiouréia, Trizma® e detergente C7BzO, a concentração de proteína foi determinada utilizando o método de TCA-Lowry.

As proteínas da amostra foram precipitadas por adição de 6,1 N de ácido tricloroacético (TCA) para uma concentração final de 8-10%(p/v) e centrifugadas a 12.000 *g* por 10 min a 4 ºC. O pellet formado foi lavado com 10% de TCA e dissolvido em 0,1 N de NaOH. Posteriormente, a concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry (1951).

Os reagentes da quantificação de proteína reportada por Lowry (1951) são: **REAGENTE A:** 1 mL de $CuSO_4$ 1% (p/v); 1 ml de solução de tartarato duplo de Na^+ e K^+ 2% (p/v) e completar com solução de $NaCO_3$ 2% em NaOH (0,1 N) até 100 mL. **REAGENTE B:** Solução de Folin-Ciocalteau diluída 2 vezes em água destilada.

A determinação de proteína foi realizada com 0,370 mL da amostra (ou água destilada no caso do branco) com 1,480 mL de Reagente A. Deixou-se 10 minutos na temperatura ambiente e no escuro e, em seguida, adicionou-se 0,148 mL do Reagente B. Depois de 30 minutos na temperatura ambiente e no escuro foi feita a leitura em espectrofotômetro a 660 nm. A curva padrão foi feita com diferentes diluições de uma solução de albumina de soro bovino (BSA) com concentração inicial de 0,1 mg/mL.

4.8.9 Estudo do Proteoma Mitocondrial de *Yarrowia lipolytica*

4.8.9.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-page)

O extrato protéico, que foi obtido quando a fração mitocondrial foi ressuspensa no reagente de extração de proteína tipo 4 (Sigma-Aldrich, que contém uréia, tiouréia, Trizma® e detergente C7BzO), foi adicionado de tampão de ruptura (glicerol 20%, β-mercaptoetanol 10%, SDS 4%, Tris-HCl pH 6,8 0,125 M) e a amostra foi aquecida a 100 ^oC por 5min. O gel de 12 % de SDS-poliacrilamida com 0,75 mm de espessura foi submetido a uma corrente de 30 mA, com voltagem constante. Após a corrida, o gel foi corado em uma solução coloidal de azul de Coomassie contendo Coomassie Brilliant Blue 0,25%, metanol 45,4% e ácido acético 9% "overnight" (OAKLEY *et al.*, 1980; SHAPIRO *et al.*, 1967) e, posteriormente, foi descorado em solução contendo metanol 43% e ácido acético 7,5%. Marcadores de peso molecular de proteína conhecido (14.400 a 97000 Da) da *GE Healthcare* foram utilizados como padrão.

4.8.9.2 Aquisição de Imagens

As imagens dos géis foram obtidas utilizando um scanner com um programa Image Master 2D Platinum (Ameshan Biosciences, versão 5.0).

4.8.9.3 Espectrometria de Massa

Após a separação em gel, os spots de interesse foram incisados. As proteínas foram reduzidas, alquiladas e digeridas com tripsina de acordo com método disponível na literatura (HELLMAN *et al.*, 1995).

Hidrólise em Gel

A digestão das proteínas foi feita de acordo com o método de Hellman *et al.* (1995). As bandas foram selecionadas, cortadas em pedaços de 1 mm^3, totalmente descoradas em solução de bicarbonato de amônio a 50 mM (NH_4HCO_3)/acetonitrila (ACN) (1:1) em pelo menos 3 lavagens de 30 minutos. Logo após, as pontes dissulfeto foram reduzidas adicionando 100 µL de DTT 10 mM em solução de NH_4HCO_3 25 mM, por 1 hora, a 56 °C. Após esse período, a solução DTT foi retirada por aspiração e lavada 3 vezes com a solução de NH_4HCO_3 25 mM. Em seguida, foram alquilados os resíduos de cisteína com 100 µL de iodoacetamida 50 mM em solução de NH_4HCO_3 25 mM, por 30 minutos, à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após esse tempo, a solução de iodoacetamida foi removida por aspiração. As bandas foram lavadas com 200 µL de NH_4HCO_3 25 mM, por agitação no vórtex e, posteriormente, a solução de NH_4HCO_3 foi removida. As bandas foram então desidratadas com ACN 100% por 5 minutos. O solvente remanescente foi removido dos pedaços de gel em concentrador de amostra Speed Vac (Savant). As proteínas foram rehidratadas no gelo por 15 minutos, em solução de NH_4HCO_3 25mM contendo 15 µg/mL de tripsina grau seqüenciamento modificada (Promega). Pedaços do gel foram cobertos com 20 µL do tampão (25mM NH_4HCO_3/Tripsina) e a digestão realizada em banho 37 °C por 20 h. Em seguida os peptídeos foram extraídos do gel com solução ACN 50%, TFA 5% em água, transferidos para tubo de microcentrífuga e concentrados no Speed Vac (Thermo), para um volume de aproximadamente 5 µL.

Dessalinização dos peptídeos

A dessalinização dos peptídeos foi feita com uma coluna de fase reversa com 0,6 µg de resinas de C18 em ponteiras de 10 µL denominado ZipTips (Millipore). Inicialmente o Ziptip foi equilibrado com uma solução de ACN 100% e lavado 3 vezes com água padrão HPLC. Em seguida, a amostra foi carregada na coluna, aspirando 10 vezes a solução com os peptídeos sem desprezá-las. Uma segunda lavagem foi feita e, posteriormente, os peptídeos foram eluídos da coluna com 10 µL da solução de ACN 50% e secados no Speed Vac. Os peptídeos foram reconstituídos com 20 µL da solução de ácido fórmico 1%.

Análise dos peptídeos por Nano-LC-ESI-Q/TOF:

Os peptídeos provenientes das bandas dos géis 1D foram analisados no espectrômetro de massas do tipo ESI-Q/TOF (WatersCorp.) acoplado a um sistema de cromatografia nanoACQUITYUPLC® (Waters Corp.). Foram injetados 7,5 µL da amostra na coluna 2G trap Symmetry C18 (Waters Corp.). A cromatografia líquida foi feita usando uma coluna BEH C18 100 mm x 100 µm (WatersCorp.) com fluxo constante de 0,5 µL/min sob um gradiente linear (10 a 50%) de acetonitrila contendo 0,1% ácido fórmico associado a um espectrômetro de massas do tipo Q/TOF (Quadrupolo/aceleração ortogonal time of flight) com fonte de ionização electrosrpay (ESI) (Waters Corp.) da Unidade de Espectrometria de Massas e Proteômica, CCS da UFRJ.

As análises feitas no espectrômetro de massas foram realizadas no modo positivo. Os parâmetros de aquisição do espectrômetro de massas foram: voltagem do cone 30 V, voltagem capilar 3500V, temperatura da fonte 80 °C, varredura (modo MS) 400 – 2000 (m/z) e varredura (modo MS/MS) 50 – 2000 (m/z). O equipamento foi operado no modo DDA (Data Dependent Analysis or Acquistion) selecionando automaticamente os peptídeos de acordo com a intensidade (os três íons mais intensos) e as cargas +2, +3 e +4, para a fragmentação do tipo MS/MS. A fragmentação dos íons foi realizada pelo processo de dissociação induzida por colisão (CID) através da utilização do argônio, gás inerte, para colisão. A aquisição dos dados foi realizada utilizando o programa MassLynx 4.0 (Micromass/Waters) e todos os dados foram processados usando o servidor ProteinLynx Global (PLGS - versão 2.5.1, Waters). (HIGA *et al.*, 2008; BICUDO, 2007).

Após a etapa de espectrometria de massas, as proteínas foram identificadas a partir dos espectros dos fragmentos (MS/MS) de seus peptídeos utilizando a ferramenta de busca Mascot Search – MS/MS ion search (Website: www.matrixscience.com) utilizando como banco de dados do NCBInr. Os parâmetros de busca utilizados foram: Tipo de pesquisa: MS/MS Ion Search; Enzima: tripsina; modificações fixas: Carbamidometilação das cisteínas; modificações variáveis: oxidação das metioninas; valores de massa: monoisotópico; Massa de proteína: Irrestrito; Tolerância de massa dos peptideos: ± 0,2 Da; Tolerância de massa do fragmento: ± 0,2 Da; máximo clivagens esquecidas: 1; tipo de Instrumento: ESI-QUAD-TOF.

4.9 Determinação dos rendimentos, produtividade e Razão Ácido Cítrico:Isocítrico

Para comparação entre todos os ensaios, parâmetros da produção, como rendimentos, produtividade volumétrica de ácido cítrico (Q_{AC}) e razão entre a produção de ácido cítrico (P_{AC}) e de isocítrico (P_{AIC}) foram determinados. Seguem as equações utilizadas no cálculo destes parâmetros.

$$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f} \qquad Y_{X/S} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f}$$

$$Y_{P/X} = \frac{P_f - P_0}{X_f - X_0} \qquad R_{AC/AIC} = \frac{P_{AC}}{P_{AIC}}$$

$$Q_{AC} = \frac{massadeproduto}{t_f * V_{mosto}}$$

Sendo:

P_f: concentração final de ácido cítrico em um determinado tempo t_f (g/L);

P_0: concentração inicial de ácido cítrico no tempo t igual a zero (g/L);

S_f: concentração do substrato glicerol no tempo t_f de fermentação (g/L);

S_0: concentração inicial do substrato glicerol no tempo t igual a zero (g/L);

t_f: tempo de fermentação (h);

X_f : concentração celular no tempo t_f de fermentação (g/L);

X_0 : concentração celular inicial no tempo t igual a zero (g/L);

V_{mosto}: volume do meio de cultivo utilizado durante o processo biotecnológico (L);

$Y_{P/S}$: fator de rendimento de ácido cítrico em relação ao consumo de glicerol (g/g);

$Y_{X/S}$: fator de rendimento de células em relação ao consumo de glicerol (g/g);

$Y_{P/X}$: fator de rendimento de ácido cítrico em relação à biomassa formada (g/g);

$R_{AC/AIC}$: razão entre as concentrações de ácido cítrico (P_{AC}) e isocítrico (P_{AIC}) no tempo t_f de fermentação;

Q_{AC} : produtividade volumétrica de ácido cítrico obtida no tempo t_f de fermentação (g/L.h).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Experimentos Preliminares

Para avaliar a capacidade da cepa *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 em assimilar glicerol bruto oriundo da indústria de biodiesel e estudar a influência da concentração de extrato de levedura na produção de ácido cítrico, foram realizados experimentos utilizando glicerol bruto obtido da transesterificação de óleo de soja com metanol catalisada por hidróxido de potássio. Em estudos anteriores (DA SILVA, 2010), verificou-se a produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 utilizando glicerol bruto obtido a partir da transesterificação de óleo de soja e etanol, catalisada por hidróxido de sódio. Devido à dificuldade de obtenção desta matéria-prima, optou-se por realizar um novo estudo, utilizando glicerol bruto gerado como subproduto de produção de biodiesel utilizada em escala comercial. Um resultado específico obtido neste presente trabalho foi comparado ao estudo desenvolvido por Da Silva (2010) realizado nas mesmas condições de cultivo, tendo como variável o glicerol bruto obtido de duas diferentes origens. O consumo de glicerol, o crescimento de *Y. lipolytica* e a variação de pH no meio de cultivo nas diferentes concentrações iniciais de extrato de levedura foram acompanhados durante o processo de produção.

5.1.1 Influência da Fonte de Glicerol

Com o propósito de verificar a influência do tipo de glicerol bruto utilizado no meio de cultivo para a produção de ácido cítrico, o estudo realizado neste presente trabalho foi comparado com Da Silva (2010). Nos dois estudos foram utilizados 0,1705 g/L de extrato de levedura, 30 g/L de glicerol em meio mineral tamponado, sendo assim a única variável de comparação foi a origem do glicerol empregado como fonte de carbono. Em Da Silva (2010) utilizou-se glicerol proveniente da transesterificação de óleo de soja com etanol, catalisada por NaOH, com 81% de pureza e no presente trabalho, utilizou-se o glicerol proveniente de reação com KOH como catalisador e metanol como álcool, com 83% de pureza. Pode-se observar, comparando os dados das Figuras 5.1 e 5.2, que para o glicerol da rota etílica catalisada por NaOH, houve maior produção de biomassa, o pH inicial do meio de cultivo foi ligeiramente maior (7,24), porém o valor final foi similar (4,42) em relação ao processo com glicerol da rota metílica catalisada por KOH.

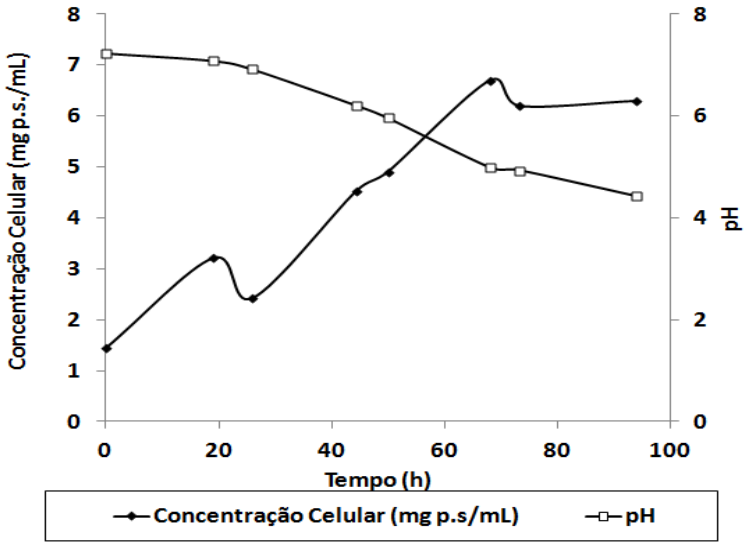

Figura 5.1 - Cinética da concentração celular e do pH da condição experimental: 30 g/L de glicerol bruto obtido da rota etílica, catalisado por NAOH, sem ajuste de massa com a pureza de 81%, 0,1705 g/L de extrato de levedura (g/L), ausência de sulfato de amônio (DA SILVA, 2010) (A linha de cada curva não representa dados experimentais, representa uma tendencia do perfil).

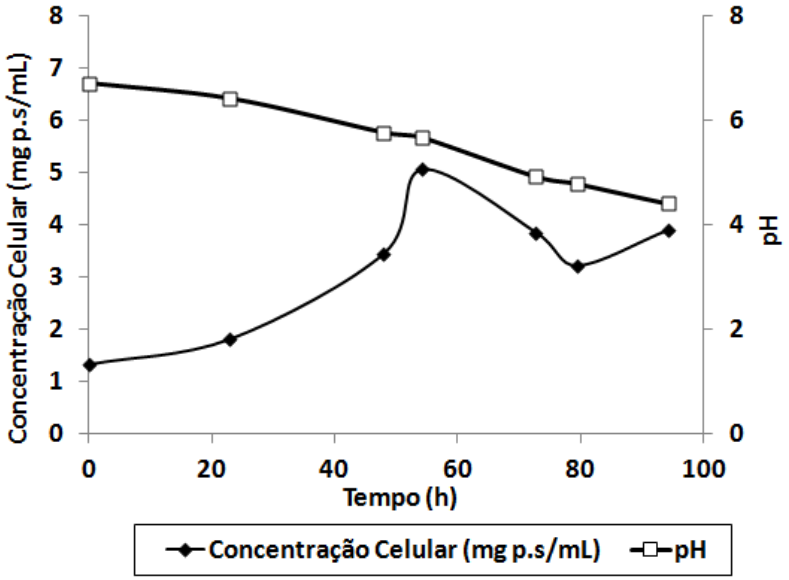

Figura 5.2 - Cinética da concentração celular e do pH da condição experimental: 30 g/L de glicerol bruto obtido da rota metílica, catalisado por KOH, com ajuste de massa com a pureza de 83%, 0,1705 g/L de extrato de levedura (g/L), ausência de sulfato de amônio (A linha de cada curva não representa dados experimentais, representa uma tendencia do perfil).

Conforme a Tabela 5.1, comparando os ensaios empregando glicerol bruto obtido de processos distintos, observou-se que com o glicerol bruto da rota metílica houve uma diminuição na concentração e produtividade volumétrica de ácido cítrico e aumento na produção de ácido isocítrico de 1,58 para 9,58 g/L, reduzindo a razão mássica entre o ácido cítrico e o ácido isocítrico ($R_{AC/ISC}$) de 4,27 para 0,45, em relação ao glicerol bruto da rota

etílica, mostrando que a natureza do glicerol bruto influencia na quantidade de ácido isocítrico obtida. A soma dos dois ácidos foi menor com glicerol de rota etílica, uma vez que a produção de ácido isocítrico foi muito inferior à concentração obtida por glicerol de rota metílica, catalisada por KOH.

Segundo Soccol *et al.* (2006), a produção de ácido cítrico por *A. niger* é aumentada quando álcool inferior é adicionado ao meio de cultivo composto por carboidrato. Metanol, etanol, *n*-propanol, isopropanol ou metilacetato neutralizam o efeito negativo dos metais na produção de ácido cítrico por *A. niger*. Contudo, a quantidade ótima de metanol e etanol depende da estirpe e da composição do meio (INGRAM e BUTTKE, 1984). Ingram e Buttke (1984) mostraram que alcoóis estimulam a produção de ácido cítrico, pois afetam o crescimento celular e a esporulação ou modificam a composição lipídica da parede celular.

Comparando os dois testes realizados com diferentes fontes de glicerol bruto no presente estudo, a produção de ácido cítrico foi maior com o glicerol originado da rota etílica, com o qual também houve maior estímulo do crescimento celular e a produção de ácido isocítrico foi obtida em maior concentração na presença de glicerol gerado por rota metílica. As justificativas para a produção elevada de ácido isocítrico nesta condição seria a presença dos resíduos metanol e KOH, que pode ter aumentado a atividade da enzima aconitase e/ou reduzido a atividade das enzimas seguintes no ciclo do ácido cítrico. Este estudo mostrou que a quantidade de ácido cítrico obtida por *Yarrowia lipolytica* glicerol bruto é influenciada pelo processo de obtenção do biodiesel pelo qual o glicerol bruto foi gerado.

Tabela 5.1 - Parâmetros de produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica* na presença de 30 g/L de glicerol bruto, 0,1705 g/L de extrato de lêvedo e na ausência de sulfato de amônio

Glicerol utilizado	$Y_{P/S}$ (g/g)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/X}$ (g/g)	P_{AC} (g/L)	P_{AIC} (g/L)	$R_{AC/AIC}$	Q_{AC} (g/L.h)
Rota Etílica + NaOH[a]	0,23[#]	0,16[#]	1,39	6,75	1,58	4,27	0,07
Rota Metílica + KOH[b]	0,26	0,16	1,69	4,35	9,58	0,45	0,05

[a]Glicerol proveniente de óleo de soja e etanol, catalisado por NaOH na ausência de sulfato de amônio, sem ajuste de massa com a pureza (81% de pureza); [b]Glicerol proveniente de óleo de soja e metanol, catalisado por KOH na ausência de sulfato de amônio, com ajuste de massa com a pureza (83% de pureza); $Y_{P/S}$: fator de rendimento de ácido cítrico em relação ao consumo de glicerol (g/g) no ponto de máxima concentração de ácido cítrico; $Y_{X/S}$: fator de rendimento de células em relação ao consumo de glicerol (g/g) no ponto de máxima concentração de ácido cítrico; $Y_{P/X}$: fator de rendimento de ácido cítrico em relação à biomassa formada (g/g) no ponto de máxima concentração de ácido cítrico; [#] $Y_{P/S}$ e $Y_{X/S}$ calculados em relação à concentração inicial de glicerol sem ajuste da massa com a pureza; P_{AC}: concentração máxima de ácido cítrico (g/L); P_{AIC}: concentração de ácido isocítrico (g/L) no ponto de máxima concentração de ácido cítrico; $R_{AC/AIC}$: razão entre as concentrações de ácido cítrico (P_{AC}) e isocítrico (P_{AIC}); Q_{AC}: produtividade volumétrica de ácido cítrico (g/L.h) no ponto de máxima concentração de ácido cítrico. Os experimentos foram realizados em duplicata.

O efeito de álcoois sobre a produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* foi inicialmente investigada por Moyer (1953). Este autor observou que a adição de metanol aumenta a produção de ácido cítrico utilizando como fonte de carbono glicose comercial e outras fontes de carboidratos. Haq *et al*. (2003), Sikander e Haq (2005), Rivas *et al.* (2008), Suzelle *et al.* (2009) e Nadeem *et al.* (2010) investigaram o papel do metanol ou etanol no rendimento de ácido cítrico produzido por *A. niger*. Segundo Dhillon *et al.* (2011), o aumento da produção de ácido cítrico através da adição de etanol pode ser atribuído à degradação lenta de ácido cítrico, devido à redução da atividade da enzima aconitase. A adição de etanol também resultou no ligeiro aumento na atividade de outras enzimas pertencentes ao ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). Outra explicação para o aumento da produção de ácido cítrico é a possibilidade de o etanol ser convertido para acetil-CoA, um substrato metabólico necessário para a formação do ácido cítrico (DHILLON *et al.*, 2011).

O papel exato do metanol na produção de ácido cítrico por *A.niger* ainda não está claro. Este álcool não é metabolizado/assimilado por este fungo e o seu efeito estimulante na produção de ácido cítrico pode ser explicado, pois aumenta a permeabilidade da membrana da célula provocando mais excreção de ácido cítrico a partir de células do micélio. Além disso, a adição de metanol alterou um pouco a atividade de algumas enzimas do ciclo de ácido tricarboxílico, favorecendo o acúmulo de ácido cítrico (DHILLON *et al.*, 2011).

5.1.2 Influência da Concentração de Extrato de Lêvedo

Frente às dificuldades de se obter glicerol oriundo de processo de obtenção de biodiesel que ainda não é utilizado comercialmente (rota etílica), decidiu-se dar prosseguimento ao estudo com glicerol proveniente da produção de biodiesel, obtido por óleo de soja e metanol, catalisado por KOH, uma vez que esta rota química é utilizada comercialmente para obtenção de biodiesel.

A influência de extrato de lêvedo como fonte de nitrogênio na produção de ácido cítrico foi investigada variando sua concentração inicial.

Analisando os dados apresentados na Tabela 5.2, é possível observar que a cepa em questão foi capaz de consumir parte do glicerol presente no meio durante 94 horas de cultivo em todas as condições estudadas. O maior consumo de glicerol por *Y. lipolytica* (63%) ocorreu na condição em que se usou a concentração inicial de extrato de levedura de 0,1 g/L. Apesar das máximas concentrações celulares, obtidas em 54 h de fermentação, terem sido similares para todas as condições estudadas, nesta condição houve maior produção de biomassa. O menor consumo de glicerol foi constatado quando se testou a menor concentração inicial de extrato de levedura. Porém, o valor de $Y_{X/S}$ calculado em 94 h de fermentação, ponto onde se obteve máxima concentração de ácido cítrico obtida, foi similar ao obtido no cultivo com concentração inicial de 0,1705 g/L de extrato de levedura.

Tabela 5.2. Crescimento celular, consumo de substrato e pH do processo de produção de ácido cítrico a partir de 30 g de glicerol (obtido de glicerol bruto) por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 em diferentes concentrações iniciais de extrato de levedura.

Concentração inicial de extrato de levedura (g/L)	Consumo de glicerol (g/L) em 94 h de cultivo	X_o (g/L)	$X_{máx}$ (g/L)	pH_o	pH_f	$Y_{X/S}$ (g/g)
0,0500	15,55	1,35±0,02	5,08±0,01	6,67	4,67	0,15
0,1000	18,27	1,32±0,03	5,24±0,11	6,63	4,51	0,11
0,1705	16,49	1,32±0,05	5,05±0,07	6,70	4,40	0,16
0,2410	17,14	1,33±0,03	4,75±0,4	6,62	4,49	0,20

Glicerol proveniente de óleo de soja e metanol, catalisado por KOH na ausência de sulfato de amônio; ± Desvio de análise em duplicata. X_0: concentração celular inicial no tempo t igual a zero (g/L); $X_{máx}$: concentração celular máxima (g/L) obtida em 54 h de fermentação; pH_o: pH no tempo t igual a zero; pH_f: pH no ponto de máxima concentração de ácido cítrico (94 h); $Y_{X/S}$: fator de rendimento de células em relação ao consumo de glicerol (g/g) no ponto de máxima concentração de ácido cítrico (94 h).

A Tabela 5.3 apresenta os parâmetros cinéticos de produção do ácido cítrico obtidos nas condições experimentais testadas e em 94 h de fermentação, mostrando que a produção do composto de interesse foi ligeiramente maior para o ensaio no qual a concentração inicial de extrato de levedura foi 0,1705 g/L. A menor produção de ácido isocítrico, no ponto de maior produção de ácido cítrico, foi obtida nesta condição de ensaio e igual a 9,58 g/L. Sendo assim, a razão entre os ácidos cítrico e isocítrico ($R_{AC/AIC}$) foi maior nesta condição e igual a 0,45.

Tabela 5.3. Parâmetros de produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 na presença de 30 g/L de glicerol, em diferentes concentrações iniciais de extrato de levedura e em 94 h de fermentação

Extrato de Lêvedo (g/L)	P_{AC} (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Q_{AC} (g/L.h)	$Y_{P/X}$ (g/g)	P_{AIC} (g/L)	$R_{AC/ISC}$
0,0500	3,66	0,24	0,04	1,56	10,31	0,35
0,1000	4,09	0,22	0,04	2,13	10,23	0,40
0,1705	4,35	0,26	0,05	1,69	9,58	0,45
0,2410	4,14	0,24	0,04	1,21	10,07	0,41

Glicerol proveniente de óleo de soja e metanol, catalisado por KOH na ausência de sulfato de amônio; P_{AC}: concentração máxima de ácido cítrico (g/L) em 94 h; $Y_{P/S}$: fator de rendimento de ácido cítrico em relação ao consumo de glicerol (g/g) no ponto de máxima concentração de ácido cítrico (94 h); Q_{AC}: produtividade volumétrica de ácido cítrico (g/L.h) no ponto de máxima concentração de ácido cítrico (94 h); $Y_{P/X}$: fator de rendimento de ácido cítrico em relação à biomassa formada (g/g) no ponto de máxima concentração de ácido cítrico (94 h); P_{AIC}: concentração de ácido isocítrico (g/L) no ponto de máxima concentração de ácido cítrico (94 h); $R_{AC/AIC}$: razão entre as concentrações de ácido cítrico (P_{AC}) e isocítrico (P_{AIC}).

5.1.3 Influência da Presença de Sulfato de Amônio

Existem estudos na literatura (PAPANIKOLAOU *et al.*, 2002; MAKRI *et al.*, 2010) que utilizam simultaneamente sulfato de amônio e extrato de lêvedo como fontes de nitrogênio no meio de produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica* a partir de glicerol bruto. Portanto, foi realizada uma avaliação da presença de sulfato de amônio no meio de cultivo

para produção do ácido cítrico por *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682. O glicerol utilizado foi obtido da transesterificação de óleo de soja com metanol e catalisado com o KOH. Para a realização deste ensaio, foi utilizada 0,7 g/L de sulfato de amônio e 0,1705 g/L de extrato de levedura, uma vez que a produção de ácido cítrico foi maior nesta condição experimental quando se testou apenas extrato de lêvedo como fonte de nitrogênio (ver seção 5.1.2). Comparando com as condições de ensaio realizadas anteriormente, verificou-se que o maior consumo de glicerol foi nesta condição (72% em 94 h), o que explica a maior concentração celular (6,01 g/L em 94 h) e o maior rendimento de biomassa em relação ao consumo de glicerol (0,24 g/g em 94 h). A adição de mais uma fonte de nitrogênio pode ter desviado o fluxo de carbono para o crescimento da levedura.

Comparando os ensaios com concentração inicial de extrato de levedura de 0,1705 g/L na ausência e na presença de sulfato de amônio (Tabela 5.4), pode-se observar que o maior fator de conversão de substrato em ácido cítrico ($Y_{P/S}$) e a maior concentração e produtividade de ácido cítrico foram obtidos no ensaio realizado na ausência de sulfato de amônio. A presença desta fonte de nitrogênio reduziu 39% da produção de ácido cítrico e estimulou a produção do ácido isocitrico em 1,74 vezes, justificando a redução de $R_{AC/AIC}$ e redução na produtividade (Q_{AC}) para o ensaio realizado na presença de sulfato de amônio.

Tabela 5.4 - Parâmetros de produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 na presença de 30 g/L de glicerol, massa ajustada com a pureza (83%), na concentração de 0,1705 g/L de extrato de levedura e na ausência e presença de sulfato de amônio.

Extrato de Lêvedo (g/L)	Sulfato de Amônio (g/L)	P_{AC} (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Q_{AC} (g/L.h)	$Y_{P/X}$ (g/g)	P_{AIC} (g/L)	$R_{AC/ISC}$	pH_o	pH_f
0,1705	0	4,35	0,26	0,05	1,69	9,58	0,45	6,70	4,40
0,1705	0,7	2,67	0,14	0,03	0,58	16,70	0,16	6,64	4,97

Glicerol proveniente de óleo de soja e metanol, catalisado por KOH; P_{AC}: concentração máxima de ácido cítrico (g/L) em 94 h; $Y_{P/S}$: fator de rendimento de ácido cítrico em relação ao consumo de glicerol (g/g) no ponto de máxima concentração de ácido cítrico (94 h); Q_{AC}: produtividade volumétrica de ácido cítrico (g/L.h) no ponto de máxima concentração de ácido cítrico (94 h); $Y_{P/X:}$ fator de rendimento de ácido cítrico em relação à biomassa formada (g/g) no ponto de máxima concentração de ácido cítrico (94 h); P_{AIC}: concentração de ácido isocítrico (g/L) no ponto de máxima concentração de ácido cítrico (94 h); $R_{AC/AIC}$: razão entre as concentrações de ácido cítrico (P_{AC}) e isocítrico (P_{AIC}); pH_o: pH no tempo t igual a zero; $pH_{f:}$ pH no ponto de máxima concentração de ácido cítrico (94 h).

O maior consumo de glicerol na presença desta outra fonte de nitrogênio também gerou uma produção mais elevada de ácido orgânico (soma dos ácidos cítrico e isocítrico) conforme pode ser visto na Tabela 5.4. A limitação da formação de biomassa promovida pela deficiência de nitrogênio e maior produção de ácido cítrico na ausência de sulfato de amônio

justificam o maior $Y_{P/X}$ obtido por esta condição. A atividade da enzima aconitase pode ter aumentado na presença de maior concentração de nitrogênio disponível no meio de cultivo.

Conforme pode ser visto nas Tabelas 5.2 e 5.4, os valores de pH iniciais e finais foram similares para todas as condições testadas com glicerol bruto. O meio mineral tamponado utilizado no meio de cultivo tem por objetivo minimizar drásticas reduções de pH afim de favorecer a produção de ácido cítrico (PAPANIKOLAOU *et al.*, 2002).

5.1.4 Influência da Concentração de Ferro e Manganês

A composição do meio de cultivo influencia a produção de ácido cítrico por *A. niger*, que requer traços de metais para o crescimento e, ainda, limitações de certos metais, como Mn^{2+} e Fe^{2+}, principalmente durante a fermentação submersa para a produção de ácido cítrico (PAPAGIANNI, 2007). A literatura mostra que a atividade da enzima aconitase é estimulada pela presença do íon ferro (MORRISON, 1953). Segundo Kornberg e Pricer (1951), a enzima NAD^+ isocitrato desidrogenase é estimulada por Mn^{2+}, porém o íon manganês em baixas concentrações inibe esta enzima. Logo, neste trabalho verificou-se a influência das concentrações destes metais no meio de cultivo contendo glicerol bruto na produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682.

Da Silva *et al.* (2013) usaram um planejamento experimental adotando glicerol bruto da rota etílica (NaOH) como variável independente e a maior concentração e produtividade volumétrica de ácido cítrico foi 9,22 g/L e 0,10 g/L.h, respectivamente para o teste com 45 g/L de glicerol bruto (sem ajuste da massa com a pureza) e 0,1 g/L de extrato de lêvedo, que foi utilizado como experimento controle para se verificar a influência da concentração dos íons ferro e manganês neste presente estudo. Este meio era confeccionado com meio mineral tamponado, constituído por $FeCl_3$ e $MnSO_4.H_2O$ nas concentrações 0,09 g/L e 0,06 g/L, respectivamente, como descrito em Materiais e Métodos, seção 4.4.1. Contudo, foi utilizado glicerol bruto oriundo da rota metílica (KOH) para esta verificação.

Da Silva *et al.* (2011) estudaram a influência da concentração celular inicial na produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, utilizando como fonte de carbono glicerol bruto da rota etílica (NaOH) na concentração 45 g/L e 0, 1 g/L de extrato de lêvedo e verificaram que o melhor resultado de concentração e produtividade de ácido cítrico foi em 2 g/L de concentração celular inicial.

Portanto, para investigar a influência dos metais ferro e manganês na produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica*, a concentração destes íons, já presentes no meio mineral tamponado, foram reduzidas, sendo propostas as seguintes condições experimentais: fixou-se a concentração do sal cloreto férrico em 0,03 g/L para testar a influência do íons manganês na produção de ácido cítrico, em concentrações de 0,01 e 0,005 g/L de $MnSO_4.H_2O$, utilizando glicerol bruto produzido a partir da rota metílica para obtenção de biodiesel. A concentração celular inicial foi 2,0 mg células (peso seco) por mL.

Os resultados dos parâmetros analisados estão apresentados na Tabela 5.5.

Tabela 5.5 - Parâmetros de produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica* na presença de 45 g/L de glicerol bruto, 0,1 g/L de extrato de lêvedo e em diferentes concentrações dos íons ferro e manganês

$FeCl_3$ (g/L)	$MnSO_4.H_2O$ (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/g)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/X}$ (g/g)	P_{AC}* (g/L)	P_{AIC} (g/L)	$R_{AC/AIC}$	Q_{AC} (g/L.h)
0,090	0,060	0,33	0,14	2,35	9,70	10,44	0,93	0,10
0,030	0,010	0,34	0,14	2,49	9,36	8,68	1,08	0,10
0,030	0,005	0,30	0,14	2,21	9,20	7,68	1,20	0,09
0,006	0,010	0,36	0,20	1,81	9,69	3,00	3,23	0,1

*** Tempo de máxima produção de ácido cítrico: 98 h**
Os experimentos foram realizados em duplicata

É possível verificar na Tabela 5.5, que a redução da concentração dos íons ferro e mangânes não favoreceu a produção de ácido cítrico, sendo a concentração máxima (P_{AC}) e a produtividade (Q_{AC}) de ácido cítrico obtidas em 98 h de processo similares entre as três condições testadas. O fator de conversão de glicerol em ácido cítrico ($Y_{P/S}$), o fator de rendimento de células em relação ao substrato ($Y_{X/S}$) e o rendimento de produto em relação às células ($Y_{P/X}$) também foram similares.

Comparando as condições com a mesma concentração de $FeCl_3$ e variando-se a concentração de $MnSO_4.H_2O$, a produção de ácido isocítrico foi, 8,68 g/L e 7,68 g/L para maior e menor concentrações de manganês utilizadas, respectivamente. Os resultados obtidos mostram que as concentrações do $MnSO_4.H_2O$ testadas resultaram em produção similar de ácido cítrico e a produção de ácido isocítrico foi superior quando o cultivo foi adicionado da maior concentração testada deste sal, diferente da resposta esperada já que o íon manganês ativa a enzima NAD^+ isocitrato desidrogenase que catalisa a conversão do isocitrato a α-cetoglutarato. A produção de ácido isocítrico no experimento controle foi superior em relação às outras duas condições testadas, provavelmente porque neste ensaio a concentração de ferro adicionada foi 3 vezes maior, íon este que ativa a aconitase, enzima que catalisa a conversão do citrato a isocitrato.

De acordo com Roehr *et al*. (1983), a presença do íon manganês (Mn^{2+}) no meio nutriente desempenha um papel chave no acúmulo de uma grande quantidade de citrato por *A. niger*. Quando a concentração de Mn^{2+} é mantida abaixo de 0,02 mM (o que não afeta a taxa de crescimento ou produtividade de biomassa; que corresponde a 0,0011 g/L) grandes quantidades de ácido cítrico são produzidas. Clark *et al*. (1966) observaram redução de 10% e 25% na produção de ácido cítrico quando houve adição de 2 ppb e 100 ppb de manganês ao melaço de beterraba, respectivamente. Uma pesquisa feita por Roehr *et al.* (1996) confirmou o papel regulador chave do íon Mn^{2+}. O anabolismo celular de *A. niger* é prejudicado em condições com deficiência total de manganês e/ou limitação de nitrogênio e de fosfato. Shu e Johnson (1948) demostraram que o manganês é um íon metálico importante em muitas outras funções celulares, mais notavelmente na síntese da parede celular, na esporulação e produção

de metabólitos secundários. Bowes e Matetey (1979, *apud* YIGITOGLU, 1992), em seu estudo, também observaram que o acúmulo de ácido cítrico por *A. niger* é reduzido pela metade com a adição de 10 ppm de Mn^{2+} no meio de crescimento. Orthafer *et al.* (1979, *apud* YIGITOGLU, 1992) verificaram que a deficiência de manganês leva a redução significativamente do teor lipídico em *A. niger*, enquanto que foram elevados os níveis de lipídeos em culturas suficientes de manganês.

Conforme pode ser visto nas Figuras 5.3, 5.4 e 5.5, o consumo de glicerol e a cinética de pH foram similares e a produção máxima de ácido isocítrico foi obtida em 50 horas de fermentação para as três condições testadas, sendo que a condição experimental com as maiores concentrações de Fe^{3+} e Mn^{2+} permitiu maior produção de ácido isocítrico (14,06 g/L). Após este tempo, a concentração deste ácido foi reduzida nas três condições experimentais. Nos três casos, observou-se um aumento expressivo na produção de ácido cítrico após a redução da concentração de ácido isocítrico.

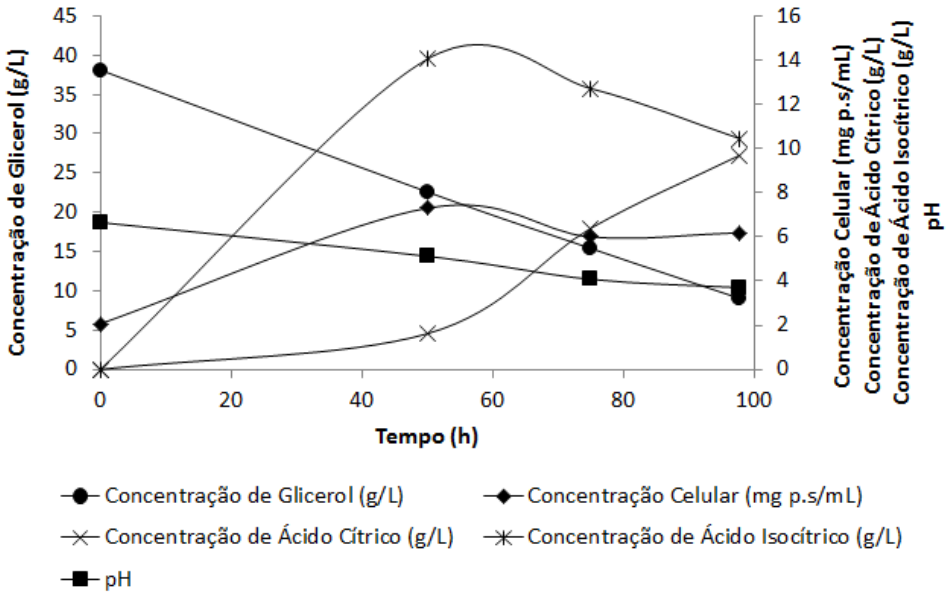

Figura 5.3 - Cinética da concentração celular, do consumo de glicerol, produção de ácidos cítrico e isocítrico e do pH para o cultivo de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 em shaker na presença de 45 g/L de glicerol bruto, sem ajuste da massa com a pureza (83%), 0,1 g/L de extrato de lêvedo e nas condições de $FeCl_3$: 0,090 g/L e $MnSO_4.H_2O$: 0,060 g/L. Os pontos das curvas representam a média dos ensaios realizados em duplicata. (A linha de cada curva não representa dados experimentais, representa uma tendencia do perfil).

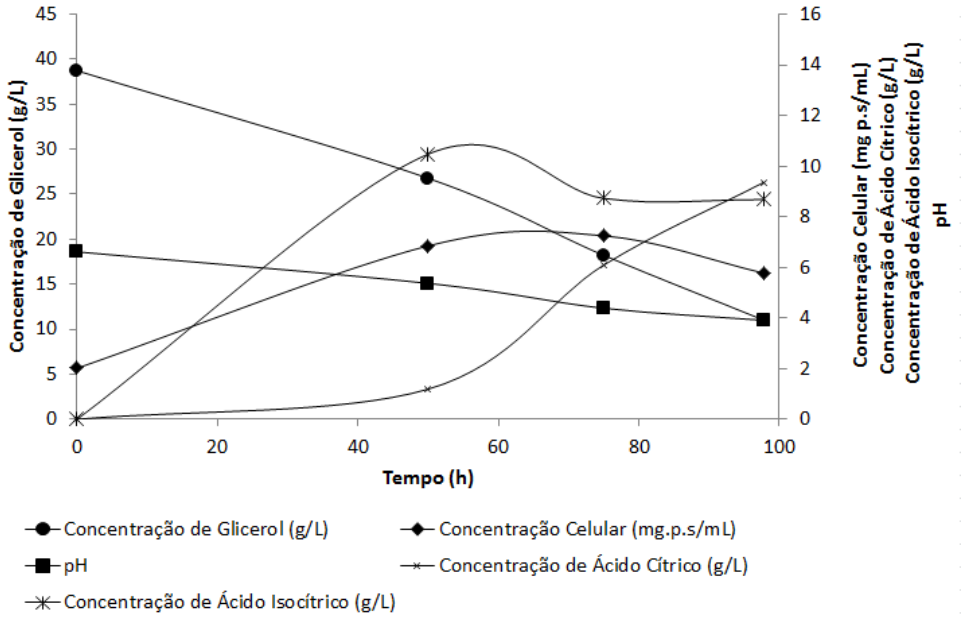

Figura 5.4 - Cinética da concentração celular, do consumo de glicerol, produção de ácidos cítrico e isocítrico e do pH para o cultivo de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 em shaker na presença de 45 g/L de glicerol bruto, sem ajuste da massa com a pureza (83%), 0,1 g/L de extrato de lêvedo e nas condições de $FeCl_3$: 0,030 g/L e $MnSO_4.H_2O$: 0,010 g/L. Os pontos das curvas representam a média dos ensaios realizados em duplicata. (A linha de cada curva não representa dados experimentais, representa uma tendencia do perfil).

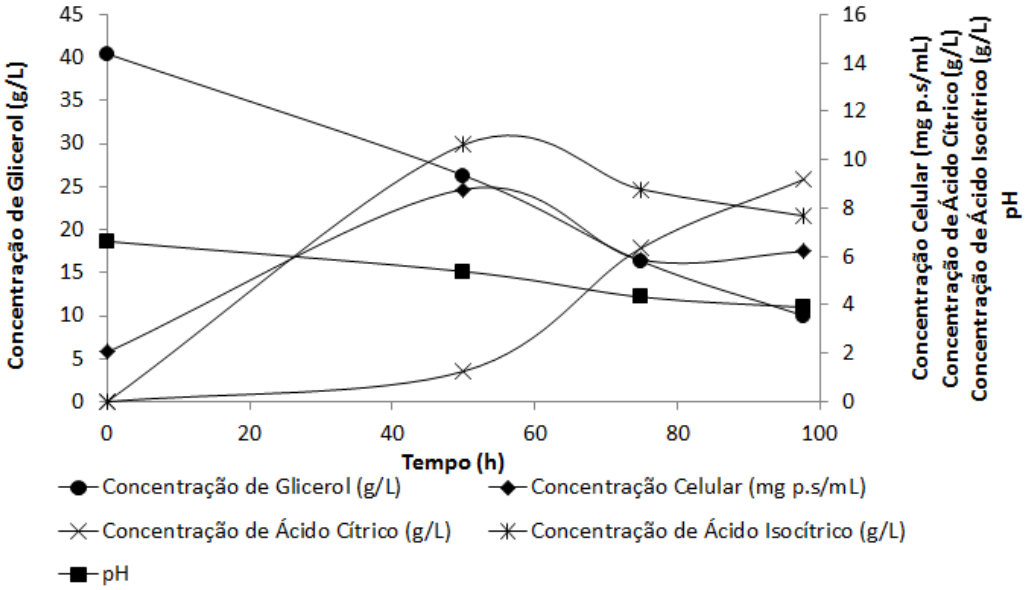

Figura 5.5 - Cinética da concentração celular, do consumo de glicerol, produção de ácidos cítrico e isocítrico e do pH para o cultivo de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 em shaker na presença de 45 g/L de glicerol bruto, sem ajuste da massa com a pureza (83%), 0,1 g/L de extrato de lêvedo na condição de $FeCl_3$: 0,030 g/L e $MnSO_4.H_2O$: 0,005 g/L. Os pontos das curvas representam a média dos ensaios realizados em duplicata (A linha de cada curva não representa dados experimentais, representa uma tendencia do perfil).

Com o propósito de reduzir a produção de ácido isocítrico e verificar a influência do íon ferro, foi proposta uma nova condição experimental, fixando a concentração do sal $MnSO_4.H_2O$ em 0,01 g/L e reduzindo a concentração do sal $FeCl_3$ para 0,006 g/L, já que a enzima aconitase seria ativada por este íon. Como pode ser visto na Tabela 5.5, na condição utilizando menor concentração de íon ferro, a concentração de ácido cítrico obtida foi 9,69 g/L, sendo similar em relação aos resultados apresentados pelas condições experimentais testadas anteriormente. A produção de ácido isocítrico reduziu para 3,00 g/L, representando uma redução de 71% em relação ao ensaio realizado com concentrações de manganês e de ferro maiores, de 65% em relação ao ensaio realizado com a mesma concentração de manganês e maior concentração de ferro e de 61% em relação ao ensaio que utilizou maior concentração de ferro e menor concentração de manganês. Esse resultado indica que o acúmulo deste ácido está fortemente relacionado com o íon ferro, podendo ser explicado pelo fato da enzima aconitase ser ativada em maiores concentrações de ferro. Logo, a menor produção de ácido isocítrico e a maior $R_{AC/ISC}$ foram obtidas pelo ensaio de menor concentração deste íon. Este resultado é muito relevante, uma vez que a produção de ácido isocítrico é indesejada no processo de obtenção de ácido cítrico posto que a cristalização do ácido cítrico na etapa de separação e purificação se torna prejudicada quando o ácido isocítrico está presente em quantidades superiores a 5% (RYWINSKA *et al.*, 2011).

Observou-se que o pH teve o mesmo comportamento dos demais ensaios e a concentração de glicerol se manteve praticamente constante após 80 h de fermentação para o ensaio na menor concentração de ferro testada (Figuras 5.3, 5.4, 5.5 e 5.6).

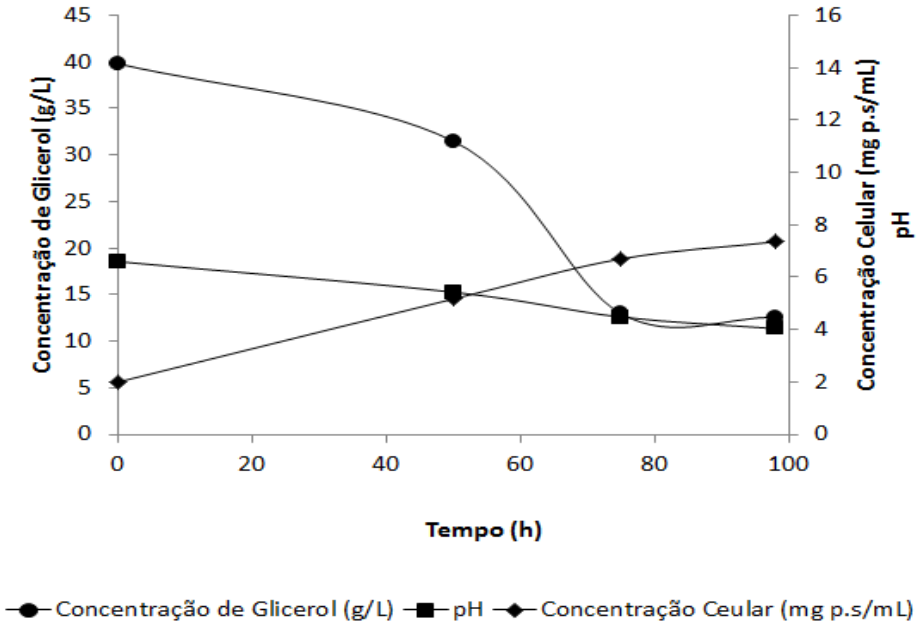

Figura 5.6 - Cinética da concentração celular, do consumo de glicerol bruto e do pH em $FeCl_3$: 0,006 g/L e $MnSO_4.H_2O$: 0,010 g/L (A linha de cada curva não representa dados experimentais, representa uma tendencia do perfil).

Karasu-Yalcin *et al.* (2010) verificaram que a produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica* NBRC 1658 e *Y. lipolytica* 57, utilizando glicose como fonte de carbono, foi inibida para as concentrações de ferro e cobre utilizadas, enquanto o crescimento celular foi positivamente afetado pela adição destes minerais. Quando foi usado sal de manganês, um efeito negativo considerável sobre a produção de ácido cítrico foi observado especialmente para a cepa NBRC 1658. O meio de cultivo utilizado neste estudo continha extrato de lêvedo, que possui todos os micronutrientes necessários para crescimento, incluindo os íons metais (DYAL e NARINE, 2005). Logo, este componente de meio provavelmente forneceu a quantidade destes íons necessária para a produção de ácido cítrico por estas cepas.

A presença do íon ferro é essencial, pois ativa a produção de acetil-CoA, um precursor do ácido cítrico. Porém o excesso de ferro ativa a enzima aconitase, que catalisa a isomerização do citrato a isocitrato, portanto reduzindo a produção de ácido cítrico (CROLLA e KENNEDY, 2001).

5.2 Experimentos em Biorreator

Após a escolha da melhor concentração de extrato de lêvedo para a produção de ácido cítrico em agitador rotatório, iniciou-se o estudo em biorreator. Apesar do ensaio realizado com concentração inicial de extrato de levedura de 0,1705 g/L e na ausência de sulfato de amônio ter gerado a maior concentração, rendimento e produtividade volumétrica de ácido cítrico em agitador orbital, a condição experimental escolhida para a realização dos experimentos em biorreator foi concentração inicial de extrato de levedura de 0,1 g/L, na ausência de sulfato de amônio, com o propósito de reduzir o custo de produção em termos de utilização de menor concentração de extrato de levedura e pelo fato da concentração de ácido cítrico obtida por esta condição ter sido similar (4,09 g/L) ao melhor resultado (4,35 g/L). As concentrações dos sais $FeCl_3$ e $MnSO_4.H_2O$ foram mantidas iguais a 0,09 e 0,06 g/L, respectivamente (concentrações originais do meio mineral tamponado).

5.2.1 Influência da agitação na produção de ácido cítrico

Com o objetivo de analisar a influência da agitação na produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica* em biorreator, foram realizados experimentos em 4 velocidades de agitação diferentes: 350, 450, 550 e 650 rpm a 1 vvm. A temperatura do meio de cultivo foi mantida próximo a 28°C.

O valor de pH do meio de cultivo, a concentração de células de *Y. lipolytica*, a concentração de oxigênio dissolvido no meio cultivo e a temperatura do meio de cultivo no biorreator foram acompanhados durante o processo nas diferentes velocidades de agitação. Os perfis cinéticos correspondentes a estes ensaios podem ser observados nas Figuras 5.7, 5.8, 5.9 e 5.10.

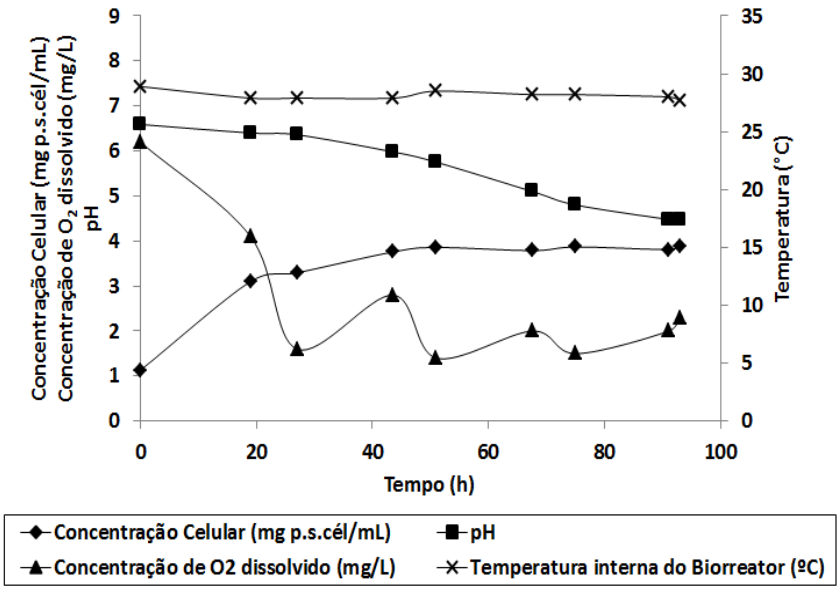

Figura 5.7 - Cinética do processo de produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* em biorreator a 350 rpm (A linha de cada curva não representa dados experimentais, representa uma tendencia do perfil).

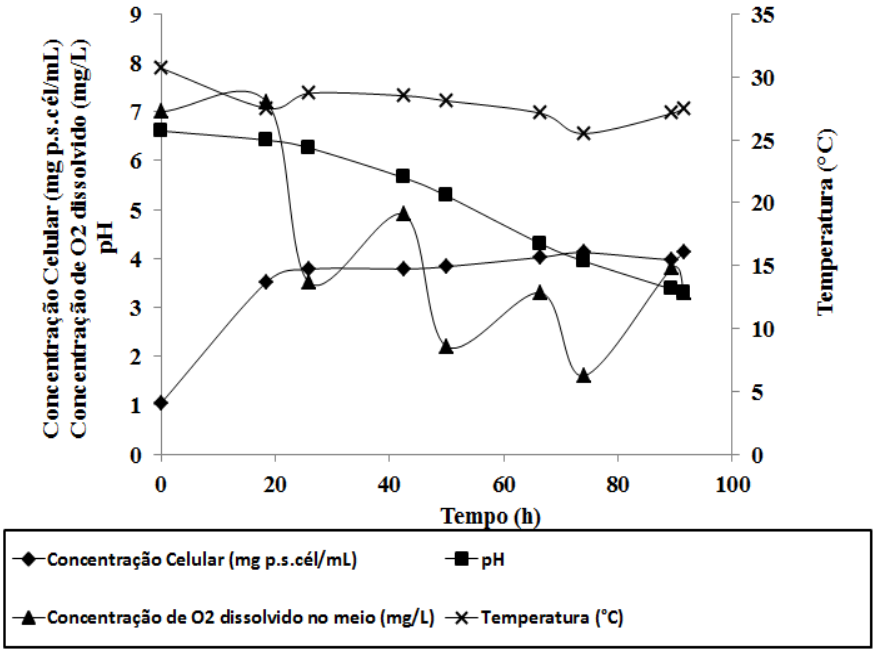

Figura 5.8 - Cinética do processo de produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* em biorreator a 450 rpm (A linha de cada curva não representa dados experimentais, representa uma tendencia do perfil).

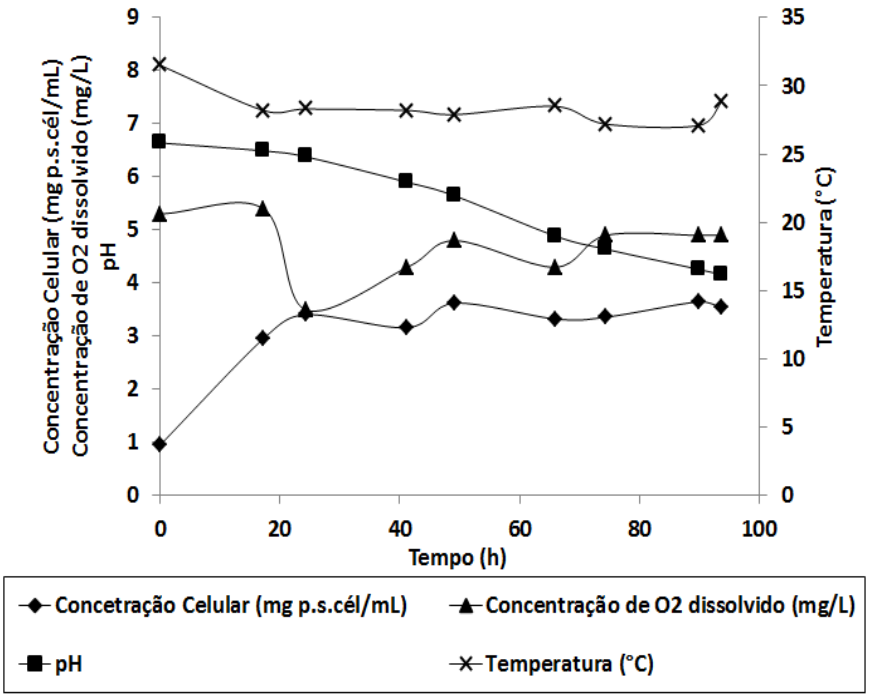

Figura 5.9 - Cinética do processo de produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* em biorreator a 550 rpm (A linha de cada curva não representa dados experimentais, representa uma tendencia do perfil).

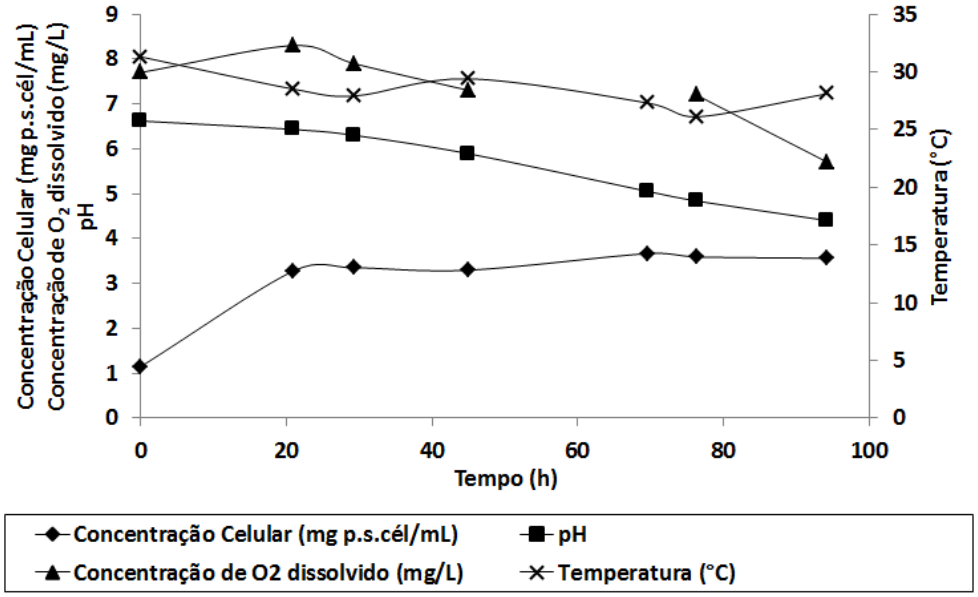

Figura 5.10 - Cinética do processo de produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* em biorreator a 650 rpm (A linha de cada curva não representa dados experimentais, representa uma tendencia do perfil).

Analisando as Figura 5.7, 5.9 e 5.10, é possível notar que a variação da concentração celular para a condição experimental realizada a 350 rpm foi ligeiramente superior aos testes realizados a 550 e 650 rpm, sendo a máxima concentração celular obtida igual a 3,87 g/L em 93 h de fermentação, tempo onde ocorreu a máxima produção de ácido cítrico (Tabela 5.6). O

consumo de glicerol neste instante foi de 13,73 g/L. O pH variou de 6,59 a 4,48, sendo este o valor no ponto de maior produção de ácido cítrico. O início do decréscimo do pH é evidente no início da fase estacionária da curva de crescimento celular, que foi alcançada em aproximadamente 44 h, sendo que nas velocidades de agitação superiores, esta fase foi antecipada para aproximadamente 26 h de processo. Através dos dados apresentados na Figura 5.7, foi possível observar que a concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultivo no início do experimento a 350 rpm era 6,1 mg/L e oscilou entre 1,4 e 2,8 mg/L na fase estacionária da curva de crescimento celular.

Analisando a Figura 5.8, que mostra os resultados relacionados com a agitação a 450 rpm, pode-se observar que a concentração celular máxima foi 4,13 g/L e que este ocorreu em 92 h de processo, ligeiramente maior em relação às demais velocidades de agitação testadas. Observou-se que a concentração inicial de oxigênio dissolvido no meio de cultivo foi maior que aquela obtida em 350 rpm e 550 rpm, apenas sendo inferior a gerada a 650 rpm e igual a 7 mg/L. O comportamento de oscilação da concentração de oxigênio dissolvido no meio durante a fase estacionária da curva de crescimento celular foi similar ao observado na condição a 350 rpm, sendo que o valor máximo obtido foi maior, como pode ser visto na Figura 5.8. Apenas neste ensaio, o pH teve uma redução mais acentuada, alcançado o valor de 3,31 no final do processo (93 h), sendo o início do decréscimo observado no início da fase estacionária. A temperatura variou entre 27,1 e 30,7°C.

Conforme pode ser observado na Figura 5.9, houve redução do pH de 6,64 para 4,16 no final do processo fermentativo a 550 rpm, sendo evidente o decréscimo na fase estacionária. Nesta condição experimental, foi observada uma redução brusca na concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultivo, sendo no início do processo igual a 5,3 mg/L e reduzindo para 3,5 mg/L no início da fase estacionária, porém permanecendo praticamente estável durante esta fase da curva de crescimento celular, diferenciando do comportamento apresentado nas codições de ensaio de 350 e 450 rpm. A temperatura foi acompanhada e variou de 27,1 a 31,5°C, conforme pode ser visto na Figura 5.9. O consumo de glicerol foi 14,96 g/L e menor que no ensaio a 450 rpm.

A máxima produção de ácido cítrico obtida pela condição experimental a 650 rpm foi igual a concentração obtida a 350 rpm. Ambos os ensaios atingiram a máxima concentração de ácido cítrico em tempos de fermentação similares (Tabela 5.6).

Analisando as Figuras 5.7, 5.8, 5.9 e 5.10, pode-se observar que a concentração celular máxima foi menor para a condição a 650 rpm comparando com as demais velocidades de agitação testadas, sendo igual a 3,56 g/L e que foi alcançada em 94 h. A redução de pH foi similar às condições 350 e 550 rpm. Nesta condição, detectou-se a maior concentração inicial de oxigênio dissolvido no meio de cultivo e que permaneceu superior a 5,7 mg/L durante todo o processo. Este perfil cinético foi diferente dos demais ensaios, já que para os ensaios testados a 350 e 450 rpm, a concentração deste parâmetro oscilou durante a fase estacionária

da curva de crescimento e não foi superior a 2,8 e 4,9 mg/L para 350 e 450 rpm, respectivamente. Comparando com o teste realizado a 550 rpm, este apresentou um comportamento mais estável durante a fase estacionária em relação aos testes a 350 e 450, porém a concentração de oxigênio dissolvido no meio não ultrapassou a 4,9 mg/L. O consumo de glicerol foi 15,41 g/L, sendo assim o consumo deste substrato foi maior na condição experimental que utilizou 450 rpm de agitação.

Os resultados dos parâmetros analisados estão apresentados na Tabela 5.6, junto com as respectivas velocidades de agitação. A maior concentração de ácido cítrico (P_{AC}) e o maior rendimento deste em relação ao glicerol consumido ($Y_{P/S}$) foram obtidos pela condição experimental testada a 550 rpm, na qual se observou o segundo menor consumo de glicerol e a segunda menor variação de concentração celular. Observou-se que nesta condição, a concentração de oxigênio dissolvido no meio praticamente permaceu constante e próxima a 5 mg/mL durante a fase estacionária da curva de crescimento celular, diferente do que foi observado a 350 e 450 rpm.

Tabela 5.6 - Resultados dos ensaios utilizando as velocidades de agitação 350, 450, 550 e 650 rpm como variável

Agitação (rpm)	P_{AC} (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Q_{AC} (g/L.h)	$Y_{P/X}$ (g/g)	$Y_{X/S}$ (g/g)	P_{AIC} (g/L)	$R_{AC/ISC}$
350	5,64[#]	0,41	0,06	2,06	0,20	9,48	0,59
450	6,11[:]	0,37	0,07	1,98	0,19	8,07	0,76
550	7,03[‡]	0,47	0,07	2,74	0,17	9,65	0,73
650	5,64[*]	0,37	0,06	2,34	0,16	9,09	0,62

[#] P_{AC}: concentração máxima de ácido cítrico (g/L) em 93 h; [:] P_{AC}: concentração máxima de ácido cítrico (g/L) em 92 h; [‡] P_{AC}: concentração máxima de ácido cítrico (g/L) em 94 h; [*] P_{AC}: concentração máxima de ácido cítrico (g/L) em 94 h.

Segundo a classificação cinética de Gaden, a produção de ácido cítrico pela cepa *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 testada neste presente trabalho e utilizando glicerol bruto como fonte de carbono é classificada como produção não associada ao crescimento, onde a formação de produto não está relacionada com o metabolismo energético. Provavelmente, a agitação a 550 rpm favorece a quantidade ideal de oxigênio dissolvido no meio de cultivo necessária ao metabolismo desta levedura, permanencendo estável durante a fase de produção de ácido cítrico. Embora a produção de ácido cítrico em termos de P_{AC} e $Y_{P/S}$ tenha sido maior a 550 rpm, a produtividade volumétrica (Q_{AC}) foi igual à obtida a 450 rpm.

Como já foi mencionado, não é interessante a produção concomitante do ácido isocítrico no processo de obtenção microbiológica de ácido cítrico, pois dificulta a cristalização do ácido cítrico na etapa de separação e purificação. Adicionalmente, não é interessante produzir acido isocítrico, pois este ácido possui capacidade tamponante e quelante inferior quando comparado ao ácido cítrico. Analisando os dados apresentados na

Tabela 5.6, foi possível identificar que a menor produção de ácido isocítrico foi obtida a 450 rpm, porém a soma destes dois ácidos foi maior a 550 rpm.

Após análise cromatográfica da amostra coletada no ponto de máxima produção de ácido cítrico por células de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 cultivadas em biorreator na velocidade de agitação a 550 rpm, picos com tempos de retenção diferentes dos ácidos cítrico e isocítrico foram observados, sugerindo a produção de outras substâncias. Como *Y. lipolytica* tem a capacidade de produzir outros ácidos orgânicos, por exemplo, ácido α-cetoglutárico, verificou-se se houve a produção deste nesta condição experimental. A produção de ácido oxálico também foi verificada, pois sua produção dificulta a separação do ácido cítrico na etapa de recuperação e purificação. A análise foi realizada em HPLC utilizando padrões destes ácidos. Observou-se uma pequena produção de ácido α-cetoglutárico (0,27 g/L) e não foi detectado ácido oxálico.

5.3 Estudo da produção de ácido cítrico e acúmulo de lipídeos de células de *Yarrowia lipolytica* crescidas na ausência e presença de sesamol

Wynn *et al.* (1997) investigaram a influência da substância sesamol, um componente presente no óleo de semente de sésamo, no metabolismo de *Mucor Circinelloides in vivo* e observou que esta substância inibiu a síntese de ácidos graxos, crescimento celular e dessaturação de ácidos graxos neste fungo. Um ensaio enzimático foi realizado, mostrando que sesamol causou inibição da atividade da enzima málica (EC: 1.1.1.40). Em estudos anteriores, a enzima málica foi associada à disposição de NADH para a biossíntese de lipídeos (KENDRICK e RATLEDGE, 1992; WYNN e RATLEDGE, 1997) e a dessaturação de ácidos graxos (KENDRICK e RATLEDGE, 1992). Portanto, no estudo Wynn *et al.* (1997) é possível que a redução da produção de lípideo esteja associada a inibição da atividade da enzima málica o que limitaria o fornecimento de NADH para esta via metabólica.

Diante do exposto, foi proposto adicionar sesamol ao meio de produção de ácido cítrico descrito por Da Silva (2010) para crescimento de *Y. lipolytica* IMUFRJ 508682 com o objetivo de inibir a fase lipogênica, fase esta relacionada a produção de lipídeos, e, consequentemente, aumentar a produtividade e produção de ácido cítrico. O meio descrito por Da Silva (2010) foi utilizado como experimento controle e é composto de 30 g/L de glicerol PA, 0,1705 g/L de extrato de lêvedo e meio mineral tamponado. A concentração de sesamol utilizada para este teste foi 1,5 mM de sesamol.

A Figura 5.11 apresenta o perfil de concentração celular, consumo de glicerol, produção dos ácidos cítrico e isocítrico e pH na ausência de sesamol. Foi possível observar que após 96 horas de fermentação ainda restavam aproximadamente 16,91 g/L de glicerol no meio, indicando um lento consumo de glicerol, porém gradativo. Observou-se que a produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 iniciou na fase de desaceleração da

curva de crescimento, onde a demanda por energia é menor. A produção de ácido isocítrico foi mais expressiva em relação à produção de ácido cítrico desde o início da fase exponencial. Devido à secreção do ácido isocítrico para o meio externo em quantidades significativas desde a fase exponencial da curva de crescimento, pode-se supor que o ciclo de Krebs está bloqueado na enzima isocitrato desidrogenase e não é reiniciado pelo ciclo do glioxilato (uma via anaplerótica com o propósito de regenerar os precursores do ciclo do ácido cítrico) e sim pela conversão do piruvato a oxaloacetato através da catálise da enzima piruvato carboxilase.

A produção máxima de ácido isocítrico foi 14,82 g/L em 48 h de fermentação e após este tempo observou-se uma estagnação e redução da produção do ácido isocítrico e aumento na produção de ácido cítrico. Pode-se supor que a atividade da enzima aconitase, responsável pela conversão do ácido cítrico para ácido isocítrico foi reduzida, pois houve redução da concentração de ácido isocítrico após 49 h de fermentação e que o ácido isocítrico foi utilizado como fonte de carbono pela levedura. Ensaios enzimáticos se tornam necessários para confirmar a redução da atividade da enzima aconitase. Segundo Ratledge (2002), a constante de equilíbrio da reação catalisada por aconitase favorece o acúmulo de ácido cítrico. O glicerol continou sendo consumido, indicando que o citrato formado também era produzido a partir desta fonte de carbono. O pH decresceu como resposta a produção dos ácido orgânicos secretados para o meio externo, reduzindo para 4,02 em 170h de fermentação.

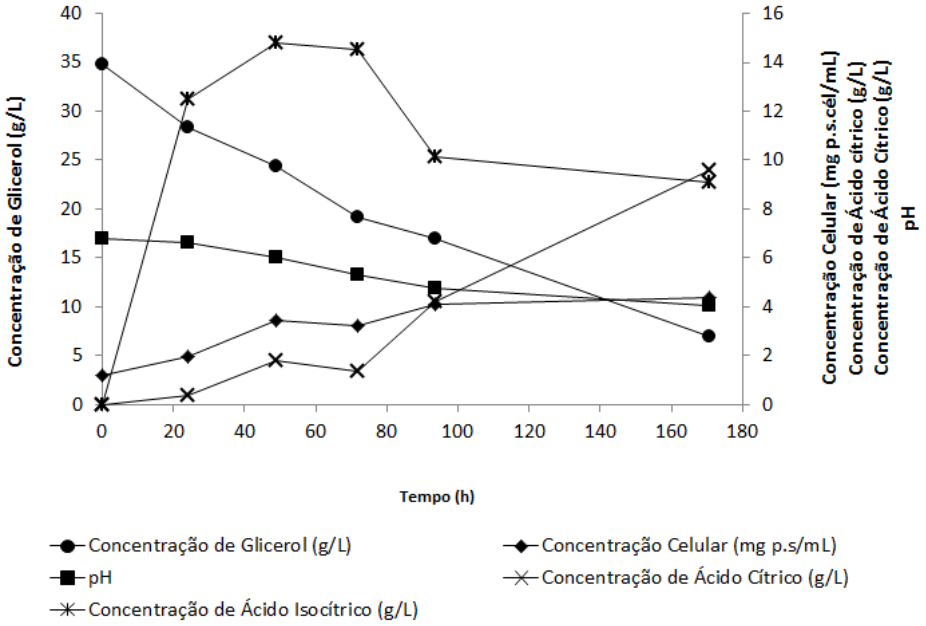

Figura 5.11– Perfil de concentração celular, consumo de glicerol, produção de ácidos cítrico e isocítrico e pH do experimento com *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 em shaker, utlizando o meio descrito por Da Silva (2010) na ausência de sesamol. Os pontos das curvas representam a média dos ensaios realizados em triplicata. (A linha de cada curva não representa dados experimentais, representa uma tendencia do perfil)

A Figura 5.12 ilustra os resultados cinéticos obtidos por *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 em meio descrito por Da Silva (2010) adicionado de sesamol 1,5 mM. Observou-se que a adição deste componente ao meio de cultivo reduziu a produção máxima de ácido cítrico para 6,14 g/L (170 h) em relação ao teste na ausência de sesamol. A produção de ácido isocítrico foi de 9,39 g/L em 170 h, similar ao processo em meio isento de sesamol, conforme é mostrado na Tabela 5.7. A partir dos dados apresentados nas Figuras 5.11 e 5.12, é possível identificar que a presença de sesamol interferiu na produção de ácido isocítrico, retardando o início da sua produção. Em 24 h de fermentação, a produção de ácido isocítrico foi 3,07 vezes maior para o cultivo feito na ausência de sesamol em relação ao meio ausente de sesamol. A presença de sesamol na concentração testada afetou o crescimento celular reduzindo em toda a cinética do processo e alcançando 3,18 g/L em 170 h de fermentação. Os valores de pH foram similares ao bioprocesso conduzido na ausência de sesamol.

Analisando os dados apresentados na Tabela 5.7 e nas Figuras 5.11 e 5.12, foi possível identificar que a adição de sesamol não favoreceu a produção de ácido cítrico. Logo, não sendo interessante acrescentar este componente ao meio de produção. A produção máxima de ácido isocítrico foi similar para as duas condições experimentais, sendo 14,82±0,53 g/L em 48 h para o experimento realizado na ausência de sesamol e 14,06± g/L em 72 h para o experimento realizado na presença de sesamol. Para ambas as condições experimentais a concentração de ácido isocítrico obtida foi maior que a produção de ácido cítrico.

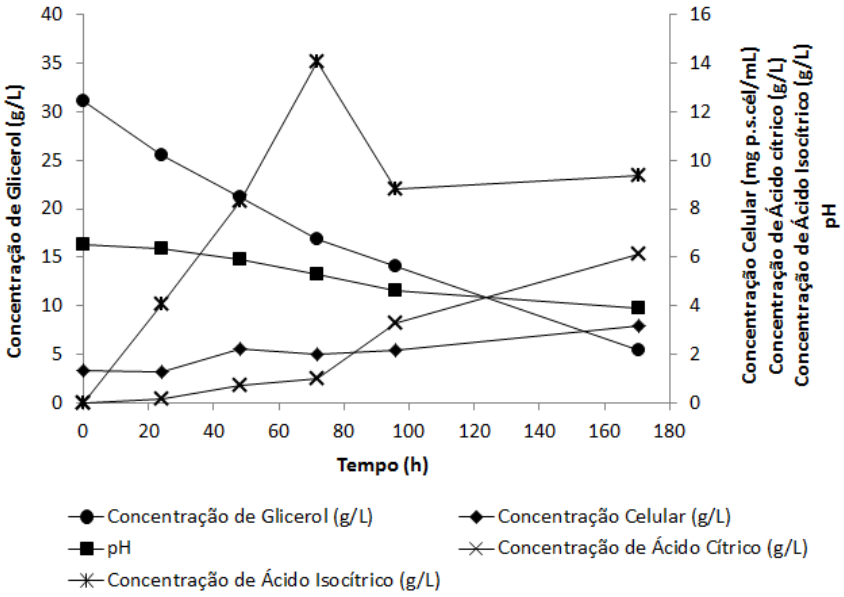

Figura 5.12– Perfil de concentração celular, consumo de glicerol, produção de ácidos cítrico e isocítrico e pH do experimento com *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 em shaker, utlizando o meio descrito por Da Silva (2010) na presença de sesamol 1,5 mM. Os pontos das curvas representam a média dos ensaios realizados em duplicata. (A linha de cada curva não representa dados experimentais, representa uma tendencia do perfil).

Tabela 5.7 – Parâmetros Cinéticos no ponto de máxima concentração de ácido cítrico (170 h) obtidos pelos experimentos na ausência e presença de 1,5 mM sesamol em meio descrito por Da Silva (2010).

Sesamol	P_{AC} (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Q_{AC} (g/L.h)	$Y_{P/X}$ (g/g)	$Y_{X/S}$ (g/g)	P_{AIC} (g/L)	$R_{AC/ISC}$
Ausência	8,64±0,01[a]	0,31	0,05	2,73	0,11	9,08±0,53[a]	0,95
Presença	6,14±0,4[b]	0,24	0,04	3,37	0,07	9,39±0,82[b]	0,65

[a]± Desvio Padrão da triplicata do experimento realizado na ausência de sesamol
b± Desvio Padrão da duplicata do experimento realizado na presença de sesamol

Com o propósito de estudar a influência de sesamol no acúmulo de lipídeo, *Y. lipolytica* foi cultiva em meio de cultivo em ausência e presença deste componente. A quantidade de lipídeo total da célula foi monitorada através do uso do corante *Nile Red* (NR) por citometria de fluxo (CF), segundo protocolo determinado no estudo de Martins (2013). A Figura 5.13 ilustra a resposta de fluorescência do NR dos experimentos isento ou na presença de 1,5 mM de sesamol no meio de cultivo ao longo de 170 horas de fermentação. Nota-se pelo gráfico que a quantidade de lipídeo total segue a mesma tendência durante o cultivo na presença ou ausência de sesamol na concentração estudada: houve um aumento gradativo do valor de intensidade de fluorescência de NR até 170 h de fermentação para ambos os testes realizados. Contudo, observa-se que a os valores de intensidade de fluorescência foram maiores durante toda a cinética de crescimento de *Y. lipolytica* para o experimento realizado na ausência de sesamol e o maior valor de resposta, aproximadamente 900, foi alcançado em 170 h de fermentação neste mesmo ensaio. Logo, os resultados apresentados mostram que a adição de sesamol interfere no metabolismo de produção de lipídeos (fase lipogênica), reduzindo a quantidade total obtida para aproximadamente a metade em 170 h. Porém, a adição deste componente ao meio de cultivo não favoreceu a produção de ácido cítrico e foi indiferente para a produção de ácido isocítrico, pois a concentração obtida foi similar para ambos os testes em 170 h (ausência e presença). Estes dados alcançados evidenciam que a presença de sesamol pode ter desviado o metabolismo de produção de lipídeo total para outro produto, que não foi identificado neste presente estudo.

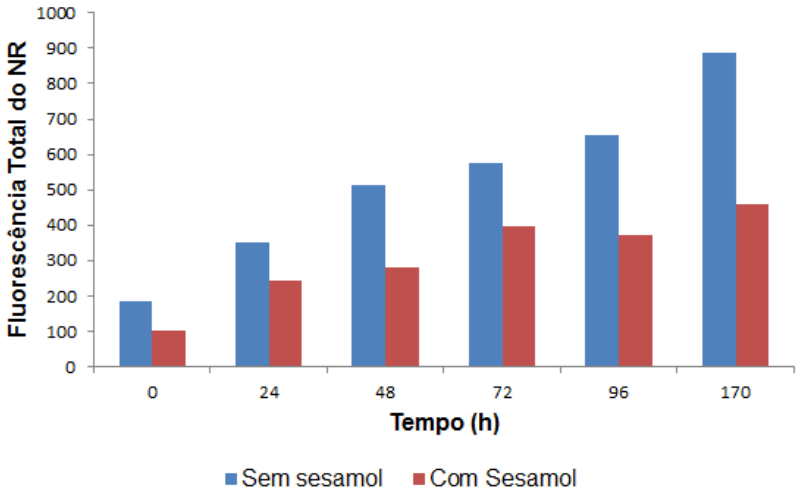

Figura 5.13 – Resultados obtidos para medida de fluorescência do *Nile Red* de células de *Yarrowia lipolytica* crescidas durante 170 h em meio ausente e presente de 1,5 mM de sesamol.

Correlacionando a intensidade do sinal de fluorescência obtida pela CF e a quantidade de lipídeos em células de *Y. lipolytica*, utilizando a técnica de extração de lipídeos por reação de transesterificação seguida de quantificação por CG-DIC, foi possível quantificar o teor de lipídeo total para ambos os experimentos. Os resultados são apresentados na Tabela 5.8, em que se verifica que a maior concentração de lipídeo (9,33 g de lipídeo/100 g de biomassa seca) foi alcançada em 170 h de experimento para o teste realizado na ausência de sesamol.

Tabela 5.8 - Teor lipídico obtido em células de *Yarrowia lipolytica* quando submetidas à reação de transesterificação e determinados por Cromatografia Gasosa.

Tempo (h)	Teor de Lipídico (g lipídeo/100 g biomassa seca)	
	Ausência de sesamol	Presença de sesamol
24	5,4	4,63
48	6,61	4,9
72	7,05	5,75
96	7,63	5,57
170	9,33	6,2

A Figura 5.14 apresenta o perfil de lipídeos polares e lipídeos neutros de células cultivadas na presença e ausência de sesamol durante 170 horas de experimento. Foi possível notar que os dados obtidos para a intensidade de fluorescência dos lipídeos polares, detectada por FL3, apresentam valores mais baixos na presença de 1,5 mM de sesamol em relação ao meio sem sesamol. Uma vez que o lipídeo polar é constituinte da parede celular da célula, este

resultado é corroborado com a cinética de crescimento celular ilustrada pelas Figuras 5.11 e 5.12, onde se observa maior concentração celular para o experimento sem sesamol. Logo, a intensidade de fluorescência de NR emitida por células cultivadas em meio sem sesamol foi maior. Os valores obtidos para a intensidade de fluorescência dos lipídeos neutros, detectados por FL2, para ambos os testes experimentais, apresentam-se relativamente baixos no início, já que, neste momento a célula está em fase exponencial de crescimento e seu metabolismo está direcionado para a obtenção de biomassa. O valor de fluorescência detectado por FL2 para o experimento realizado na ausência de sesamol aumenta gradativamente até atingir seu valor máximo (aproximadamente 502) em 170 horas, momento em que a célula está na fase estacionária, como determinado pela Figura 5.11. Na presença de sesamol, a fluorescência de FL2 apresenta valores inferiores, indicando uma produção menor de corpúsculos lipídicos (lipídeo neutro).

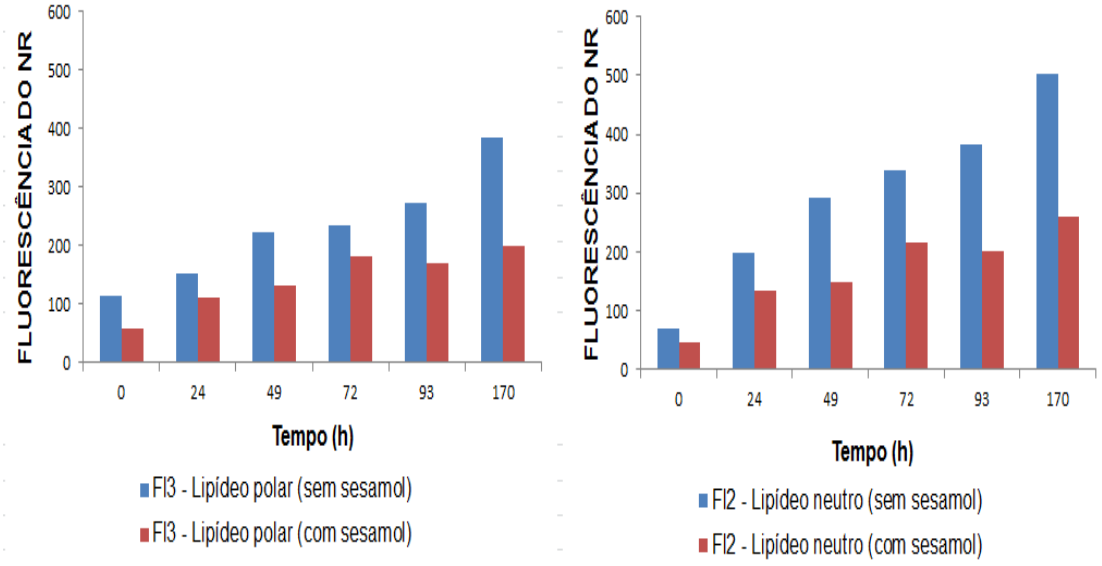

Figura 5-14: Perfil do teor de lipídeos polares e neutros de células da levedura *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 cultivada em meio descrito por Da Silva (2010) na ausência e presença de sesamol a 28ºC, 250 rpm durante 170 horas.

5.4 Proteoma mitocondrial de *Y. lipolytica*

Para verificar o proteoma mitocondrial de células de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, foram propostos dois meios de cultivo de forma a comparar as respostas. O primeiro meio de cultivo, definido como YPG é composto por 1% p/v de extrato de lêvedo, 2% p/v de peptona e 3%v/v de glicerol PA. Esse foi utilizado como experimento controle, por ser um meio rico, destinado à proliferação celular e que não favorece a produção de ácido cítrico por

Yarrowia lipolytica. Para o segundo meio de cultivo utilizado, a levedura do presente estudo tem habilidade de produzir ácido cítrico e este meio foi determinado por Da Silva (2010). O objetivo deste estudo foi realizar uma análise comparativa do proteoma mitocondrial em células de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 cultivada em ambos os meios de crescimento.

Parâmetros cinéticos obtidos pelo cultivo de *Y. lipolytica* em YPG e meio proposto por Da Silva (2010):

O consumo de glicerol, pH e produção de ácidos orgânicos por *Y. lipolytica* foram acompanhados em ambos os meios de cultivo utilizados. A levedura foi cultivada em meio YPG por 48 h, a 28 ºC e 160 rpm e no meio de Da Silva (2010) por 96 h a 28ºC e 250 rpm, ambos em agitador rotatório (shaker). Foram utilizados 4L de meio de cultivo para o teste em questão e ambos os experimentos foram inoculados com 1 mg p.s.cél/mL, aproximadamente, de células cultivadas em YPD como descrito em Materiais e Métodos na seção 4.3.2. Os experimentos foram realizados em triplicata.

A Figura 5.15 apresenta a cinética de consumo de glicerol e a concentração celular alcançada por *Y. lipolytica* em meio YPG. Observou-se que o consumo de glicerol foi de 13,09 g/L e a concentração celular atingiu 8,12 mg p.s.cél/mL em 48 h de experimento. Em comparação ao experimento conduzido no meio de Da Silva (2010) (Figura 5.11) neste mesmo tempo, houve um maior consumo de glicerol e 3,64 vezes maior produção de biomassa.

A cinética de pH foi acompanhada e observou-se que o valor deste parâmetro reduziu de 6,29 para 4,07 quando *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 foi cultivada em YPG em 48 h de fermentação (Figura 5.15). Com o propósito de verificar se esta redução de pH do meio de cultivo estaria relacionada com a produção de ácidos orgânicos, amostras foram analisadas em HPLC. Entretanto, foi identificado que em 48 h essa cepa não produziu os ácidos orgânicos testados, conforme pode ser visto na Tabela 5.9 e nos cromatogramas gerados e apresentados pelas Figuras 5.16, 5.17, 5.18 e 5.19. Os dados apresentados para concentração celular e produção de ácidos orgânicos mostram que em condições abundantes de fontes de nitrogênio, o metabolismo desta cepa foi direcionado para obtenção de energia e produção de biomassa. Pode-se supor que, nesta condição, a enzima NAD^+isocitrato desidrogenase não foi inibida uma vez que o seu ativador AMP se apresentou em concentrações suficientes para ativá-la, pois o meio era abundante em nitrogênio.

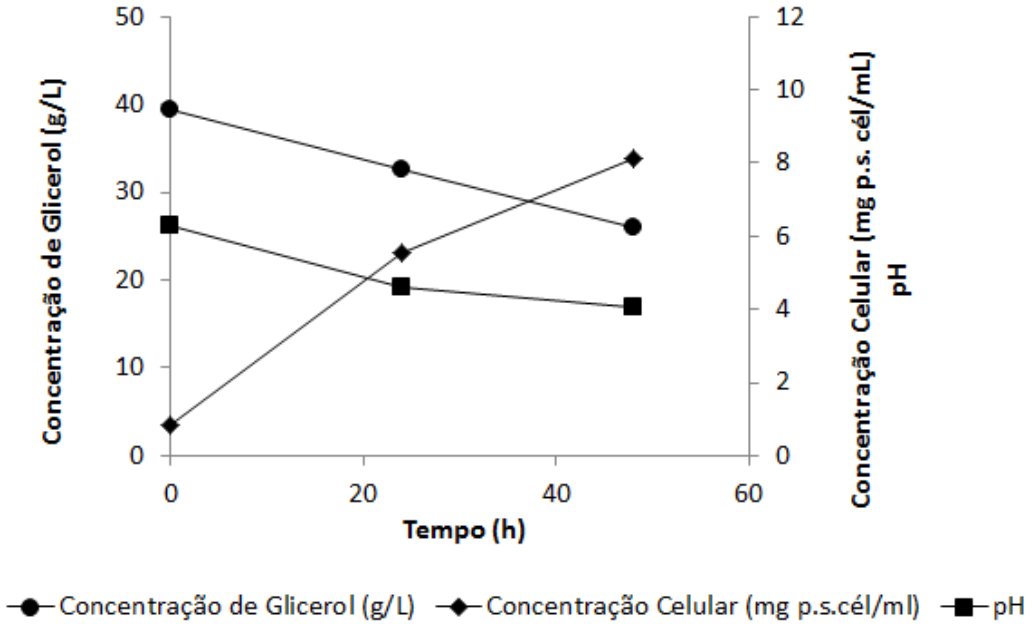

Figura 5.15 – Perfil de consumo de glicerol, concentração celular e pH por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 cultivada em meio YPG e em agitador rotatório (shaker) (A linha de cada curva não representa dados experimentais, representa uma tendencia do perfil).

Tabela 5.9 – Tempo de Retenção em minutos dos padrões de Ácidos Orgânicos injetados em HPLC

Padrão	Ácido Oxálico	Ácido Cítrico	Ácido Isocítrico	Ácido Succínico	Ácido Lático	Ácido Acético
TR (min)	5,4	5,945	5,944	8,42	9,26	10,99

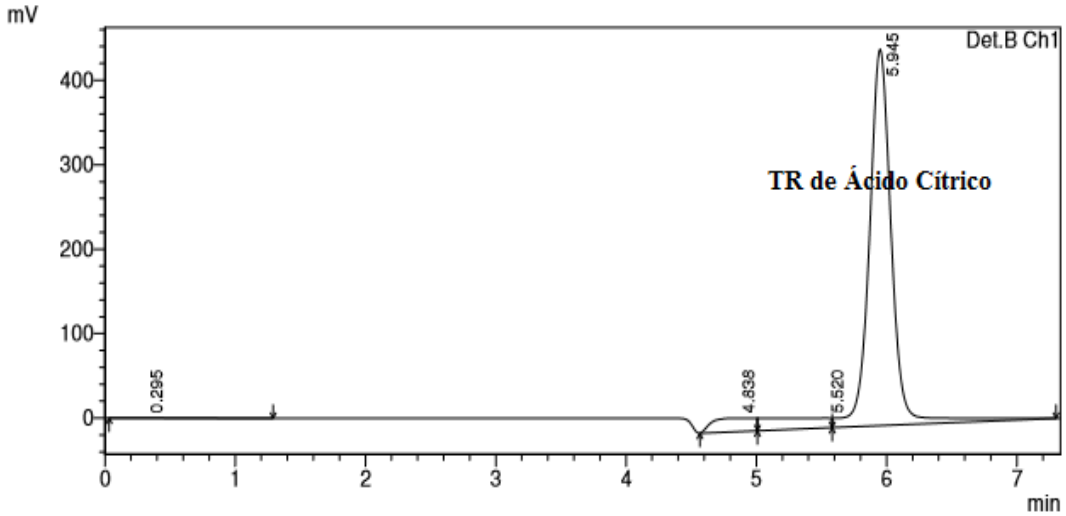

Figura 5.16. Cromatograma em HPLC do padrão Ácido Cítrico na concentração 20 g/L

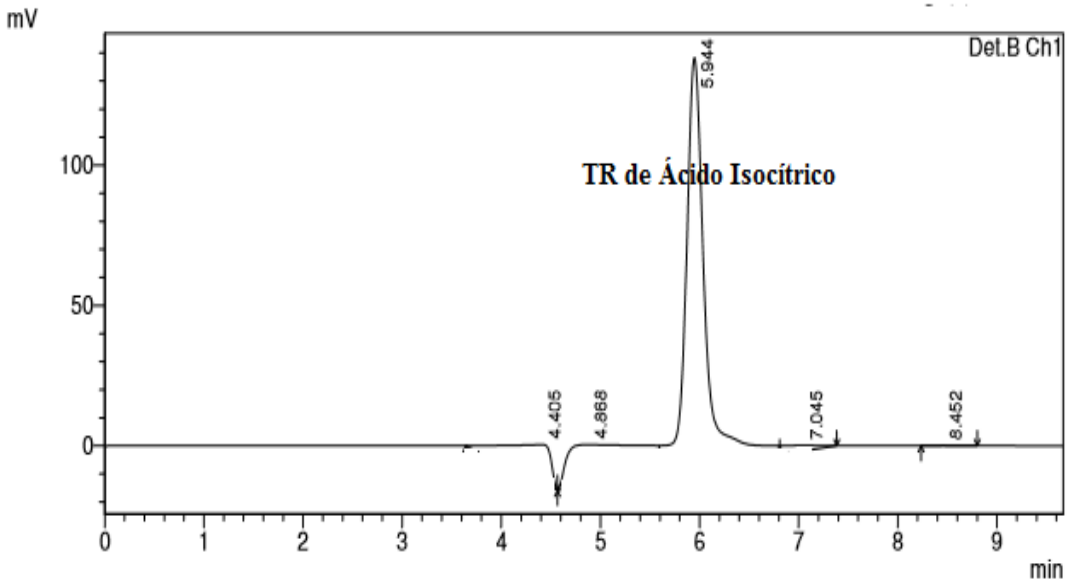

Figura 5.17. Cromatograma em HPLC do padrão Ácido Isocítrico na concentração 10 g/L

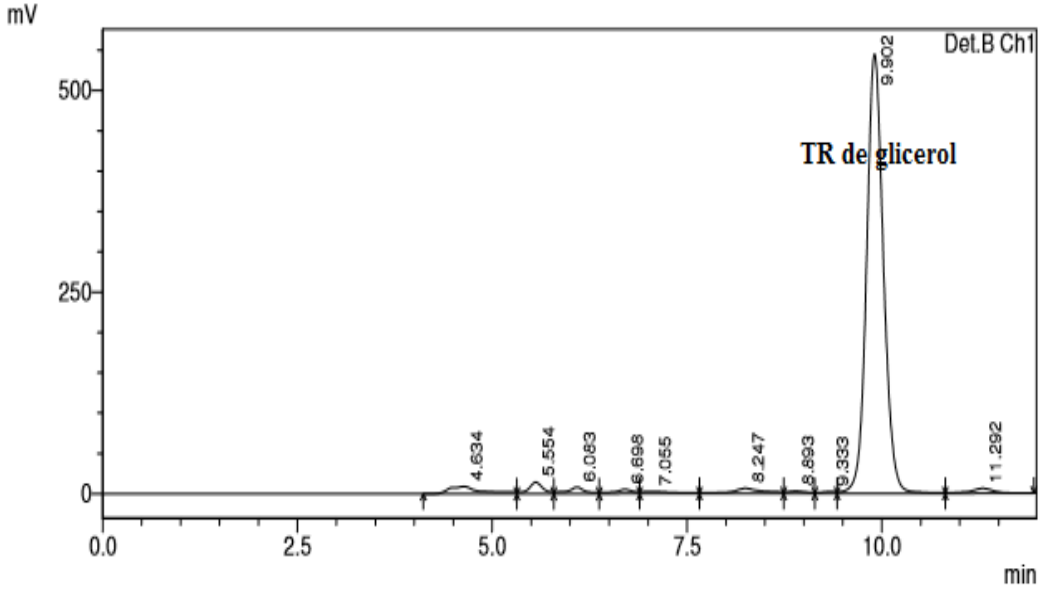

Figura 5.18. Cromatograma em HPLC do meio YPG no tempo 0 horas de processo

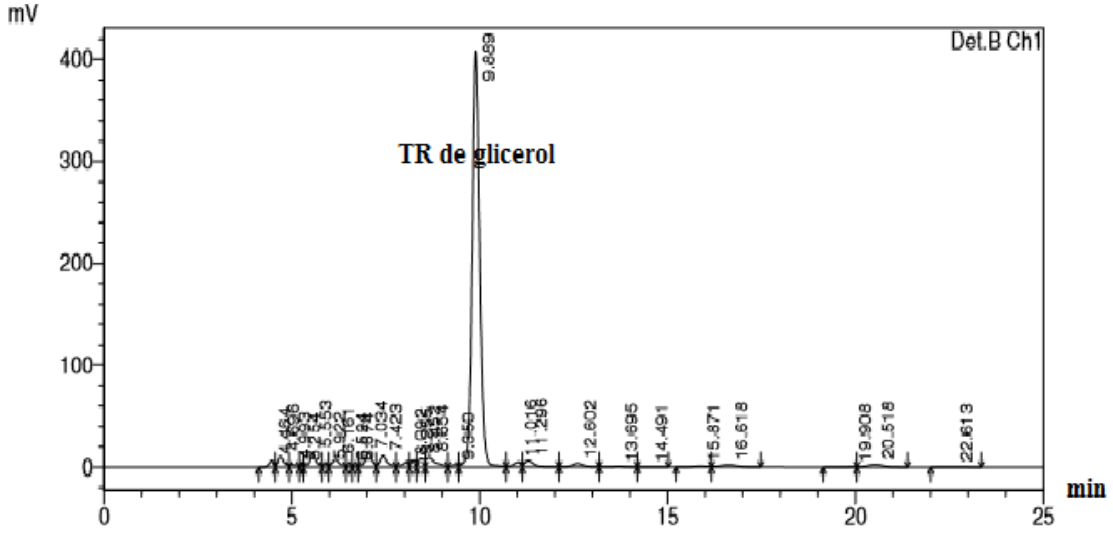

Figura 5.19. Cromatograma em HPLC do meio YPG após 48 horas de processo

Verificação da lise celular de *Y. lipolytica*:

A realização do proteoma mitocondrial das células de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 depende da lise celular e isolamento da organela mitocôndria. Portanto, foi utilizada a metodologia proposta por Meisinger *et al*. (2005) com algumas modificações e descrita no item 4.8.7 para o rompimento da célula e isolamento desta organela. Com o propósito de verificar a lise celular, realizou-se microscopia ótica com aumento de 1000X das células de *Y. lipolytica* cultivadas em meio YPG e em meio de produção de ácido cítrico (Da Silva, 2010) após serem submetidas ao tratamento descrito no item 4.8.7.

O protocolo descrito por Meisinger *et al.* (2005), informa a utilização de 3 mg da enzima zymolyase-20T por grama de massa úmida de células para lisar células de *Sacharomyces cerevisiae*. Entretanto, esta proporção não foi suficiente para lisar a cepa *Y. lipolytica* IMUFRJ50682. Testes foram realizados aumentando a quantidade de enzima necessária para promover o rompimento celular. As quantidades utilizadas foram 3 mg, 5mg, 10 mg e 15 mg por grama de massa úmida de células e o melhor resultado foi encontrado na proporção 10 mg por grama de massa úmida de células. A verificação da lise celular foi realizada por microscopia ótica.

Os extratos celulares de ambos os meios de cultivo (sem produção e com produção de ácido cítrico) foram submetidos por 45 min à quantidade previamente determinada de enzima zymoliase 20-T para promover o rompimento da parede celular e formação de esferoplasto, que foi verificada por microscopia ótica com aumento de 1000X, conforme pode ser visto nas fotos apresentadas nas Figuras 5.20, 5.21, 5.22 e 5.23. As Figuras 5.20 e 5.21 se referem à microscopia da cultura cultivada em YPG após 48 h de fermentação, antes e após tratamento com a enzima zymoliase 20-T, respectivamente. As Figuras 5.22 e 5.23 se referem à microscopia da cultura no meio de Da Silva (2010) após 96 h de cultivo, antes e após

tratamento com a enzima zymoliase 20-T, respectivamente. A partir dos resultados apresentados por estas microscopias, pode-se afirmar que a parede da célula desta levedura foi lesionada após ser submetida por 45 min a ação da enzima zymoliase 20-T na concentração de 10 mg de enzima por grama de massa úmida de células.

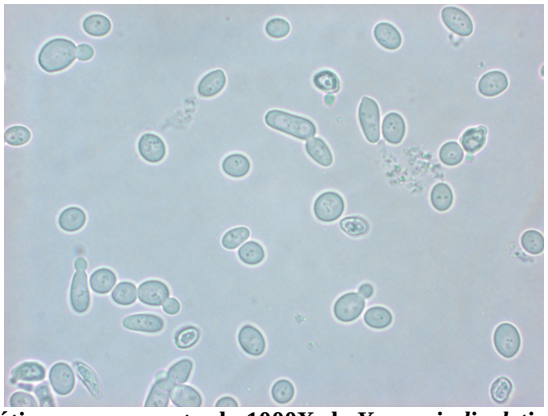

Figura 5.20 - Microscopia ótica com aumento de 1000X de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 cultivada em YPG após 48 h de cultivo, sem tratamento com a enzima zymolyase 20-T.

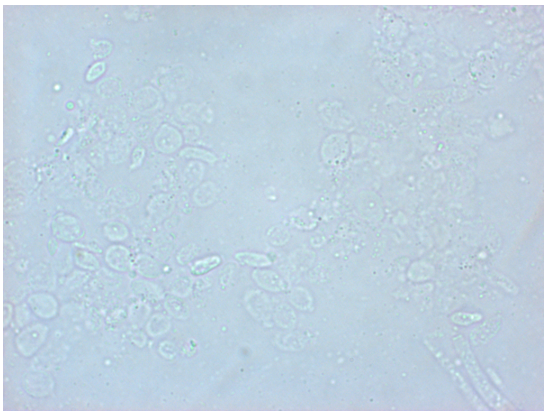

Figura 5.21 - Microscopia ótica com aumento de 1000X de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 cultivada em YPG após 48 h de cultivo, submetida ao tratamento com a enzima zymolyase 20-T por 45 min

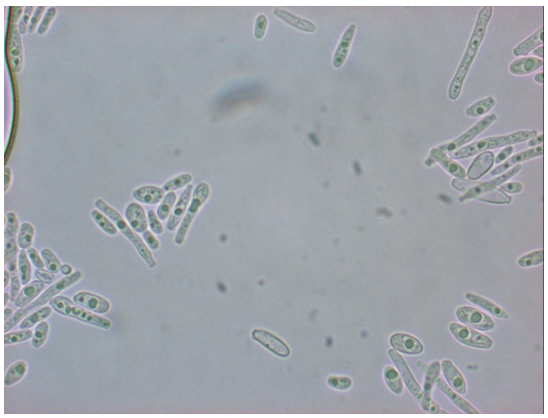

Figura 5.22 – Microscopia ótica com aumento de 1000X de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 cultivada em meio proposto por Da Silva (2010) após 96 h de cultivo, sem tratamento com a enzima zymolyase 20-T

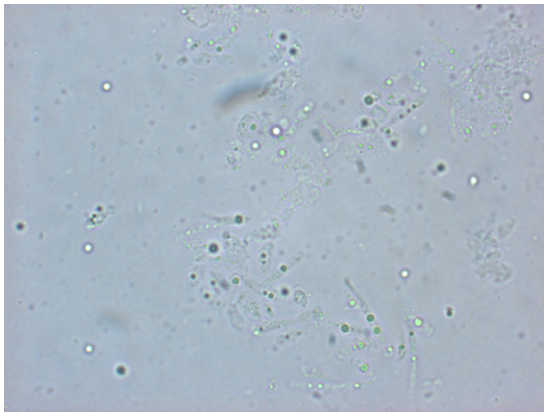

Figura 5.23 - Microscopia ótica com aumento de 1000X de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 cultivada em meio proposto por Da Silva (2010) após 96 h de cultivo, submetida ao tratamento com a enzima zymolyase 20-T por 45 min

Outro teste foi realizado para verificar o nível de degradação da parede celular de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 promovido pelo tratamento com 10 mg de zymolyase 20-T por grama de massa úmida de células em 45 min, adicionando 50 µL de suspensão de células, antes e após o tratamento enzimático, a 2 mL de água. Após 45 min de incubação, a solução tratada mostrou-se translúcida devido à disrupção osmótica dos esferoplastos e a solução não tratada continuou turva. Mensurando a densidade ótica (DO) a 570 nm de cada solução, foi verificado que a razão entre os valores lidos de DO para solução não tratada e tratada com a enzima foi superior a 3:1, condição considerada ideal que confirma o rompimento da parede celular, segundo Meisinger *et al.* (2005).

Através das Figuras 5.20 e 5.22, foi possível identificar diferença morfológica entre células crescidas em YPG (mais ovoides e grandes) e as crescidas em meio para produção de ácido cítrico (menores e mais alongadas) denotando possível estresse nutricional por excassez de nitrogênio.

Purificação da fração mitocondrial em um gradiente de densidade com Sacarose

Após o tratamento enzimático, o extrato celular contendo esferoplastos foi separado por centrifugação a 3.000 *g* por 5 min, lavado com tampão Zymolyase pH 7,4, novamente centrifugado a 3.000 *g* por 5 min e o pellet formado foi resuspenso em tampão de homogeneização. Esta suspensão, por sua vez, foi submetida à ação de um potter (homogeneizador de vidro) para promover o rompimento mecânico da membrana da célula. Posteriormente, esta suspensão foi submetida a diferentes valores de agitação na centrífuga para obter uma fração mitocondrial, que foi resupensa em tampão SEM (seção Materiais e Métodos, item 4.8.7).

Entretanto, esta fração mitocondrial é definida como bruta, uma vez que possui contaminações de outras organelas presentes no citoplasma da célula, por exemplo, retículo endoplasmático e vacúolo, bem como de membrana plasmática (MEISINGER *et al.*, 2005).

Portanto, a suspensão mitocondrial bruta foi purificada via gradiente de densidade com sacarose. No topo do gradiente de sacarose, foi adicionada a suspensão mitocondrial bruta, que foi centrifugada a 134.000 *g* por 1 h a 2ºC. Após centrifugação, a mitocôndria foi separada e coletada com auxílio de pipeta Pasteur da interface 60%/32% do gradiente de sacarose (Figura 5.24).

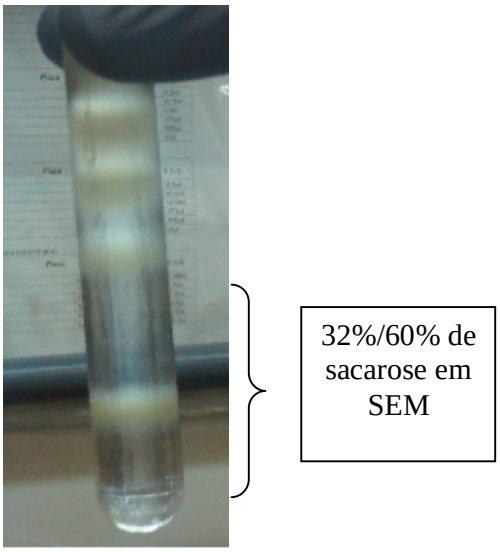

Figura 5.24 – Resultado da centrifugação do gradiente de densidade com sacarose a 134.000 *g* por 1 h a 2ºC da fração mitocondrial isolada de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682

<u>Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-page)</u>

A fração mitocondrial pura, obtida após purificação em gradiente de densidade de sacarose, foi resuspensa no reagente de extração de proteína tipo 4 da Sigma-Aldrich (uréia, tiouréia, Trizma® e detergente C7BzO). O extrato protéico, cujo volume continha 100 µg de proteínas foi aplicado ao gel de 12% de SDS-poliacrilamida para eletroforese. Após a corrida, o gel foi submetido à coloração em uma solução coloidal de azul de Coomassie e, posteriormente, foi descorado em solução contendo metanol 43% e ácido acético 7,5%.

As imagens A e B da Figura 5.25 mostram as bandas referentes às supostas proteínas de mitocôndria de células de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 cultivadas em meio YPG e meio descrito por Da Silva (2010), respectivamente. Observou-se uma diferença na abundância de proteínas na região próxima à 45 kDa, 30 kDa e 14 kDa.

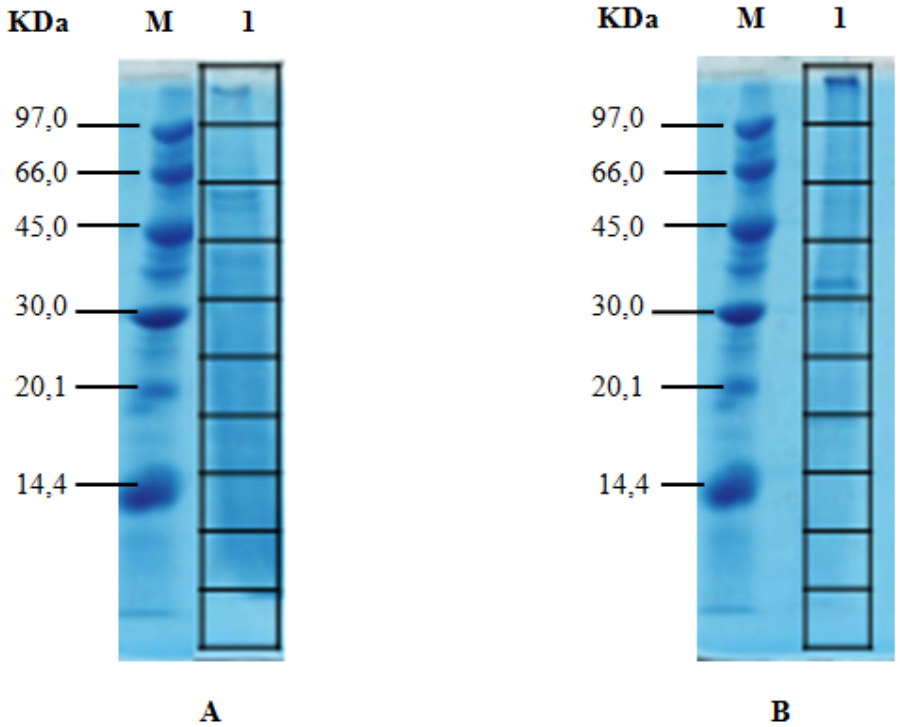

Figura 5.25 - Perfil 1-DE das proteínas extraídas das frações mitocôndrias puras de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682. (A) 1. Proteínas de mitocôndria de células cultivadas em YPG; (M) Padrão de peso molecular. (B) 1. Proteínas de mitocôndria de células cultivadas em meio proposto por Da Silva (2010); (M) Padrão de peso molecular. A quantidade de proteínas aplicada em cada coluna foi de 100 µg.

<u>Análise dos peptídeos por Nano-LC-ESI-Q/TOF</u>:

Os peptídeos provenientes das bandas dos géis 1D foram analisados no espectrômetro de massas do tipo ESI-Q/TOF. A fração mitocondrial isolada de células de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 cultivadas nas duas condições de processo tiveram as suas proteínas identificadas por Espectrometria de Massas. As buscas foram feitas no banco de dados MASCOT. A massa molecular e o pI teóricos foram identificados pelo MASCOT. As funções e a localização subcelular de cada proteína foram obtidas do banco de dados UNIPROT e de dados retirados da literatura. As vias metabólicas a qual a proteína é envolvida foram identificadas com a Enciclopédia de Kioto de Genes e Genoma (KEGG) e as proteínas foram agrupadas em categoria de acordo com KEGG.

A análise das proteínas detectadas pela digestão tríptica e espectrometria de massas permitiu a identificação de 45 e 47 proteínas para a fração mitocondrial obtida de células cultivadas em YPG e no meio de Da Silva (2010), respectivamente, sendo 13 proteínas comuns às duas condições de cultivo, totalizando 32 e 34 proteínas diferentes para a fração mitocondrial obtida de células cultivadas em ambas as condições, respectivamente (Figura 5.26).

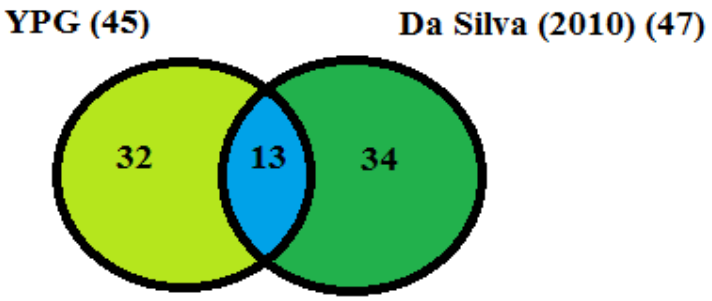

Figura 5.26 - Número total de proteínas comuns e de proteínas únicas para cada fração mitocondrial de células de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 cultivadas em YPG e em meio proposto por Da Silva (2010).

Categoria e processo biológico das proteínas identificadas no estudo proteômico:

As proteínas identificadas foram classificadas em categorias de acordo com as suas funções: Metabolismo de carboidrato; Metabolismo energético; Metabolismo de Aminoácido; Metabolismo de Lipídeo; Tradução; Transporte em Membrana; *Folding, Sorting and degradation* e Transporte e Catabolismo.

As categorias com maior número de proteínas foram Metabolismo Energético, Tradução, Metabolismo de Carboidrato e Dobrável, Triagem e Degradação (*Folding, Sorting and Degradation*) para a fração mitocondrial de células cultivadas em YPG (controle) e Metabolismo Energético e Metabolismo de Carboidrato para a fração mitocondrial de células cultivadas no meio de produção que proporcionou produção de ácido cítrico (Da Silva, 2010). O número total de proteínas de cada categoria para as duas condições experimentais é mostrado na Figura 5.27. Observou-se um número maior de proteínas, 6, envolvidas no Metabolismo de Carboidrato, na fração mitocondrial de células cultivadas no meio de produção (Da Silva, 2010) em relação à fração mitocondrial obtida no experimento controle (3 proteínas).

Proteína classificada na categoria Metabolismo de Lipídeo foi identificada somente na fração mitocondrial do experimento controle. A não determinação de proteínas pertencentes a esta categoria na fração mitocondrial isolada de células cultivadas em meio de produção de ácido cítrico (Da Silva, 2010) pode ser explicada pelo fato do acúmulo e excreção de maior quantidade de ácido cítrico estar relacionada com a inativação da via metabólica de formação de lipídeos, uma vez que o ácido cítrico é precursor desta via que ocorre no citoplasma da célula. Outra suposição seria que a técnica utilizada para separação e detecção de proteínas neste estudo não ser sensível para detectar proteínas menos abundantes.

Proteínas classificadas nas categorias Metabolismo de Aminoácidos, Transporte e Catabolismo e Transporte em Membrana foram identificadas somente em fração mitocondrial de células cultivadas no meio de produção de ácido cítrico. Observou-se um número maior de 3 proteínas, envolvidas na categoria Dobrável, Triagem e Degradação (*Folding, Sorting and*

degradation), na fração mitocondrial do experimento controle em relação à fração mitocondrial do experimento de produção de ácido cítrico (1 proteína).

A categoria Tradução apresentou maior quantidade de proteínas para o experimento controle (6) enquanto que a fração mitocondrial obtida do experimento de produção de ácido cítrico apresentou 1 proteína. Não houve diferença significativa em termos de quantidade na categoria Metabolismo Energético entre as duas condições estudadas. Os bancos de dados consultados (UNIPROT e KEGG) não forneceram a informação a que categoria pertencia 21 e 22 proteínas dos experimentos controle e de produção de ácido cítrico, respectivamente.

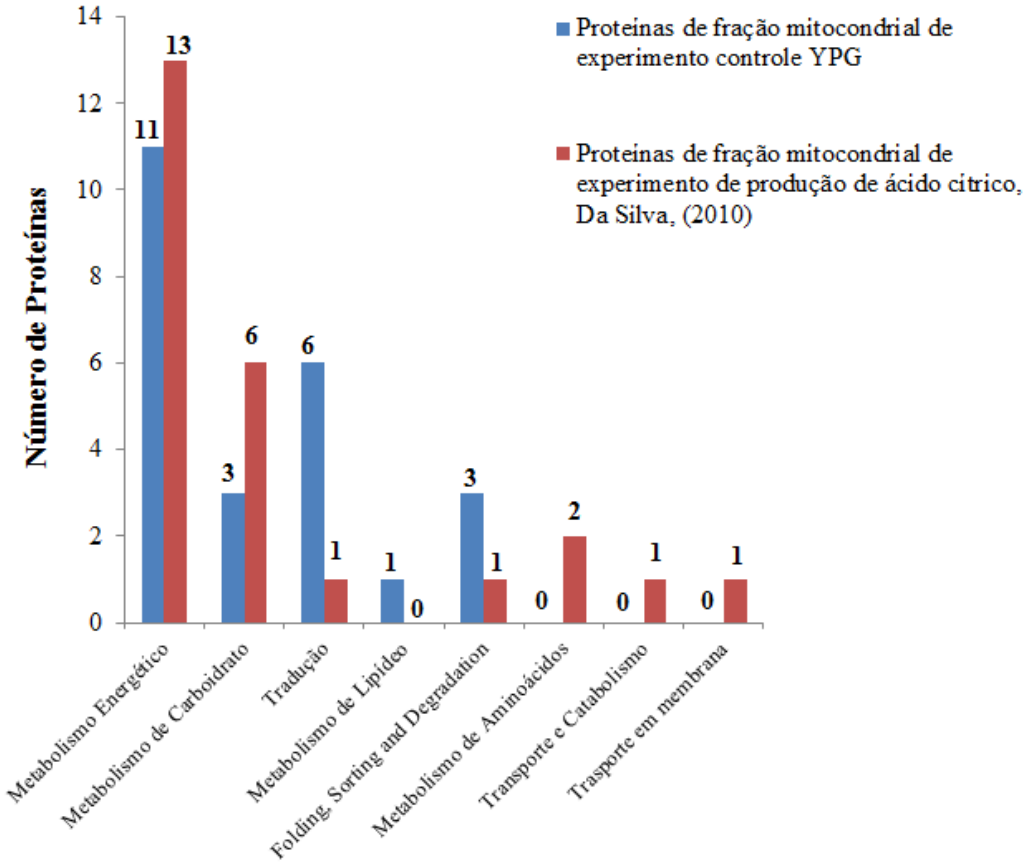

Figura 5.27 - Classificação, baseada no KEGG, em categorias de proteínas identificadas pelo modo em frações mitocondriais de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682. (■) Proteínas de fração mitocondrial de células cultivadas em experimento controle (YPG); (■) Proteínas de fração mitocondrial de células cultivadas em experimento de produção de ácido cítrico, Da Silva (2010). Os números acima das colunas representam o número de proteínas identificadas para cada categoria.

As proteínas foram classificadas de acordo com o processo biológico a qual estão relacionadas e observou-se a que a maioria das proteínas identificadas na fração mitocondrial isolada do experimento controle participa do Processo de síntese de ATP, Síntese de ATP acoplada a transporte de próton, Ciclo do Ácido Tricarboxílico, Biossíntese de Proteína, Processo Metabólico de glicerol-3-fosfato, Transporte Transmembranar, Enovelamento de

Proteínas, ATP *binding*, Processo biossintético de cobalamina, Biossíntese de ácidos graxos, Regulação de transcrição, Resposta a estresse, Tradução (Tabelas 1 do anexo I).

Na fração mitocondrial isolada de células cultivadas no meio de produção de ácido cítrico, os processos biológicos a qual as proteínas identificadas fazem parte são Processo de síntese de ATP, Síntese de ATP acoplada a transporte de próton, Ciclo do Ácido Tricarboxílico, Biossíntese de Proteína, Transporte Transmembranar, Enovelamento de Proteínas, ATP *binding*, Homeostase Redox Celular, Processo Metabólico de Aminoácido, Biogênese Mitocondrial (Tabelas 2 do anexo I).

Localização subcelular das proteínas identificadas:

A localização subcelular das proteínas identificadas foi investigada para se verificar se todas eram proteínas mitocondriais ou pertenciam a diferentes compartimentos celulares. A localização destas proteínas foi realizada através do banco de dados UNIPROT e evidências experimentais.

De 45 proteínas identificadas na fração mitocondrial do experimento controle por este estudo proteômico, 18 tiveram sua localização identificada na mitocôndria, 4 foram localizadas no ribossomo e 5 no citoplasma (Figura 5.28). Na fração mitocondrial obtida de células cultivadas no experimento de produção de ácido cítrico, 31 foram localizadas na mitocôndria. Actina (gi|32127383, Tabela 2 do anexo I), localizada no citoesqueleto, foi somente detectada na fração mitocondrial obtida de células cultivadas no meio de Da Silva (2010) (Figura 5.29).

Um número de proteínas detectadas nas frações mitocondriais neste presente estudo tem sido descrito até o momento para outros compartimentos subcelulares. Entretanto, similiar resultado foi encontrado na preparação mitocondrial de *Sacharomyces cerevisiae* no estudo realizado por Ohlmeier *et al.* (2004).

A identificação de proteínas não-mitocondriais neste presente estudo proteômico supõe que a fração mitocondrial apresentava contaminação devido a purificação mitocondrial ter ocorrido de forma incompleta. Outra suposição é a existência de uma interação física da mitocôndria com outros compartimentos celulares e a existência de proteínas com localizações múltiplas (ACHLEITNER *et al.*, 1999). Esta conclusão é sustentada por estudos anteriores que mostram específicas interações entre mitocôndria e ribossomos (LITHGOW, 2000; MARC *et al.*, 2002), retículo endoplasmático (ACHLEITNER *et al.*, 1999) e citosqueleto (RABILLOUD *et al.*, 1998).

A localização subcelular de todas as proteínas identificadas foi sumarizada na Figura 5.28 e 5.29, que apresenta a classificação em mitocondrial, citoplasmática, de membrana, ribossômica e proteína de localização desconhecida.

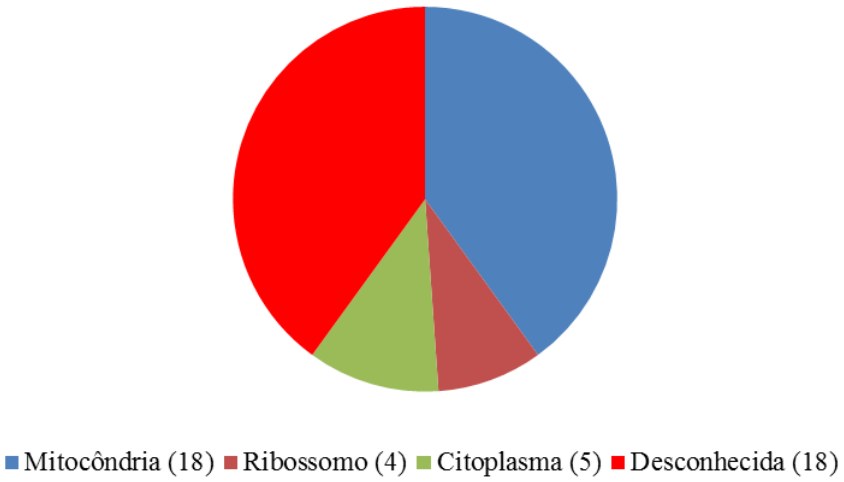

Figura 5.28 – Resumo da localização subcelular de todas as proteínas identificadas na fração mitocondrial de células de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 cultivada em experimento controle (YPG)

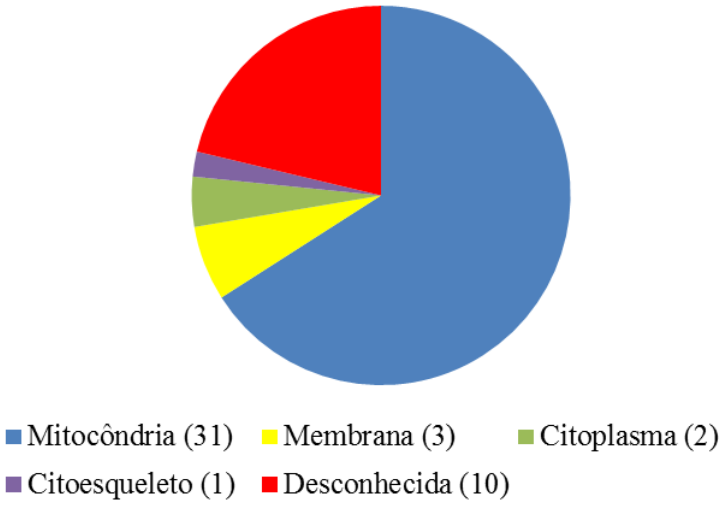

Figura 5.29 – Resumo da localização subcelular de todas as proteínas identificadas na fração mitocondrial de células de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 cultivada em experimento descrito por Da Silva (2010) para produção de ácido cítrico.

Para identificar se houve uma purificação adequada da fração mitocondrial torna-se necessário realizar técnicas de confirmação, por exemplo, *Western blot* usando anticorpos específicos da proteína marcadora de organelas ou Microscopia Eletrônica.

Presença de proteínas em diferentes bandas:

Algumas proteínas foram detectadas em diferentes bandas do gel unidimensional para a mesma condição experimental e este resultado foi apresentado para ambas às condições de cultivo. Comparando com os valores das proteínas padrão, a presença de proteínas de massa molecular superior em bandas do gel unidimensional entre valores de massa molecular

inferior pode indicar que occoreu fragmentação proteica durante o processo de preparação da amostra antes de ser aplicada no gel. Um exemplo é a presença da proteína YALI0B22066p, identificada em ambas as frações mitocondriais, em diferentes bandas. A massa molecular teórica desta proteína é 99,54 kDa, porém foi identificada nas bandas 2, 11, 12, 13, 14, 15, 16 e 17 (Figura 5.25 e Tabelas 1 e 2 do anexo I), cujas massas moleculares aceitáveis são inferiores ao valor teórico determinado pelo banco de dados MASCOT. Este fenômeno foi descrito em estudo anterior (Ohlmeier *et al.*, 2004).

A proteína YALI0D08228p (ADP/ATP proteína transportadora adenina nucleotídeo translocator) de massa molecular teórica 33,356 kDa foi localizada na banda 11 do gel unidimensional, correspondendo a amostra proteica da fração mitocondrial do meio de produção de ácido cítrico. Entretanto, a massa molecular aceitável para esta banda era superior a 97 kDa, comparando com as massas das proteínas padrão (Figura 5.25). Durante o preparo da amostra, pode ter ocorrido a formação de dímero entre os peptídeos desta proteína, explicando a presença desta proteína de baixa massa molecular em banda que aceita proteína de massa molecular superior.

Proteínas Relacionadas à Produção de Ácido Cítrico:

Neste estudo proteômico foi proposto duas condições experimentais de cultivo para a levedura *Y. lipolytica* IMUFRJ50682: meio YPG, onde não foi detectada a produção de ácido cítrico e o meio descrito por Da Silva (2010), onde verificou-se a produção de 5,05 g/L de ácido cítrico e 10,12 g/L de ácido isocítrico em 98 h de experimento (Figura 5.11).

A tentativa de se verificar possíveis diferenças no proteoma mitocondrial nas duas condições experimentais foram propostas para se estudar a influência de proteínas existentes nesta organela para propor futuramente melhorias na produção de ácido cítrico por esta cepa de levedura. Trinta e quatro diferentes proteínas foram detectadas no extrato mitocondrial obtido de células de levedura cultivadas no meio de produção de ácido cítrico como se pode verificar na Tabela 5.10.

A proteína YALI0D08228p (ADP/ATP *carrier protein adenine nucleotide translocator*) foi encontrada apenas na fração mitocondrial de produção de ácido cítrico e participa do processo biológico transporte transmembranar e é pertencente a membrana interna da mitocôndria. A proteína YALI0A10659p, que também é uma proteína transportadora de ADP/ATP, participa do mesmo processo biológico e mesma localização da proteína citada anteriormente, foi identificada somente na fração mitocondrial de células cultivadas no meio YPG. Ambas apresentam características semelhantes como a massa molecular e pH teóricos que são 33,356 kDa e 32,967 kDa e 9,77 e 9,7, respectivamente (Tabelas 1 e 2 do anexo I). Ambas as proteínas presentes nas duas frações mitocondriais, isoladas de células cultivadas em condições diferentes, foram identificadas pelo banco de dados UNIPROT pertencer à levedura *Yarrowia lipolytica* CLIB122. Através deste resultado,

supõe-se que a condição de cultivo das células pode influenciar na composição das proteínas que desempenham a mesma função na célula.

As proteínas YALI0A01023p e YALI0B12188p participam do processo biológico de ligação de ATP (*ATP binding*) e possuem pI teóricos similares, porém possuem massas moleculares diferentes e a primeira pertence a família ATPase transportadora de cátions e a segunda a família transportadora ABC, mostrando que são protéinas diferentes. Ambas estão presentes na fração mitocondrial de células cultivadas no meio de produção de ácido cítrico (Tabela 5.10; Tabela 2 do anexo I). A única proteína identificada pertencendo à via metabólica de degradação de RNA (*RNA degradation*), que é englobada na categoria Processo de Informação Genética- Dobrável, Triagem e Degradação (*Folding, sorting and degradation*) foi a YALI0C17347p para o extrato mitocondrial de células no meio de produção de ácido cítrico.

A proteína gi|51012446 (aconitato hidratase mitocondrial) foi identificada apenas no extrato mitocondrial da levedura crescida em meio que favoreceu a produção de ácido cítrico. A enzima aconitase catalisa a isomerização reversível do citrato a isocitrato no ciclo do ácido tricarboxílico. A presença desta enzima apenas nesta condição corrobora com os resultados de produção dos ácidos, visto que esta condição experimental induziu a produção de ácidos cítrico e isocítrico. Pode se supor que a técnica proteômica não detectou esta enzima na condição de proliferação celular, pois não há acúmulo de citrato ou isocitrato. Portanto, o micro-organismo não tem a necessidade de expressar esta enzima em grande quantidade.

As proteínas YALI0D23683p (componente Acetiltransferase do complexo piruvato desidrogenase ou componente E2 piruvato desidrogenase, EC:2.3.1.12) e YALI0D20768p (diidrolipoil desidrogenase, EC:1.8.1.4, componente E3 piruvato desidrogenase) foram identificadas apenas no extrato mitocondrial das células cultivadas no meio de produção de ácido cítrico (Tabela 5.10). Estas enzimas pertencem ao complexo enzimático piruvato desidrogenase e sua localização foi determinada pelo UNIPROT na matriz mitocondrial, corroborando a literatura. Segundo Lehninger, Nelson e Cox (2003) o complexo piruvato desidrogenase está localizado na matriz mitocondrial dos eucarióticos. Berendzen *et al.* (2006) sugerem que sua localização está no espaço intermembrana e não na matriz das mitocôndrias.

A função do complexo piruvato desidrogenase é catalisar a conversão total do piruvato a acetil-CoA e gás carbônico, segundo o banco de dados UNIPROT. Este complexo participa das vias metabólicas glicólise, gliconeogenese, metabolismo de piruvato, biossíntese de metabólitos secundários e ciclo do ácido tricarboxílico, como é ilustrado na Figura 5.30. Este complexo consiste em três enzimas distintas denominadas de piruvato descarboxilase (E1), diidrolipoil transacetilase (E2) e diidrolipoil desidrogenase (E3), e cinco coenzimas - tiamina pirofosfato (TPP - Thiamine PyroPhosphate) para E1, lipoato (grupo lipoil) e CoA-SH para

E2, FAD (Flavina Adenina Dinucleotídeo) e NAD^+ (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo) para E3 (LEHNINGER, NELSON e COX, 2003).

YALI0D20768p, além de participar do metabolismo de carboidrato atua no metabolismo de aminoácidos: metabolismo Glicina, serina e treonina e degração de valina, leucina e isoleucina (KEGG).

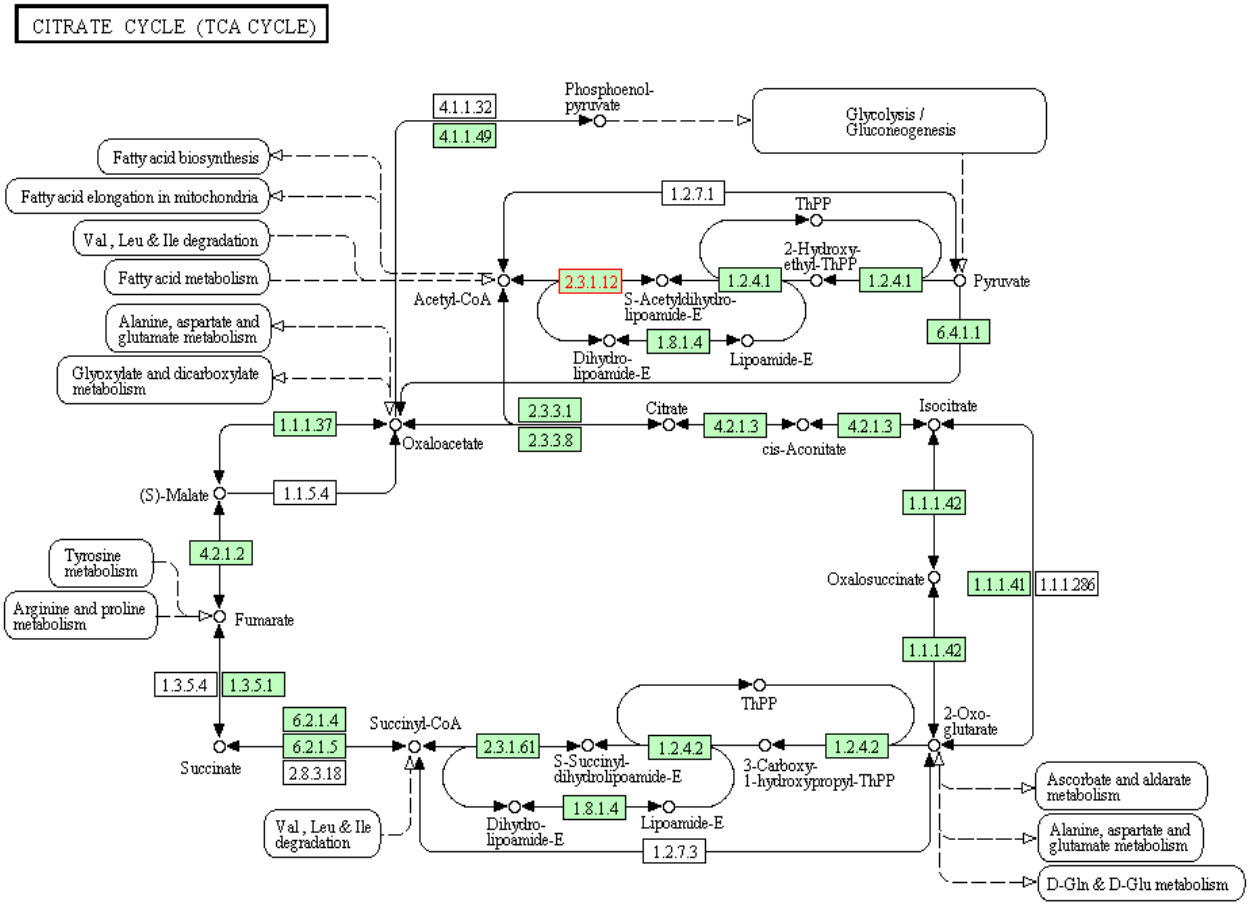

Figura 5.30 – Participação do componente E2 do complexo enzimático piruvato desidrogenase (EC:2.3.1.12) na via metabólica ciclo de Krebs

YALI0D16753p ou Malato desidrogenase foi identificada apenas na fração mitocondrial no meio de produção de ácido cítrico. Essa enzima participa do ciclo do ácido tricarboxílico e foi localizada na matriz mitocondrial, conforme informado no banco de dados KEGG e UNIPROT (Tabela 5.10; Tabela 2 do anexo I).

A localização da proteína YALI0D04554p foi definida na membrana externa da mitocôndria, porém não teve sua função e via metabólica à qual pertence definidas.

Não foi possível determinar a localização, função, processo biológico e via metabólica das proteínas YALI0E07623p e YALI0C04389p através de pesquisa em bancos de dados

MASCOT, UNIPROT e KEGG. O proteoma da mitocôndria ainda não está completo. Portanto, a presença destas proteínas na mitocôndria pode ter sido uma descoberta. Ambas as proteínas foram identificadas na fração mitocondrial de células cultivadas em meio que favorecia a produção de ácido cítrico (Tabela 5.10).

YALI0F18359p (UNIPROT) ou NADH desidrogenase (ubiquinona) Fe-S proteina 5 (KEGG) foi identificada somente na fração mitocondrial para células cultivadas no meio de produção de ácido cítrico e participa da fosforilação oxidativa (Tabela 5.10; Tabela 2 do anexo I).

YALI0B02178p (Aspartato aminotransferase (UNIPROT); EC:2.6.1.1 (KEGG)), enzima que foi identificada participar do metabolismo alanina, aspartato e glutamato foi encontrada no proteoma da mitocôndria de células cultivada em meio de cultivo que propiciou a produção de ácido cítrico (Tabela 5.10). Esta enzima catalisa a conversão dos substratos aspartato e oxoglutarato aos produtos oxaloacetato e glutamato (http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?2.6.1.1/KEGG).

Proteínas ribossômicas (40S proteína ribossomal S19; 60S proteína ribossomal L14; 40S proteína ribossomal S18 e 60S proteina ribossomal L35) foram identificadas apenas na fração mitocondrial de células cultivadas no experimento controle (YPG) (Tabela 5.10) e todas participam do processo biológico Tradução (tabela 1 do anexo I). Ohlmeier *et al.* (2004) estudaram o proteoma mitocondrial da levedura *Sacharomyces cerevisiae* em condição de respiração e fermentação e uma proteína ribossômica foi identificada: *40S small sbunit ribossomal protein*.

Proteínas de choque térmico (Proteína de choque térmico 83 e Proteína de choque térmico Hsp90) foram identificadas apenas na fração mitocondrial de células cultivadas no experimento controle (YPG) (Tabela 5.10). A Proteína de choque térmico Hsp90 atua no processo biológico de resposta a estresse e na via processamento de proteínas no retículo endoplasmático.

No estudo proteômico realizado nas duas frações mitocondriais obtidas de condições diferentes de cultivo, a maior parte de proteínas indetificadas está presente na membrana interna da mitocôndria. Este resultado mostra a importância de se realizar um estudo proteômico dos componentes da mitocôndria separadamente, ou seja, lisando a mitocôndria e identificação do proteoma da matriz mitocondrial e das membranas externas e internas separadamente a fim de verificar se a baixa identificação de proteínas de matriz não foi prejudicada pela presença das proteínas de membrana (Tabela 1 e 2 do anexo I).

Tabela 5.10 – Proteínas detectadas somente em fração mitocondrial de células de *Y. lipolytica* cultivada em YPG e em meio para produção de ácido cítrico (Da Silva, 2010).

Proteínas Identificadas somente na fração mitocondrial de células cultivadas no meio YPG		Proteínas Identificadas somente na fração mitocondrial de células cultivadas no meio de produção de ácido cítrico	
gi|361127131	putativo subunidade NADH-ubiquinona oxidoredutase 78 kDa, mitocondrial	gi|562973879	Plasma membrane ATPase
gi|156564666	citocromo c oxidase subunidade 2, parcial (mitocondria)	gi|212537861	P-type ATPase, putative
gi|154275722	Subunidade de succinato desidrogenase flavoproteína	gi|191174826	plasma membrane ATPase 2
gi|523423909	ZYBA0S06-03774g1_1 ou ATP sintase subunidade alfa	gi|345569769	hypothetical protein AOL_s00007g539
gi|50546785	YALI0B13970p ou glicerol-3-fosfato desidrogenase (KEGG)	gi|46109086	PMA1_NEUCR Plasma membrane ATPase (Proton pump)
gi|357434536	Fator de alongamento e tradução 1 alfa, parcial	gi|367005989	hypothetical protein TPHA_0K01590
gi|336377168	Fator de alongamento e tradução 1 alfa, parcial	gi|332687492	Plasma membrane H+-ATPase
gi|516554341	ATP sintase, parcial	gi|50550183	YALI0D08228p (ADP/ATP carrier protein adenine nucleotide translocator)
gi|490745942	MULTIESPECIES: precorrin-6X redutase	gi|50542946	YALI0A01023p
gi|50550971	YALI0D17864p ou Cadeia longa de acil-CoA sintetase	gi|50546639	YALI0B12188p
gi|50543574	ADP/ATP proteina transportadora ou YALI0A10659p	gi|50548379	YALI0C09889p
gi|240281608	Proteina hipotética conservada	gi|210075535	YALI0C17347p
gi|2997727	Fator de Alogamento e tradução 1-alfa	gi|51012446	mitochondrial aconitate hydratase
gi|159895252	Fator de Alogamento e tradução 1-alfa, parcial	gi|50551453	YALI0D23683p ou Acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex (UNIPROT) e pyruvate dehydrogenase E2 component (dihydrolipoamide acetyltransferase)

Tabela 5.10 - continuação

Proteínas Identificadas somente na fração mitocondrial de células cultivadas no meio YPG		Proteínas Identificadas somente na fração mitocondrial de células cultivadas no meio de produção de ácido cítrico	
gi|222476495	Fator de Alogamento e tradução 1-alfa	gi|71483401	Fator de Alogamento-1 alfa
gi|56377826	Fator de Alogamento-1 alfa	gi|50551225	YALI0D20768p ou Dihydrolipoyl dehydrogenase
gi|50548217	YALI0C07953p	gi|50550873	YALI0D16753p ou Malate dehydrogenase (UNIPROT)
gi|50554163	YALI0E27962p	gi|154273230	sphingolipid long chain base-responsive protein PIL1
gi|961482	Fator de Alogamento-1 alfa	gi|562977197	Sphingolipid long chain base-responsive protein LSP1
gi|254566257	Proteína de choque térmico Hsp90	gi|50545753	YALI0B02178p ou Aspartate aminotransferase (UNIPROT) e aspartate aminotransferase, mitochondrial [EC:2.6.1.1] (KEGG)
gi|156848696	Proteína Hipotética Kpol_1002p16	gi|212540872	cell wall integrity signaling protein Lsp1/Pil1, putative
gi|50548073	YALI0C06171p	gi|32127383	Actin
gi|123666	Proteína de choque térmico 83	gi|365985389	hypothetical protein NDAI_0C06250
gi|50547339	40S proteína ribossomal S19	gi|50288123	hypothetical protein
gi|50551803	60S proteína ribossomal L14 ou YALI0E00550p	gi|588256444	Malate dehydrogenase
gi|210075961	YALI0F06061p	gi|50549875	YALI0D04554p
gi|210075787	40S proteína ribossomal S18 ou YALI0D20614p	gi|50547337	YALI0B20482p (UNIPROT) prohibitin 2 (KEGG)
gi|50543518	60S proteína ribossomal L35 ou YALI0A09922p	gi|50545255	YALI0A17468p (UNIPROT) ubiquinol-cytochrome c reductase cytochrome c1 subunit (KEGG)

Tabel 5.10 - continuação

Proteínas Identificadas somente na fração mitocondrial de células cultivadas no meio YPG		Proteínas Identificadas somente na fração mitocondrial de células cultivadas no meio de produção de ácido cítrico	
gi|50551053	YALI0D18744p	gi|50552520	YALI0E07623p
gi|452844805	Proteína hipotética DOTSEDRAFT_70666	gi|50555469	YALI0F07975p (UNIPROT) ou mitochondrial fission process protein 1 (KEGG)
gi|569421590	Serina / treonina-proteína-quinase	gi|50547939	YALI0C04389p
gi|50557242	YALI0F29975p	gi|50550487	YALI0D11814p (UNIPROT) e F-type H+-transporting ATPase subunit f (KEGG)
		gi|210076047	YALI0F18359p (UNIPROT) NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 5 (KEGG)

6 Conclusão

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que:

A quantidade de ácido cítrico e biomassa produzida por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 foi influenciada pela origem do glicerol bruto utilizado como fonte de carbono. Foram utilizados dois tipos de glicerol bruto obtido do processo de produção de biodiesel a partir de reação de transesterificação: oriundo da rota etílica catalisada por NaOH e rota metílica catalisada por KOH, ambos utilizano óleo de soja. A maior produção de ácido cítrico foi de 6,75 g/L utilizando glicerol da rota etílica.

As concentrações de extrato de lêvedo testadas influenciaram a produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, em glicerol bruto como fonte de carbono, sendo que a produção de ácido cítrico foi ligeiramente maior para o ensaio no qual a concentração inicial de extrato de levedura utilizada foi 0,1705 g/L.

A presença de sulfato de amônio no meio de cultivo na produção do ácido cítrico por *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 reduziu a concentração e produtividade de ácido cítrico (4,35 g/L para 2,67 g/L e 0,05 g/L.h para 0,03 g/L.h) e estimulou a produção do ácido isocítrico em 1,74 vezes comparando com o ensaio realizado na ausência de sulfato de amônio na concentração testada.

A redução da concentração dos íons ferro e manganês no meio tamponado não favoreceu a produção de ácido cítrico, sendo a concentração máxima (P_{AC}) e a produtividade (Q_{AC}) de ácido cítrico obtidas em 98 h de processo similares entre todas as condições testadas. A concentração de ácido isocítrico foi reduzida para 3 g/L em 98 h de fermentação quando a concentração do sal $FeCl_3$ foi reduzida para 0,006 g/L.

Em biorreator, a melhor produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica*, utilizando glicerol bruto da rota metílica como fonte de carbono, foi a 550 rpm com 7,03 g/L de ácido cítrico e $Y_{P/S}$ igual a 0,47 g/g.

A adição de sesamol na concentração 1,5 mM ao meio de produção de ácido cítrico descrito por Da Silva (2010) para crescimento de *Y. lipolytica* IMUFRJ 508682 não foi satisfatória, pois a produção de ácido cítrico foi reduzida na presença deste composto. Na presença de sesamol, a fluorescência relacionada ao lipídeo neutro apresentou valores inferiores, indicando uma produção menor de corpúsculos lipídicos (lipídeo neutro).

Diante às dificuldades de se atingir a lise celular de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, o protocolo de Meisinger *et al*. (2005), descrito para promover o isolamento da mitocôndria de leveduras convencionais, foi adapatado aumentando a concentração de enzima Zymoliase 20-T, responsável pela degradação da parede celular da levedura, de 3 mg para 10 mg por grama de massa úmida de células. Esta modificação foi necessária devido às características de superfície inerentes a esta espécie.

No estudo proteômico, foram indetificadas 45 e 47 proteínas para a fração mitocondrial obtida de células cultivadas em YPG e no meio de Da Silva (2010),

respectivamente, sendo 13 proteínas comuns às duas condições de cultivo, totalizando 32 e 34 proteínas diferentes para a fração mitocondrial obtida de células cultivadas em ambas as condições, respectivamente. A maior parte de proteínas identificadas está presente na membrana interna da mitocôndria.

Esse é o primeiro resultado de proteoma mitocondrial de *Y. lipolytica* para a produção de ácido cítrico, o que permite a identificação de proteínas essenciais para este fim. Sendo assim, os resultados evidenciam a importância de se realizar um estudo proteômico dos componentes da mitocôndria separadamente, ou seja, lisando a mitocôndria e identificando o proteoma da matriz mitocondrial e das membranas externas e internas separadamente a fim de verificar se a baixa identificação de proteínas de matriz não foi prejudicada pela presença das proteínas de membrana.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar o estudo proteômico dos componentes da mitocôndria separadamente;

- Realizar Western Blotting para confirmar o isolamento mitocondrial;

- Realizar medidas de atividades das enzimas relacionadas à produção de ácido cítrico, por exemplo, citrato sintase, aconitase, isocitrato desidrogenase NAD^+ dependente, isocitrato liase e citrato liase nas condições experimentais estabelecidas neste presente estudo;

- Realizar o modelo cibernético da cepa *Yarrowia lipolytica*.

8 PUBLICAÇÕES

8.1 Artigos publicados:

DA SILVA, LUANA V.; TAVARES, C. B.; RIBEIRO, R. R.; PESSOA, F. L. P.; COELHO, M. A. Z.; AMARAL, P. F. F. Experimental Design as a Tool for the Development of Citric Acid Production by *Yarrowia lipolytica* Using Glycerol as a Feedstock. Journal of Food Science and Engineering, v. 3, p. 435-446, 2013.

SILVA, L.V.; TAVARES, C. B.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z. . Production of Citric Acid by *Yarrowia lipolytica* in Different Crude Glycerol Concentrations and in Different Nitrogen Sources. CHEMICAL ENGINEERING TRANSACTIONS, v. 27, p. 199-204, 2012.

SILVA, L.V.; RIBEIRO, R.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z.; PESSOA, F. L. P. Potential application of raw glycerol from biodiesel in citric acid production by *Yarrowia lipolytica.* Chemical Engineering Transactions, v. 20, p. 211-216, 2010.

8.2 Trabalhos completos publicados:

SILVA, R. S.; **DA SILVA, LUANA V.**; AMARAL, P. F. F. Efeito dos íons manganês e fosfato na produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* a partir de glicerol como fonte de carbono. In: XIX SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 2013.

SILVA, R. S.; **DA SILVA, LUANA V.**; AMARAL, P. F. F. Influência da composição do meio de cultivo na produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica.* In: X Congresso Brasileiro de Engenharia Química - Iniciação Científica, 2013, Vassouras-RJ. X Congresso Brasileiro de Engenharia Química - Iniciação Científica, 2013.

DA SILVA, LUANA V.; TAVARES, C. B.; AMARAL, P. F. F.; Coelho, M.A.Z. . Influência da concentração dos íons ferro e manganês na produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica.* XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 12265-12272, 2012.

DA SILVA, LUANA V.; TAVARES, C. B.; AMARAL, P. F. F.; Coelho, M.A.Z. Verificação da influência de sulfato de amônio no metabolismo de *Yarrowia lipolytica.* XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, p. 8780-8787, 2012.

TAVARES, C. B.; **DA SILVA, LUANA V.**; AMARAL, P. F. F.; Coelho, M.A.Z. Influência do tratamento de glicerol bruto na biossintese de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica.*XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, p. 4185-4194, 2012.

SILVA, L.V.; TAVARES, C. B.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z. Influência da Concentração Celular Inicial de *Yarrowia lipolytica* na Produção de Ácido Cítrico. In: XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM 2011),Caxias do Sul, 2011.

SILVA, L.V.; RIBEIRO, R. R.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z.; PESSOA, F. L. P. Delineamento experimental para a produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* a partir

de um subproduto da produção do biodiesel. In: XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ 2010), Foz do iguaçú, p. 9792-9802, 2010.

8.3 Resumo expandido:

SILVA, L.V.; TAVARES, C. B.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z. Biotechnological way of valorizing crude glycerol for citric acid production by the yeast *Yarrowia lipolytica*. In: 11th International Chemical and Biological Engineering Conference - CHEMPOR, 2011, Lisboa. Book of Abstract of the 11 th International Chemical and Biological Engineering Conference - CHEMPOR, p. 572-573, 2011.

8.4 Resumos publicados:

TAVARES, C. B.; **DA SILVA, LUANA V.**; AMARAL, P. F. F. Reaproveitamento do glicerol subproduto da produção de biodiesel de diferentes matérias-primas como substrato para a produção microbiologica de ácido citrico. 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2011.

SILVA, L.V.; TAVARES, C. B.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z. Valorização Biotecnológica do Glicerol Bruto para Produção de Ácido Cítrico. In: XXII Congresso Brasileiro de Ciência e tecnologia de Alimentos, Salvador, 2010.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHLEITNER, G.; GAIGG, B.; KRASSER, A.; KAINERSDORFER, E.; KOHLWEIN, S. D.; PERKTOLD, A.; ZELLNIG, G.; DAUM, G. Association between the endoplasmic reticulum and mitochondria of yeast facilitates interorganelle transport of phospholipids through membrane contact Eur. J. Biochem. v. 264, p. 545–553, 1999.

AKIYAMA, S. I.; SUZUKI, T.; SUMINO, Y.; FUKADA, H. Induction and citric acid productivity of fluoro-acetate-sensitive mutant strains of *Candida lipolytica*. Agr. Biol. Chem., v. 37, p. 879 – 884, 1973.

ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K e WALTER P. Biologia Molecular da Célula, 4ª edição, Porto Alegre, Artmed, 2004.

AMBATI, P., & AYYANNA, C. Optimizing medium constituents and fermentation conditions for citric acid production from palmyra jaggery using response surface method. World Journal of Microbiology & Biotechnology, v. 17, p. 331–335, 2001.

ANASTASSIADIS, S., REHM, H. J., Elec. J. Biotechnol. 8 (2), 2005.

ANASTASSIADIS, S.; MORGUNOV, I. G.; KAMZOLOVA, S. V.; FINOGENOVA, T. V. Citric Acid Production Patent Review. Recent Patents on Biotechnology, v. 2, n. 2, p. 107-123(17), 2008.

ANDRÉ, F.; ANDREAS, A.; STEPHAN, M. & GEROLD, B. Citric acid production from sucrose using a recombinant strain of the yeast *Yarrowia lipolytica*. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 75, p. 1409–1417, 2007.

ANDRÉS-BARRAO,C.; SAAD, M. M.; CHAPPUIS, M. L.; BOFFA, M.; PERRET, X.; PÉREZ, R. O.; BARJA, F. Proteome analysis of *Acetobacter pasteurianus* during acetic acid fermentation. Journal of Proteomics, v.75, p. 1701–1717, 2012.

ANTONUCCI, S.; BRAVI, M.; BUBBICO, R.; MICHELE, A. D.; VERDONE, N. Selectivity in citric acid production by *Yarrowia lipolytica*. Enzy Microb Technol v. 28, p. 189–195, 2001.

ARZUMANOV, T. E.; SIDOROV, I. A.; SHISHKANOVA, N. V.; FINOGENOVA, T. V. Mathematical modeling of citric acid production by repeated batch culture. Enzyme and Microbial Technology, v. 26, p. 826-833, 2000.

ARZUMANOV, T. E., SHISHKANOVA, N.V.; FINOGENOVA, T.F. Biosynthesis of citric acid by *Yarrowia lipolytica* repeat-batch culture on ethanol. Appl Microbiol Biotechnol., v. 53, p. 525–529, 2000.

ASHKAN, T. N.; ADELI, M.; VOSSOUGHI, M. Poly(citric acid)- block-poly(ethylene glycol) copolymers—New candidates for nanomedicine. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine. doi:10.1016/j.nano.2009.11.008, 2010.

BARTH, G. & GAILLARDIN, C. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. FEMS Microbiology Reviews, v. 19, p. 21-237, 1997.

BARTH, G.; BECKERICH, J.M.; DOMINGUEZ, A.; KERSCHER, S.; OGRYDZIAK,

D.; TITORENKO, V; GAILLARDIN, C. Functional genetics of *Yarrowia lipolytica* In: (de Winde, J.H., Ed.), Functional Genetics of Industrial Yeasts, p. 228–271. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2003.

BERENDZEN, K.; THERIAQUE, D.W.; SHUSTER, J.; STACPOOLE, P. W. Therapeutic potential of dichloroacetate for pyruvate dehydrogenase complex deficiency. Mitochondrion., v. 6, n. 3, p. 126-135, 2006.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. Biochemistry, 7ª edição, p.511, 2010.

BOWES, I. & MATETEY, M. FEMS Microbiol Lett, 6:219, 1979.

CLARK, D.S.; ITO, K.; HORITSU, H. Biotech Bioeng, 8:465, 1966

CROLLA, A. & KENNEDY, K. J. Optimization of citric acid production from *Candida lipolytica* Y-1095 using n-paraffin. Journal of Biotechnology, v. 89, no. 1, p. 27–40, 2001.

CROLLA, A. & KENNEDY, K. J. Fed-batch production of citric acid by *Candida lipolytica* grown on η-paraffins. Journal of Biotechnology, v. 110, p.73-84, 2004.

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

DA SILVA, L. V. Produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* utilizando glicerol como fonte de carbono. Dissertação submetida ao Corpo Docente do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, p 1 – 94, 2010.

DA SILVA, L. V.; TAVARES, C. B.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z. Biotecnological way of valorizing crude glycerol for citirc acid production by the yeast *Yarrowia lipolytica*. Chemical and Biological Process-product Engineering, Lisbon, Portugal, p. 572 – 573, 2011.

DA SILVA, L. V.; TAVARES, C. B.; RIBEIRO, R. R.; PESSOA, F. L. P.; COELHO, M. A. Z.; AMARAL, P. F. F. Experimental Design as a Tool for the Development of Citric Acid Production by *Yarrowia lipolytica* Using Glycerol as a Feedstock. Journal of Food Science and Engineering, v. 3, p. 435-446, 2013.

DHILLON, G. S.; BRAR, S. K.; VERMA, M.; TYAGI, R. D. Recent Advances in Citric Acid Bio-production and Recovery. Food Bioprocess Technol, v. 4, p. 505–529, 2011.

CIERO, L.; BELLATO, C. de M. Proteoma - Avanços Recentes em técnicas de eletroforese bidimensional e espectrometria de massa. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento , v. 5, n. 29, p. 158-164, 2002.

DYAL, S. D. & NARINE, S. S. Implications for the use of *Mortierella* fungi in the industrial production of essential fatty acids. Food Research International, v. 38, no. 4, p. 445–467, 2005.

FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K.; WONG, S. F.; WHITEHOUSE, C. M. Electrospray for mass spectrometry of large biomolecules. Science, v. 246, n. 4926, p. 64-71, 1989.

FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K.; WONG, S. F.; WHITEHOUSE, C. M. Electrospray ionization - principles and practice. Mass Spectrometry Reviews, v. 9, n. 1, p. 37-70, 1990.

FERREIRA, C. R.; SARAIVA, S. A.; GARCIA, J. S.; SANVIDO, G. B.; PERECIN, F.; CATHARINO, R. R.; SIMAS, R. de C.; GOZZO, F. C.; SANTOS, L. F. A.; JUNIOR, H. M.; BASSO, A. C.; PONTES, J. H. F.; MEIRELLES V. F.; COELHO, M. B.; D'ANGELO, M.; EBERLIN, M. N. Princípios e aplicações da espectrometria de massas em produção animal**.** Anais do II Simpósio de Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal – 22 e 23 de junho de 2009. Embrapa Pecuária Sudeste – São Carlos – SP – Brasil

FERREIRA, T. F. Emprego de *Yarrowia lipolytica* na degradação de óleo cru. Dissertação submetida ao Corpo Docente do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, p. 1 – 138, 2009.

FICKERS, P.; BENETTI, P.-H.; WACHE, Y.; MARTY, A.; MAUERSBERGER, S.; SMIT, M.S.; NICAUD, J.-M. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. FEMS Yeast Research, v. 5, p. 527–543, 2005.

FINOGENOVA, T.V., Biosynthesis of Organic Acids byYeast and Its Regulation, Extended Abstract of Doctoral (Biol.) Dissertation, Pushchino: IBFM AN SSSR, 1982.

FINOGENOVA, T.V. & GLAZUNOVA, L.M. Mikrobiologiya, v. 51, no. 1, p. 27–33, 1982.

FINOGENOVA, T. V.; SHISHKANOVA, N. V.; FAUSEK, E. A.; EREMINA, S. S. Biosynthesis of isocitric acid from ethanol by yeasts. Appl Microbiol Biotechnol, v. 36, p. 231–235, 1991.

FINOGENOVA, T.V.; KAMZOLOVA, S. V.; DEDYUKHINA, E. G.; SHISHKANOVA, N. V.; IL'CHENKO, A. P.; MORGUNOV, I. G.; CHERNYAVSKAYA, O. G.; SOKOLOV, A. P. Biosynthesis of citric and isocitric acids from ethanol by mutant *Yarrowia lipolytica* N 1 under continuous cultivation. Applied microbiology and biotechnology, v. 59, p. 493-500, 2002.

FINOGENOVA, T. V.; MORGUNOV, I. G.; KAMZOLOVA, S. V; CHERNYAVSKAYA, O. G. Organic Acid Production by the Yeast *Yarrowia lipolytica*: A Review of Prospects. Applied Biochemistry and Microbiology, v. 41(5), p. 418–425, 2005.

FÖRSTER, A.; AURICH, A.; MAUERSBERGER, S.; BARTH, G. Citric acid production from sucrose using a recombinant strain of the yeast *Yarrowia lipolytica*. Applied Microbial and Cell Physiology Appl Microbiol Biotechnol DOI 10.1007/s00253-007-0958-0, 2007.

FRANC, V.; SEBELA, M.; REHULKA, P.; KONČITÍKOVÁ, R.; LENOBEL, R.; MADZAK, C.; KOPEČNÝ, D. Analysis of N-glycosylation in maize cytokinin oxidase/dehydrogenase 1 using a manual microgradient chromatographic separation coupled offline to MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. J Proteomics, v. 75(13), p. 4027-4037, 2012.

FRANCIELO, V.; PATRICIA, M.; FERNANDA, S. A. Apple pomace: A versatile substrate for biotechnological applications. Critical Reviews in Biotechnology, v. 28, p. 1-12, 2008.

FRIESEN, D. T.; BABCOCK, W. C.; BROSE, D. J.; CHAMBERS, A. R. Recovery of citric acid from fermentation beer using supported-liquid membranes. Journal of Membrane Science, 56, 127, 1991.

GERIS, R.; SANTOS, N.A. C.; AMARAL, B.A.; MAIA, I. S.; CASTRO, V. D.; CARVALHO, J. R. M. Biodiesel de soja – Reação de transesterificação para aulas práticas de Química Orgânica. Quim. Nova, v. 30, n. 5, p. 1369-1373, 2007.

GIARDINA**,** B. J.; STANLEY, B. A.; CHIANG, H-L. Comparative proteomic analysis of transition of *saccharomyces cerevisiae* from glucose-deficient medium to glucose-rich medium. Proteome Science, 10:40, 2012.

GIARDINA, B. J.; STANLEY, B. A.; CHIANG, H. L. Glucose induces rapid changes in the secretome of *Saccharomyces cerevisiae*. Proteome Science, 12(1):9, 2014.

GOLDBERG, I.; ROKEM, J. S.; PINES, O. Review Organic acids: old metabolites, new themes. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 81, p. 1601–1611, 2006.

GREWAL, H. S. & KALRA, K.L. Fungal Production of Citric Acid. Biotechnology Advances, v. 13, n. 2, p. 209-234, 1995.

GUERRERO-CASTILLO, S.; VÁZQUEZ-ACEVEDO, M.; GONZÁLEZ-HALPHEN, D.; URIBE-CARVAJAL, S. In *Yarrowia lipolytica* mitochondria, the alternative NADH dehydrogenase interacts specifically with the cytochrome complexes of the classic respiratory pathway. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, v. 1787, p. 75–85, 2009.

GUIDI, F.; MAGHERINI, F.; GAMBERI, T.; BORRO, M.; SIMMACO, M.; MODESTI, A. "Effect of different glucose concentrations on proteome of *Saccharomyces cerevisiae*", Biochim. Biophys. Acta v. 1804, p. 1516–1525, 2010.

GUILLERMO, A.; JIAN, Y.; RYAN, H. New biodegradable biocompatible citric acid nano polymers for cell culture growth & implantation engineered by Northwestern University Scientists. Nano patents and innovations, US Patent Application 20090325859, 2010.

HAEGLER, A.N. & MENDONÇA-HAEGLER, L.C. Yeasts from marine and estuarine

waters with different levels of pollution in the state of Rio de Janeiro, Brazil. Appl. Environ. Microbiol., v. 41, n. 1, p. 173-178, 1981.

HANG, Y. D. & WOODAMS, E. E. Production of citric acid from corncobs by *Aspergillus niger*. Bioresource Technology**,** v. 65(3), p. 251–253, 1998.

HAQ, I.; SIKANDER, A.; QADEER, M. A.; JAVED, I. Stimulatory effect of alcohols (methanol and ethanol) on citric acid productivity by a 2-deoxy D-glucose resistant culture of *Aspergillus niger* GCB-47. Bioresource Technology, v. 86, p. 227–233, 2003.

HATEFI, Y. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. Ann. Rev. Biochem. v. 54, p. 1015–1069, 1985.

HELLMAN, U.; WERNSTEDT, C.; GONEZ, J.; HELDIN, C.H. Anal. Biochem. 224, p. 451-455, 1995.

HOLZ, M.; FÖRSTER, A.; MAUERSBERGER, S.; BARTH, G. Aconitase overexpression changes the product ratio of citric acid production by *Yarrowia lipolytica*. Appl Microbiol Biotechnol, v.81, p.1087–1096, 2009.

ILLARIONOVA, V.I., GLAZUNOVA, L.M., SHISHKANOVA, N.V., FINOGENOVA, T.V., AND LOZINOV, A.B., USSR Inventor's Certificate No. 849 780, Byull. Izobret., no. 3, 1983.

IMANDI, S. B.; BANDARU, V. V. R.; SOMALANKA, S. R.; GARAPATI, H. R. Optimization of medium constituents for the production of citric acid from byproduct

glycerol using Doehlert experimental design. Enzyme and Microbial Technology, v. 40, no. 5, p. 1367-1372, 2007.

INGRAM, L. O. & BUTTKE, T. M. Effects of alcohols on microoganisms, Adv. Microb. Physiol. 25, 253, 1984.

ISMAIL, S.A.S.; DEAK, T.; ABD EL-RAHMAN, H.A.; YASSIEN, M.A.M.; BEUCHAT, L.R. Effectiveness of immersion treatments with acids, trisodium phosphate, and herb decoctions in reducing populations of *Yarrowia lipolytica* and naturally occurring aerobic microorganisms on raw chicken. International Journal of Food Microbiology, v. 64, p.13–19, 2001.

JIANLONG, W.; XIANGHUA, W.; DING, Z. Production of citric acid from molasses integrated with in situ product separation by ion-exchange resin adsorption. Bioresource Technology,v. 75, p. 231– 234, 2000.

JINGLAN, W.U.; QIJUN, P.; WOLFGANG, A.; MIRJANA, M. Model- based design of a pilot-scale simulated moving bed for purification of citric acid from fermentation broth. Journal of Chromatography A, 1216, p. 8793–8805, 2009.

JOHNSON, D. T. & TACONI, K. A. The glycerin glut: options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production Environ Prog, v. 26 (4), p. 338–348, 2007.

KAMZOLOVA, S. V.;SHISHKANOVA, N. V.; MORGUNOV, I. G.; FINOGENOVA, T. V. Oxygen requirements for growth and citric acid production of *Yarrowia lipolytica*. FEMS Yeast Research., v. 3, p. 217-222, 2003.

KAMZOLOVA, S. V.; MORGUNOV, I. G.; AURICH, A.; PEREVOZNIKOVA, O. A.; SHISHKANOVA, N. V.; STOTTMEISTER, U. ; FINOGENOVA, T. V. Lipase Secretion and Citric Acid Production in *Yarrowia lipolytica* Yeast Grown on Animal and Vegetable Fat. Food Technol. Biotechnol, v. 43 (2), p. 113-122, 2005.

KAMZOLOVA, S.V.; FINOGENOVA, T.V.; MORGUNOV, I. Biosynthesis of citric and isocitric acids by *Yarrowia lipolytica* grown on vegetable oils, 2nd FEMS Congress of European Microbiologists, Madrid, Spain, p. 98, 2006.

KAMZOLOVA SV, FINOGENOVA, TV, MORGUNOV IG. Microbial production of citric and isocitric acids from sunflower oil. Food Technology and Biotechnology, v. 46, (1), p. 51-59, 2008.

KAPOOR, K. K.; CHAUDHARI, K.; TAURO, P. In G. Reed (Ed.), Presscott and Dunn's, industrial microbiology (4th ed., p. 709– 739). West Port: AVI Publishing, 1987.

KARAS, M. I.; HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10.000 daltons. Analytical Chemistry, v. 60, n. 29, p. 2299-2301, 1988.

KARASU-YALCIN, S.; Tijen B. M.; Yesim O. Z. Effects of Different Fermentation Conditions on Growth and Citric Acid Production Kinetics of two *Yarrowia lipolytica* Strains. Chem. Biochem. Eng. Q, v. 24 (3), p. 347–360, 2010.

KAWASSE, F. M.; AMARAL, P. F.; ROCHA-LEÃO, M. H. M.; AMARAL, A. L.; FERREIRA, E. C.; COELHO, M. A. Z. Morphological analysis of *Yarrowia lipolytica* under stress conditions through image processing. Bioprocess Biosyst Eng., v. 25, p. 371-375, 2003.

KENDRICK, A. & RATLEDGE, C. Desaturation of Polyunsaturated Fatty Acids in *Mucor circinelloides* and the Involvement of the Novel Membrane-Bound Malic Enzyme, Eur. J. Biochem, v. 209, p. 667–673, 1992.

KIM, T. H.; YOUNG, S.O.; KIM, S.J. The possible involvement of de cell surface in aliphatic hydrocarbon utilization by an oil-degrading Yeast, *Yarrowia lipolytica* 180. J.Microbiol. Biotechnol., v. 10 (3), p. 333-337, 2000.

KINTER, M. e SHERMAN, N. E., Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry. Capítulo 3 (Fundamental Mass Spectrometry). ISBN 0-471-32249-0, Wiley-Interscience, Inc. 2000.

KOLKMAN, A.; SLIJPER, M.; HECK, A. J. R. Development and application of proteomics technologies in *Saccharomyces cerevisiae*. TRENDS in Biotechnology, v. 23, n.12, p. 598-604, 2005.

KOLKMAN, A.; DARAN-LAPUJADE, P.; FULLAONDO, A.; OLSTHOORN, M. M. A.; PRONK, J. T.; SLIJPER, M.; HECK, A. J. R. Proteome analysis of yeast response to various nutrient limitations. Molecular Systems Biology, doi:10.1038/msb4100069, 2006.

KORNBERG, A., AND PRICER, W. E. J. Di- and triphosphopyridine nucleotide isocitric dehydrogenases in yeast. J. Biol. Chem., v. 189, p. 123-136, 1951.

KRUSE, K.; FÖRSTER, A.; JURETZEK, T.; MAUERSBERGER, S.; BARTH, G. Method for the biotechnological production of citric acid by means of a genetically modified yeast *Yarrowia lipolytica*. WO2004/009828, DE 10333144, 2004.

KUBICEK, C. P. & RÖHR, M. Citric acid fermentation, Crit. Rev. Biotechnol, v. 3, p. 331–373, 1986.

KUBICEK, C. P. Organic acids. In: Ratledge C, Kristiansen B, eds. Basic Biotechnology. Cambridge, UK: Cambridge University Press; p. 17-44, 2001.

KUFORIJI, O. O.; KUBOYE, A. O.; ODUNFA, S. A. Orange and pineapple wastes as potential substrates for citric acid production. International Journal of Plant Biology, 1, 4, 2010.

KUMAR, D.; JAIN V. K. SHANKER, G. & SRIVASTAVA A. Citric acid production by solid state fermentation using sugarcane bagasse. Process Biochemistry, v. 38, p. 1731–1738, 2003.

IL'CHENKO, O. G. CHERNYAVSKAYA, N. V. SHISHKANOVA, AND T. V. FINOGENOVA. Metabolism of Yarrowia lipolytica Grown on Ethanol under Conditions Promoting the Production of a -Ketoglutaric and Citric Acids: A Comparative Study of the Central Metabolism Enzymes. Microbiology, Vol. 71, No. 3, 2002, pp. 269–274. Translated from Mikrobiologiya, Vol. 71, No. 3, 2002, pp. 315–322.

INSENSER, M. R, HERNÁEZ, M. L.; NOMBELA, C.; MOLINA, M.; MOLERO, G.; GIL, C. Gel and gel-free proteomics to identify *Saccharomyces cerevisiae* cell surface proteins. Journal of Proteomics, v. 73, p. 11 8 3 - 1195, 2010.

LAZAR, Z.; WALCZAK, E.; ROBAK, M. Simultaneous production of citric acid and invertase by *Yarrowia lipolytica SUC+* transformants. Bioresource Technology, v. 102, p. 6982–6989, 2011.

LEANGON, S.; MADDOX, I. S.; BROOKS, J. D. A proposed biochemical mechanism for citric acid accumulation by *Aspergillus niger* Yang no. 2 growing in solid state fermentation. World Journal of Microbiology & Biotechnology, v. 16, p. 271–275, 2000.

LEHNINGER, A.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2003. 975 p.

LEVINSON, W. E.; KURTZMAN, C. P.; KUO, T. M. Characterization of *Yarrowia lipolytica* and related species for citric acid production from glycerol. Enzyme and Microbial Technology, v. 41, p. 292-295, 2007.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; Schmidell, W. Biotecnologia Industrial. Processos Fermentativos e enzimáticos. Volume 3. Editora Edgard Blücher Ltda.1ª edição. 2001.

LIMA, L. L. A.; SCHULER, A.; GUERRA, N. B. Otimização e validação de método para determinação de ácidos orgânicos em vinhos por cromatografia líquida de alta eficiência. Química Nova, v. 33, No. 5, p. 1186-1189, 2010.

LITHGOW, T. Targeting of proteins to mitochondria. FEBS Lett. v. 476, p. 22–26, 2000.

LIU, X.Y.; CHI, Z.; LIU, G.L.; WANG, F.; MADZAK, C.; CHI, Z. M. Inulin hydrolysis and citric acid production from inulin using the surface-engineered *Yarrowia lipolytica* displaying inulinase. Metab Eng., v. 12, p. 469–476, 2010.

LIU, X. Y.; CHI, Z.; LIU, G. L.; MADZAK, C.; CHI, Z. M. Both decrease in ACL1 gene expression and increase in ICL1 gene expression in marine-derived yeast *Yarrowia lipolytica* expressing INU1 gene enhance citric acid production from inulin. Marine Biotechnology (NY), v. 15, p. 26–36, 2013.

LOTFY WA, GHANEM KM, EL-HELOW ER. Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate: II. Optimization of process parameters through statistical experimental designs. Bioresource Technology., v. 98, p. 3470-3477, 2007.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with de Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265 – 276, 1951.

LOZINOV, A.B., FINOGENOVA, T.V., SHISHKANOVA, N.V., ILLARIONOVA, V.I., KARKLIN', R.YA., PELTSMANE, I.ZH., RAMINYA, L.O., LUKA, V.T., AND KESTARIS, B.YA., USSR INVENTOR'S Certificate No. 695230, Byull. Izobret., 1982, no. 23.

MAGNUSON, J.K.; LASURE, L.L. Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture, and Medicine. Kluwer Academic/Plenum Publishers., 2004.

MAKRI, A.; FAKAS, S.; AGGELIS, G. Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeated batch cultures. Bioresource Technology.. v. 10, p. 2351-2358, 2010.

MANN, M., HOJRUP, P., ROEPSTORFF, P. Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases. Biol Mass Spectrom, v. 22, p. 338-345,1993.

MARC, P.; MARGEOT, A.; DEVAUX, F.; BLUGEON, C.; CORRAL-DEBRINSKI, M.; JACQ, C. EMBO Rep. 3, 159–164, 2002.

MARTINS, F. F. Fisiologia e quantificação de lipídios por citometria de fluxo em *Yarrowia lipolytica*. Dissertação submetida ao Corpo Docente do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, p 1 – 92, 2013.

MATTEY, M., Critic. Rev. Biotechnol. 12 (1/2), 87, 1992.

MATTEY, M. Biochemistry of citric acid production by yeasts. In B. Kristiansen, M. Mattey, & J. Linden (Eds.), Citric acid biotechnology, p. 33–54. London: Taylor and Francis, 1999.

MEESTERS, P.A.E.P.; HUIJBERTS, G.N.M; EGGINK, G. High-cell-density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 45, p. 575–579, 1996.

MEISINGER, C.; PFANNER, N.; TRUSCOTT, K. N. Isolation of Yeast Mitochondria. Methods in Molecular Biology, v. 313, p. 33 – 39, 2005.

MILSOM, P. E.; MEERS, J. L. Citric acid. In M. Moo-Young (Ed.), Comprehensive biotechnology, v. 3, p. 665–680, Oxford: Pergamon, 1985.

MIRBAGHERI, M.; NAHVI, I.; EMTIAZI, G.; DARVISHI, F. Enhanced Production of Citric Acid in *Yarrowia lipolytica* by Triton X-100. Appl. Biochem. Biotechnol. v. 165, p. 1068–1074, 2011.

MORGNER, N.; ZICKERMANN, V.; KERSCHER, S.; WITTIG, I.; ABDRAKHMANOVA, A.; BARTH, H. D.; BRUTSCHY, B.; BRANDT, U. Subunit mass fingerprinting of mitochondrial complex I. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, v. 1777, p. 1384–1391, 2008.

MORGUNOV, I. G.; KAMZOLOVA, S. V.; PEREVOZNIKOVA, O. A.; SHISHKANOVA, N.V.; FINOGENOVA, T.V. Pyruvic acid production by a thiamine auxotroph of *Yarrowia lipolytica.* Process Biochemistry, v. 39, p. 1469– 1474, 2004.

MORÍN, M.; MONTEOLIVA, L.; INSENSER, M.; GIL, C.; DOMÍNGUEZ, A. Proteomic analysis reveals metabolic changes during yeast to hypha transition in *Yarrowia lipolytica*. Journal of Mass Spectrometry, v. 42, p. 1453–1462, 2007.

MORRISON, J. F. Purification and some properties of aconitase. *Biochem J*. 55(319TH): iv–iv, 1953.

MOYER, A. J. Effect of alcohol on the mycological production of citric acid in surface and submerged culture, 1. Nature of alcohol effect. Applied Microbiology, v. 1, p. 1-7, 1953.

MOURYA, S. & JAUHRI, K. S. Production of citric acid from starch-hydrolysate by *Aspergillus niger*. Microbiological Research,v. 155, p. 37–44, 2000.

NADEEM, A.; SYED, Q.; BAIG, S.; IRFAN, H.; NADEEM, M. Enhanced production of citric acid by *Aspergillus niger* M-101 using lower alcohols. Turkish Journal of Biochemistry, v. 35(1), p. 7–13, 2010.

NELSON, D. L. & COX, M. M. Lenhninger: Princípios da Bioquímica, São Paulo. Sarvier, p. 441-464, 2002.

NICAUD, J-M.; MADZAK, C.; BROEK, P.V.D; GYSLER, C.; DUBOC, P.; NIEDERBERGER, P.; GAILLARDIN, C. Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*, FEMS Yeast Research, v.2, n.3, p.371-379, 2002.

NICHOLLS, D. G. & FERGUSON, S. J. Bioenergetics 3.Academic Press, London, 2002.

OAKLEY, B.R., KIRSCH, D.R., MORRIS, N.R. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. Analytical Biochemistry, v.105, n.2, p.361-3, 1980.

O´FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem, v. 250(10), p. 4007-4021, 1975.

OHLMEIER, S.; KASTANIOTIS, A. J.; HILTUNEN, J. K.; BERGMANN, U. The yeast mitochondrial proteome, a study of fermentative and respiratory growth. The Journal of Biological Chemistry, v. 279, no 6, p. 3956-3979, 2004.

ORTHAFER, R.; KUBICEK, C. P.; ROHR, M. FEMS Microbiol Lett, 5:403, 1979.

OTTO, C.; HOLZ, M.; BARTH, G. Production of organic acids by *Yarrowia lipolytica*. Microbiology Monographs, v. 25, p. 137-149, 2013.

PAPAGIANNI, M. "Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes," Biotechnology Advances, v. 22, no. 3, p. 189–259, 2004.

PAPAGIANNI, M. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling. Biotechnology Advances, v.25, p. 244–263, 2007.

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

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Modelling aspects of the biotechnological valorization of raw glycerol: production of citric acid by *Yarrowia lipolytica* and 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. J. Chem. Technol. Biotechnol., v. 78, p. 542–547, 2003.

PAPANIKOLAOU, S.; FAKAS, S.; FICK, M.; CHEVALOT, I.; PANAYOTOU, M. G.; KOMAITIS, M.; MARC, I.; AGGELIS, G. Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. Biomass and bioenergy, v. 32, p. 60 – 71, 2008.

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

PAPPIN, D. J. Peptide mass fingerprinting using MALDI-TOFmass spectrometry. Methods Mol Biol, v. 64, p. 165.173,1997.

PAZOUKI, M., & PANDA, T. Recovery of citric acid—A review. Bioprocess Engineering, v. 19, p. 435–439, 1998.

PINTO, R. T. P.; LINTOMEN, L.; BROGLIO, M. I. Presented at the 12th Symposium of Computer Aided Process Engineering (ESCAPE-12), The Hague, The Netherlands, 26–29, Extended Abstracts, p. 313, 2002.

PUNEKAR, N. S.; VAIDYANATHAN, C. S.; N.A. RAO, N. A. Mechanisms of citric acid fermentation by *A. niger*. J Sci Ind Res, v. 43, p. 269–287, 1984.

QUÍMICA E DERIVADOS. Estudo prevê escassez mudial. Setembro, 1997.

RABILLOUD, T.; KIEFFER, S.; PROCACCIO, V.; LOUWAGIE, M.; COURCHESNE, P. L.; PATTERSON, S. D.; MARTINEZ, P.; GARIN, J.; LUNARDI, J. Electrophoresis, v. 19, p. 1006–1014, 1998.

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

RANE, K.D. & SIMS, K. A. Oxygen uptake and citric acid production by *Candida lipolytica* Y 1095. Biotechnol. Bioeng. V. 43, p. 131-137, 1994.

RANE, K. D. & SIMS, K.A. Citric acid production by *Yarrowia lipolytica*: Effect of nitrogen and biomass concentration on yield and productivity Biotechnology Letters, v. 18 (10), p. 1139-1144, 1996.

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

RATLEDGE, C. Regulation of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. Biochemical Society Transactions, v.30, no. 6, p. 1047–1050, 2002.

RIVAS, B.; TORRADO, A.; TORRE, P.; CONVERTI, A.; DOMINGUEZ, J. M. Submerged citric acid fermentation on orange peel autohydrolysate. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 56, p. 2380–2387, 2008.

ROBAK, M.; RYMOWICZ, W.; FILIPKOWSKI, P. Effect of sodium acetate on citric acid production from glucose by *Yarrowia lipolytica*. Electronic Journal of Polish Agricultural Universities;10(4):22, 2007.

ROBIN, N.; LARRY, M.; JOHN, F.; JIM, S.; JERRY, M. An investigation of the chemistry of citric acid in military soldering applications. Naval Air Warfare-Center Weapons Div China Lake CA., Report no. A240592, 1995.

RODRIGUES, C. Desenvolvimento de bioprocesso para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido utilizando polpa cítrica. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná, p 1 – 107, 2006.

ROEHR, M., KUBICEK, C. P., KOMÍNEK, J., Citric acid, in Rehm, H. C., Reed, G. (Eds.), Biotechnology, vol. 6, Verlagsgesellschaft, Germany, p. 388–395, 1993.

ROEHR, M.; KUBICEK, C. P.; KOMÍNEK, J. Citric acid. In: Biotecchnology, v. 6, p. 307-345. (H. J. Rehm, G. Reed, eds.) 2ª ed., Weinheim, Verlag Chemie, 1996.

ROMANOVA, I.B., LENSKIKH, G.V., SHISHKANOVA, N.V., EZHOV, V.A., TROITSKAYA, L.V., AND TERMKHITAROVA, N.G., USSR Inventor's Certificate No. 969 036, Byull. Izobret. no. 11, 2000.

RYMOWICZ, W.; RYWINSKA, A.; AROWSKA, B.; JUSZCZYK, P. Citric Acid Production from Raw Glycerol by Acetate Mutants of *Yarrowia lipolytica*. *Chem. Pap.*, v. 60 (5), p. 391-394, 2006.

RYMOWICZ, W.; RYWINSKA, A.; GLADKOWSKI, W. Simultaneous production of citric acid and erythritol from crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* Wratislavia K1. Chemical Papers, v. 62, n. 3, p. 239–246, 2008.

RYMOWICZ, W.; FATYKHOVA, A. R.; KAMZOLOVA, S. V.; RYWIŃSKA, A.; MORGUNOV, I. G. Citric acid production from glycerol- containing waste of biodiesel industry by *Yarrowia lipolytica* in batch, repeated batch, and cell recycle regimes. Applied Micro- biology and Biotechnology, v. 87, p. 971–979, 2010.

RYWIŃSKA, A.; Rymowicz, W.; Zarowska, B.; Wojtatowicz, M. Biosynthesis of citric acid from glycerol by acetate mutants of *Yarrowia lipolytica* in fed-batch fermentation. Food Technology and Biotechnology, v. 47, no. 1, p. 1–6, 2009.

RYWINSKA, A.; JUSZCZYK, P.; MARCINKIEWICZ, M.; RYMOWICZ, W. Chemostat study of citric acid production from glycerol by *Yarrowia lipolytica*. Journal of Biotechnology, v. 152, p. 54–57, 2011.

RYWIŃSKA, A.; JUSZCZYK, P.; WOJTATOWICZ, M.; ROBAK , M.; LAZAR, Z.; TOMASZEWSKA, L.; RYMOWICZ, W. Glicerol as a promising substrate for *Yarrowia lipolytica* biotechnological applications. Biomass and Bioenergy, v. 48, p. 148-166, 2013.

SANCHEZ-RIERA F. Production of organic acids. Biotechnol, v. 5, p. 1–9, 2010.

SANTOS, J. A. F. Avaliação dos resíduos dos processamentos de suco de laranja e de cerveja para obtenção de ácido cítrico por fermentação em estado sólido. Dissertação

apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Biotecnologia Industrial, p 1-104, 2008.

SARRIS, D.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; KOUTINAS, A. A.; KOMAITIS, M.; PAPANIKOLAOU, S. Citric acid, biomass and cellular lipid production by *Yarrowia lipolytica* strains cultivated on olive mill wastewater-based media, Journal of Chemical Technology and Biotechnology, vol. 86, no. 11, p. 1439–1448, 2011.

SHAPIRO, A.L.; VINUELA, E.; MAIZEL, J.V.J. Molecular weight estimation of polypeptide chains by eletroforesis in SDS-Polyacrylamide gels. Biochemical and Biophysical Research Communications. v.28, n.5, p. 815-820, 1967.

SHISHIKURA, A.; TAKAHASHI, H.; SUPERCRIT, J. Citric acid purification process using compressed carbon dioxide. Fluids, v. 5, 303, 1992.

SHU, P. & JOHNSON, M. J .The interdependence of medium constituents in citric acid production by submerged fermentation. J Bacteriol, v. 54, p. 161–167, 1948.

SICKMANN, A.; REINDERS, J.; WAGNER, Y.; JOPPICH, C.; ZAHEDI, R.; MEYER, H. E.; SCHÖNFISCH, B.; Perschil, I.; CHACINSKA, A.; GUIARD, B.; REHLING, P.; PFANNER, N.; MEISINGER, C. The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. PNAS, v. 100, n. 23, p. 13207–13212, 2003.

SIKANDER, A.; HAQ, I. Role of different additives and metallic micro minerals on the enhanced citric acid production by *Aspergillus niger* MNNG-115 using different carbohydrate materials. Journal of Basic Microbiology, v. 45(1), p. 3–11, 2005.

SOCCOL, C. R; VANDENBERGHE, L. P. S.; RODRIGUES, C.; PANDEY, A. New Perspectives for Citric Acid Production and Application. Food Technol. Biotechnol., v. 44 (2) 141–149. 2006.

SPEICHER, D.W. Proteome Analysis. Interpreting the Genome. Chapter 1 Overview of proteome analysis, Elsevier, 2004.

STOTTMEISTER, U.; BEHRENS, U.; WEISSBRODT, E.; BARTH, G.; FRANKERINKER, D.; SCHULZE, E. Nutzung von Paraffinen und anderen Nichtkohlenhydrat- Kohlenstoffquellen zur mikrobiellen Citronensa¨uresynthese. Z. Allg. Mikrobiol. v. 22, p. 399–424, 1982.

SUZELLE, B.; JUN, S. K.; LI, W.; JIN-WOO, K. Optimization of citric acid production by *Aspergillus niger* NRRL 567 grown in a column bioreactor. Korean Journal of Chemical Engineering, v. 26 (2), p. 422–427, 2009.

TERPEN, J. V.. Biodiesel processing and production. Fuel Proc Technol, v. 86, p. 1097–1107, 2005.

THOMPSON, J.C.; HE, B.B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. Applied Engineering in agriculture, v. 22, p. 261-265, 2005.

TRAN, C. T.; SLY, L. I. & MITCHELL, D. A. Selection of a strain of Aspergillus for the production of citric acid from pineapple waste in solid-state fermentation. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v.14, p. 399–404, 1998.

TSUGAWA, R., NAKASE, T., KOYABASHI, T., YAMASHITA, K. & OKUMURA, S. Fermentation of *n*-paraffins by yeast. Part III. A-Ketoglutarate productivity of various yeasts, *Agr. Biol. Chem.*, v. 33, p. 929-938, 1969.

VANDENBERGHE, L.P.S; SOCCOL, C.R; PANDEY, A.; LEBEAULT, J.M. Microbial production of citric acid. *Braz. arch. biol. technol.*, v. 42, n.3, p. 263-276, 1999.

VANDENBERGHE, L.P.S.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A..; LEBEAULT, J.M. Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*, *Bioresour. Technol.*, v. 74 , p. 175–178, 2000.

VENTER, T.; KOCK, J. L. F.; BOTES, P. J.; SMIT, M. S.; HUGO, A. E JOSEPH, M. Acetate Enhances Citric Acid Production by *Yarrowia lipolytica* When Grown on Sunflower Oil. Systematic and Appied Microbiology, v. 27, p. 135-138, 2004.

YALCIN, S. K.; BOZDEMIR, M. T.; OZBAS, Z. Y. Citric acid production by yeasts: fermentation conditions, process optimization and strain improvement. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, p. 1374-1382, 2010.

YIGITOGLU, M. Production of citric acid by fungi. Journal of Islamic Academy of Sciences, v. 5, p. 100 – 106, 1992.

YOKOYA, F. Citric Acid Production. In: Industrial Fermentation Series, Campinas, SP, Brazil, p. 1–82, 1992.

WAITES, M. J.; MORGAN, N.L.; ROCKEY, J. S.; HIGTON, G. Industrial Microbiology, An Introduction. U.K: Blackwell Science Ltd; 2001.

WANG, J. Improvement of citric acid production by *Aspergillus niger* with addition of phytate to beet molasses. Bioresource Technology, v. 65, p. 243–245, 1998.

WANG, L. F.; WANG, Z. P.; LIU, X. Y.; Z.M. CHI, Z. M. Citric acid production from extract of Jerusalem artichoke tubers by the genetically engineered yeast *Yarrowia lipolytica* strain 30 and purification of citric acid. Bioprocess and Biosystems Engineerin, v. 36, p. 1759-1766, 2013.

WEN, Z.; PYLE, D.; ATHALYE, S. Glycerol waste from biodiesel manufacturing. In G. Aggelis (Ed.), Microbial conversions of raw glycerol, p. 1–7, New York: Nova Science 2009.

WIDIASA, I. N.; SUTRISNA, P. D.; WENTEN, I. G. Performance of a novel electrodeionization technique during citric acid recovery. Sep. Purif. Technol., v. 39, p. 89 –97, 2004.

WILKINS, M.R., PASQUALI, C., APPEL, R.D., OU, K., GOLAZ, O., SANCHEZ, J.C., YAN, J.X., GOOLEY, A.A., HUGHES, G., HUMPHERY-SMITH, I., WILLIAMS, .L. AND HOCHSTRASSER, D.F. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology*, v. 14, 61–65, 1996.

WILKINS, M. R.; WILLIANS, K. L.; APPEL, R. D.; HOCHSTRASSER, D. F. (Ed) Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics. Berlin: Springer-Verlag., p. 1- 243, 1997.

WILLKE, T. & VORLOP, K. D. Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry. Appl Microbiol Biotechnol, v. 66 (2), p. 131–142, 2004.

WYNN, J. P.; KENDRICK, A.; RATLEDGE, C. Sesamol as an Inhibitor of Growth and Lipid Metabolism in *Mucor circinelloides* via Its Action on Malic Enzyme. Lipids, v. 32, no. 6, p. 605-610, 1997.

WYNN, J.P. & RATLEDGE, C. Malic Enzyme Is a Major Source of NADPH for Lipid Accumulation by *Aspergillus nidulans*, Microbiology 143, 253–257, 1997.

XIONG, YI.; CORADETTI, S. T.; LI, X.; GRITSENKO, M. A.; CLAUSS, T.; PETYUK, V.; CAMP, D.; SMITH, R.; CATE, J. H. D.; YANG, F.; LOUISE GLASS, N. L. The proteome and phosphoproteome of *Neurospora crassa* in response to cellulose, sucrose and carbon starvation. Fungal Genetics and Biology, DOI: 10.1016/j.fgb.2014.05.005, 2014.

ZHANG, H.J.; ZHANG, J.H.; XU, J.; TANG, L.; ZHONG-GUI MAO, Z.G. A novel recycling process using the treated citric acid wastewater as ingredients water for citric acid production. Biochemical Engineering Journal, v. 90, p. 206-213, 2014.

ZINJARDE, S. S. Food-related applications of Yarrowia lipolytica. Food Chemistry, v. 152, p 1–10, 2014.

http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?2.6.1.1, (KEGG) acessado em 28/10/2014 às 21:38 h).

(Revista Cargill, ano 21 – Outubro-Novembro- 2011, acessada em www.cargill.com.br/wcm/groups/public/@csf/@brazil/documents/document/na3053291 pdf - 2014-01-12, no dia 15 de julho de 2014).

(http://www.cargill.com.br/pt/noticias/NA31306201.jsp, publicada pela Reuters em 19/03/2014 e acessada em 15 de julho de 2014.

(http://www.ihs.com/products/chemical/planning/ceh/citric-acid.aspx, Publicado em fevereiro de 2013, acessado em 21 de julho de 2014).

ANEXO I

Tabela I - Proteínas identificadas na fração mitocondrial de células de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 cultivadas em meio controle YPG

Banda	Código no NCBI	Nome da proteína (MASCOT)	Massa Teórica (KDa)	pI Teórico	Score (MASCOT)	Matches	Cobertura (%)	Bandas	Organismo	Processo Biológico	Via (KEGG)	Categoria (KEGG)	Localização
2	gi|50547471	YALI0B22066p	99,54	4,79	147	3	4	2, 11	*Yarrowia lipolytica* CLIB122	Processo de biossintese de ATP	Fosforilação oxidativa	Metabolismo-Metabolismo Energético	Membrana
	gi|50549945	YALI0D05467p	79689	5,56	102	3	4	2, 12	*Yarrowia lipolytica* CLIB122	Síntese de ATP acoplada ao transporte de elétrons	Fosforilação oxidativa	Metabolismo-Metabolismo Energético	Membrana
	gi|210075713	YALI0D11374p	70322	6,23	78	1	1	2, 12	*Yarrowia lipolytica* CLIB122	Ciclo do ácido tricarboxilico	Ciclo do ácido tricarboxilico e fosforilação oxidativa (KEGG)	Metabolismo de carboidrato, Metabolismo energético	Membrana interna da mitocôndria (KEGG)
	gi|361127131	putativo subunidade NADH-ubiquinona oxidoredutase 78 kDa, mitocondrial	68903	8.02	74	2	3	2	*Glarea lozoyensis* 74030	Síntese de ATP acoplada ao transporte de elétrons	Fosforilação oxidativa	Metabolismo-Metabolismo Energético	Membrana
	gi|156564666	citocromo c oxidase subunidade 2, parcial (mitocondria)	22578	4,69	65	1	5	2	*Yarrowia lipolytica*	cadeia transportadora de elétrons	Fosforilação oxidativa	Metabolismo -Metabolismo Energético	Membrana Interna de mitocôndria
	gi|154275722	Subunidade de succinato desidrogenase flavoproteína	70827	6.21	64	1	1	2	*Ajellomyces capsulatus* NAm1	cadeia transportadora de elétrons e ciclo do ácido tricarboxilico	Ciclo do ácido tricarboxilico e fosforilação oxidativa (KEGG), Biosintese de metabólitos secundários	Metabolismo-Metabolismo de carboidrato. Metabolismo Energético	Mitocôndria
3	gi|50555055	YALI0F03179p	58100	8,91	324	9	16	3, 5, 13, 15	*Yarrowia lipolytica* CLIB122	Produção de ATP a partir de ADP na presença de um gradiente de prótons através da membrana	Fosforilação oxidativa	Metabolismo-Metabolismo Energético	Complexo transporte de prótons ATP sintase, núcleo catalítico F (1)
	gi|126274595	Complexo F1F0-ATPase, subunidade F1 alfa	58815	8,78	220	6	9	3, 5, 13	*Scheffersomyces stipitis* CBS 6054	Hidrólise de ATP acoplada a transporte de próton ou sintese de ATP acoplada a transporte de próton	Fosforilação oxidativa	Metabolismo-Metabolismo Energético	Complexo transporte de prótons ATP sintase, núcleo catalítico F (1)
	gi|7275	Fator de alongamento 1-alfa	49936	8,52	157	3	6	3, 13	*Dictyostelium discoideum*	Biossintese de proteina	RNA transport	Processo de Informação Genética -Tradução	Citoplasma
	gi|223998706	Fator de alongamento 1-alfa	48126	6,84	157	3	6	3, 8, 13	*Thalassiosira pseudonana* CCMP1335	Biossintese de proteina	RNA transport	Processo de Informação Genética -Tradução	Citoplasma
	gi|523423909	ZYBA0S06-03774g1_1 ou ATP sintase subunidade alfa	59234	9,15	148	5	7	3	*Zygosaccharomyces bailii* CLIB 213	Síntese de ATP acoplada a transporte de próton	Fosforilação oxidativa	Metabolismo-Metabolismo Energético	Complexo transporte de prótons ATP sintase, núcleo catalítico F (1)
	gi|210075206	YALI0B03982p	54616	5.07	146	4	9	3, 13 e 14	*Yarrowia lipolytica* CLIB122	Produção de ATP a partir de ADP na presença de gradiente de próton através da membrana	Fosforilação oxidativa	Metabolismo-Metabolismo Energético	Complexo transporte de prótons ATP sintase, núcleo catalítico F (1)

Tabela I - continuação

	gi|50546785	YALI0B13970p ou glicerol-3-fosfato desidrogenase (KEGG)	67950	5,98	126	4	6	3	*Yarrowia lipolytica* CLIB122	processo metabólico glicerol-3-fosfato			Complexo glicerol-3-fosfato desidrogenase, Mitocôndria (Ohlmeier et al., 2004)
	gi|357434536	Fator de alongamento e tradução 1 alfa, parcial	30776	10	124	3	9	3	*Cenococcum geophilum*	Biossintese de proteina			
	gi|336377168	Fator de alongamento e tradução 1 alfa, parcial	33637	7,17	122	3	8	3	*Citeromyces hawaiiensis*	Biossintese de proteina			
	gi|516554341	ATP sintase, parcial	21896	5,2	71	2	12	3	*Magnusiomyces tetrasperma*	ATP binding			
	gi|490745942	MULTIESPECIES: precorrin-6X redutase	73640	5,84	67	1	1	3	*Lachnospiraceae*	Processo biossintético de cobalamina			
	gi|50550971	YALI0D17864p ou Cadeia longa de acil-CoA sintetase	77068	7,5	66	2	3	3	*Yarrowia lipolytica* CLIB122	Atividade catalítica	Biossintese de ácidos graxos	Metabolismo-Metabolismo de lipídeo	
4	gi|50555990	YALI0F14223p	39628	9.33	142	3	7	4, 6, 11 e 14	*Yarrowia lipolytica* CLIB122	Transporte (familia transportadora mitocondrial)			Membrana
	gi|50543574	ADP/ATP proteina transportadora ou YALI0A10659p	32967	9,7	112	2	5	4	*Yarrowia lipolytica* CLIB122	Transporte transmembranar			Membrana Interna Mitocondrial
	gi|50555522	YALI0F08613p	44203	6,15	70	4	10	4,14	*Yarrowia lipolytica* CLIB122	Transporte de elétrons; Cadeia Respiratória; transporte	Fosforilação oxidativa	Metabolismo-Metabolismo Energético	Membrana Interna Mitocondrial
	gi|240281608	Proteina hipotética conservada	24857	9,76	62	2	8	4	*Ajellomyces capsulatus* H143]	Transporte transmembranar			Membrana Interna Mitocondrial
5	gi|2997727	Fator de Alogamento e tradução 1-alfa	50494	9,03	120	3	6	5, 8	*Yarrowia lipolytica* CLIB122	Biossintese de proteina			Citoplasma
	gi|159895252	Fator de Alogamento e tradução 1-alfa, parcial	33557	7,7	107	3	8	5	*Kuraishia cidri*	Biossintese de proteina			
	gi|50556244	YALI0F17314p	29627	8,83	98	2	8	5, 6 e 14	*Yarrowia lipolytica* CLIB122	Porina: proteina transmembranar			Membrana Externa Mitocondrial
	gi|222476495	Fator de Alogamento e tradução 1-alfa	25193	8,7	93	3	10	5	*Arthonia caesia*	Biossintese de proteina			
	gi|56377826	Fator de Alogamento-1 alfa	25307	6,67	78	2	7	5	*Rhodotorula marina*	Biossintese de proteina			
	gi|50548217	YALI0C07953p	80285	4,93	75	2	2	5, 8	*Yarrowia lipolytica* CLIB122	Enovelamento de proteinas	Processamento de proteinas no reticulo endoplasmático	Processo de Informação Genética - Folding, sorting and degradation	

Tabela I - continuação

6	gi|50554163	YALI0E27962p	99528	5,5	87	2	2	6	*Yarrowia lipolytica* CLIB122	Processo metabólico de proteína; Regulação de transcrição			
	gi|50548497	YALI0C11341p	34617	4,9	75	2	6	6, 14 e 15	*Yarrowia lipolytica* CLIB122				
7	gi|961482	Fator de Alogamento-1 alfa	50082	9,27	133	3	5	7	*Neurospora crassa*	Biossíntese de proteína			Citoplasma
	gi|254566257	Proteína de choque térmico Hsp90	80851	4,84	111	3	4	7	*Komagataella pastoris* GS115	Resposta a estresse	Processamento de proteínas no retículo endoplasmático	Processo de Informação Genética - Folding, sorting and degradation	
	gi|156848696	Proteína Hipotética Kpol_1002p16	81400	4,74	105	3	4	7	*Vanderwaltozyma polyspora* DSM 70294	Enovelamento de proteínas e Resposta a estresse	Processamento de proteínas no retículo endoplasmático	Processo de Informação Genética - Folding, sorting and degradation	
	gi|50548073	YALI0C06171p	36666	6,97	80	2	7	7 e 8	*Yarrowia lipolytica* CLIB122	Atividade oxidoredutase			
	gi|123666	Proteína de choque térmico 83	81121	5,15	80	2	2	7	*Trypanosoma brucei brucei* (protozoário)	Processo catabólico de ATP			Citoplasma
8	gi|50545043	YALI0A14806p	52754	5,61	128	1	2	8 e 13	*Yarrowia lipolytica* CLIB122				Matriz mitocondrial
	gi|50547339	40S proteína ribossomal S19	16237	8,86	108	2	11	8	*Yarrowia lipolytica* CLIB122	Tradução		Processo de Informação Genética -Tradução	Ribossomo
	gi|50551803	60S proteína ribossomal L14 ou YALI0E00550p	15648	10,84	71	1	8	8	*Yarrowia lipolytica* CLIB122	Tradução		Processo de Informação Genética -Tradução	Ribossomo
	gi|210075961	YALI0F06061p	10472	9,82	71	1	11	8	*Yarrowia lipolytica* CLIB122	complexo NADH-ubiquinona redutase, subunidade (ncbi)			
	gi|210075787	40S proteína ribossomal S18 ou YALI0D20614p	17776	10,25	70	1	7	8	*Yarrowia lipolytica* CLIB122	Tradução		Processo de Informação Genética -Tradução	Ribossomo
	gi|50543518	60S proteína ribossomal L35 ou YALI0A09922p	14164	10,97	66	1	8	8	*Yarrowia lipolytica* CLIB122	Tradução		Processo de Informação Genética -Tradução	Ribossomo
10	gi|50551053	YALI0D18744p	8364	10,73	68	1	12	10	*Yarrowia lipolytica* CLIB122				Membrana Interna Mitocondrial
	gi|452844805	Proteína hipotética DOTSEDRAFT_70666	10313	9,43	63	1	7	10	*Dothistroma septosporum* NZE10				
	gi|569421590	Serina / treonina-proteína-quinase	42995	6,67	62	1	2	10	*Reticulomyxa filosa* (protista)	Atividade de proteína-quinase			
	gi|50557242	YALI0F29975p	27321	6,96	61	2	11	10	*Yarrowia lipolytica* CLIB122	Atividade oxidoredutase			

Tabela II - Proteínas identificadas na fração mitocondrial de células de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 cultivadas em meio otimizado por Da Silva (2010) para produção de ácido cítrico

Banda	Código no NCBI	Nome da proteína	Massa Teórica (KDa)	pI Teórico	Score (MASCOT)	Matches	Cobertura (%)	Organismo	Bandas	Processo Biológico	Via (KEGG)	Categoria (KEGG)	Localização
11	gi|50547471	YALI0B22066p	99,54	4,79	1106	22	18	*Yarrowia lipolytica* CLIB122	2, 11, 12, 13, 14, 15 , 16 e 17	Processo de biossintese de ATP	Fosforilação oxidativa	Metabolismo-Metabolismo Energético	Membrana
	gi|562973879	Plasma membrane ATPase	98,676	5,00	515	10	7	*Ogataea parapolymorpha* DL-1	11 e 12	Processo de biossintese de ATP	Fosforilação oxidativa	Metabolismo-Metabolismo Energético	Membrana
	gi|212537861	P-type ATPase, putative	101,378	5,69	382	7	4	*Talaromyces marneffei* ATCC 18224	11 e 12	Processo de biossintese de ATP			Membrana
	gi|191174826	plasma membrane ATPase 2	100,051	5,2	314	6	5	*Leptosphaeria maculans*	11 e 12	Processo de biossintese de ATP			Membrana
	gi|345569769	hypothetical protein AOL_s00007g539	102,086		310	6	5	*Arthrobotrys oligospora* ATCC 24927	11 e 12	Processo de biossintese de ATP			Membrana
	gi|46109086	PMA1_NEUCR Plasma membrane ATPase (Proton pump)	100,290	4,94	305	6	5	*Fusarium graminearum* PH-1	11	Processo de biossintese de ATP	Fosforilação oxidativa	Metabolismo-Metabolismo Energético	Membrana
	gi|367005989	hypothetical protein TPHA_0K01590	99,209	4,84	302	7	5	*Tetrapisispora phaffii* CBS 4417	11	Processo de biossintese de ATP	Fosforilação oxidativa	Metabolismo - Metabolismo Energético	Membrana
	gi|115396758	Plasma membrane ATPase	102,532	5,13	291	6	4	*Aspergillus terreus* NIH2624	1, 12, 13, 14 e 1	Processo de biossintese de ATP			Membrana
	gi|332687492	Plasma membrane H+-ATPase	99,641	4,94	198	5	4	*Saccharomyces uvarum*	11 e 12	Processo de biossintese de ATP			Membrana
	gi|50550183	YALI0D08228p (ADP/ATP proteína transportadora adenina nucleotídeo translocator)	33,356	9,77	177	4	13	*Yarrowia lipolytica* CLIB122]	11	Transporte Transmembranar			Membrana Interna de Mitocôndria
	gi|50542946	YALI0A01023p	118,951	5,16	118	2	2	*Yarrowia lipolytica* CLIB122	11	ATP binding			Membrana
	gi|50546639	YALI0B12188p	144,542	5,6	108	2	1	*Yarrowia lipolytica* CLIB122	11	ATP binding	ABC transporters	Processo de Informação Ambiental-Transporte em membrana	Membrana
	gi|50548379	YALI0C09889p	66,430	8,94	95	3	3	*Yarrowia lipolytica* CLIB122	11	amino acid transmembrane transporter activity			Membrana
	gi|50555990	YALI0F14223p	39,628	9.33	83	1	4	*Yarrowia lipolytica* CLIB122	4, 6, 11 e 14	Transport (mitochondrial carrier family)			Membrana

Tabela II - continuação

12	gi|210075535	YALI0C17347p	70,062	5,42	209	5	10	*Yarrowia lipolytica* CLIB122	12	protein folding	RNA degradation	Processo de Informação Genética - Folding, sorting and degradation	Membrana Mitocondrial Interna (KEGG)
	gi|210075713	YALI0D11374p	70,322	6.23	107	3	5	*Yarrowia lipolytic* a CLIB122	2, 12	Ciclo do ácido tricarboxilico	Citrate cycle e Oxidative phosphorylation (KEGG)	Metabolismo de carboidrato, Metabolismo energético	Membrana interna da mitocôndria (KEGG)
	gi|51012446	mitochondrial aconitate hydratase	81,777	5,7	93	2	3	*Yarrowia lipolytic* a	12	Ciclo do ácido tricarboxilico	Ciclo do ácido tricarboxilico	Mteabolismo de carboidrato	Matriz Mitocondrial
	gi|50549945	YALI0D05467p (MASCOT) ou NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1 (KEGG) ou complex I (mitochondrial electron transport) KEGG	79,689	5,56	79	2	3	*Yarrowia lipolytica* CLIB122	2, 12	Síntese de ATP acoplada a transporte de elétrons	Fosforilação oxidativa	Metabolismo-Metabolismo Energético	Membrana
13	gi|50555055	YALI0F03179p ou ATP synthase subunit alpha	58,1	8,91	435	8	18	*Yarrowia lipolytica* CLIB122	3, 5, 13 e 15	Produz ATP a partir de ADP, na presença de um gradiente de prótons através da membrana	Fosforilação oxidativa	Metabolismo-Metabolismo Energético	Complexo transporte de prótons ATP sintase, núcleo catalítico F (1)
	gi|210075206	YALI0B03982p ou ATP synthase subunit beta	54,616	5.07	350	5	14	*Yarrowia lipolytica* CLIB122	3, 13 e 14	Produz ATP a partir de ADP, na presença de um gradiente de prótons através da membrana	Fosforilação oxidativa	Metabolismo-Metabolismo Energético	Complexo transporte de prótons ATP sintase, núcleo catalítico F (1)
	gi|50545043	YALI0A14806p	52,754	5,61	157	2	4	*Yarrowia lipolytica* CLIB122	8 e 13				Matriz mitocondrial
	gi|126274595	F1F0-ATPase complex, F1 alpha subunit (NCBI) e ATP synthase subunit alpha (UNIPROT) e F1F0-ATPase complex, F1 alpha subunit (EC:3.6.3.14) (KEGG)	58,815	8,78	125	2	4	*Scheffersomyces stipitis* CBS 6054	3, 5, 13	Produz ATP a partir de ADP, na presença de um gradiente de prótons através da membrana	Fosforilação oxidativa	Metabolismo-Metabolismo Energético	Complexo transporte de prótons ATP sintase, núcleo catalítico F (1)
	gi|50551453	YALI0D23683p ou Acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex (UNIPROT) e pyruvate dehydrogenase E2 component (dihydrolipoamide acetyltransferase)	45,714	4,94	115	4	9	*Yarrowia lipolytica* CLIB122	13	processo metabólico piruvato	glicólise / gliconeogênese, ciclo de citrato (ciclo TCA), Metabolismo de Piruvato, Biossíntese de metabólitos secundários	Metabolismo de carboidrato	Complexo piruvato desidrogenase, matriz da mitocondria
	gi|71483401	elongation factor 1alpha	27,222	7,83	115	3	14	*Microbotryum violaceum*	13	Biosíntese de Proteína			

Tabela II - continuação

	gi|7275	elongation factor 1 alpha	49,936	8,52	88	2	4	*Dictyostelium discoideum*	3 e 13	Biosintese de Proteina	RNA transport	Processo de Informação Genética -Tradução	Citoplasma
	gi|50551225	YALI0D20768p ou Dihydrolipoyl dehydrogenase	53,450	6,55	67	2	3	*Yarrowia lipolytica* CLIB122	13	cell redox homeostasis	Gliconeogênese, ciclo de citrato (ciclo TCA), metabolismo de glicina, serina e treonina, degradação de valina, leucina e isoleucina, Metabolismo do piruvato, Biossíntese de metabólitos	Metabolismo-Metabolismo de carboidrato, Metabolismo de amioácidos	
14	gi|50548497	YALI0C11341p	34617	4,9	643	16	39	*Yarrowia lipolytica* CLIB122	6, 14 e 15				
	gi|50555522	YALI0F08613p ou Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial; Complex III subunit 2; Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein 2	44,203	6,15	465	8	24	*Yarrowia lipolytica* CLIB122	4 e 14	Transporte de elétrons; Cadeia Respiratória; Transporte	Fosforilação oxidativa	Metabolismo-Metabolismo Energético	Membrana Interna Mitocondrial
	gi|50556244	YALI0F17314p (UNIPROT) ou voltage-dependent anion channel protein 2 (KEGG)	29,627	8,83	236	5	20	*Yarrowia lipolytica* CLIB122	5, 6, 14 e 15	Porina: proteina transmembranar			Membrana Externa Mitocondrial
	gi|50550873	YALI0D16753p ou Malate dehydrogenase (UNIPROT)	35,853	8,54	189	4	13	*Yarrowia lipolytica* CLIB122	14	Ciclo do ácido tricarboxilico	Ciclo do ácido tricarboxilico	Metabolismo - Metabolismo de Carboidrato	Matriz Mitocondrial
	gi|154273230	sphingolipid long chain base-responsive protein PIL1	40,290	5,43	188	7	9	*Ajellomyces capsulatus* NAm1	14				
	gi|562977197	Sphingolipid long chain base-responsive protein LSP1	33,917		170	5	15	*Ogataea parapolymorpha* DL-1	14				
	gi|50545753	YALI0B02178p ou Aspartate aminotransferase (UNIPROT) e aspartate aminotransferase, mitochondrial [EC:2.6.1.1] (KEGG)	47,787	8,78	168	4	12	*Yarrowia lipolytica* CLIB122	14	cellular amino acid metabolic process	Metabolismo de Alanina, aspartato e glutamato	Metabolismo - Metabolismo de Aminoácido	In eukaryotes there are cytoplasmic, mitochondrial and chloroplastic isozymes
	gi|212540872	cell wall integrity signaling protein Lsp1/Pil1, putative	39,396	5,36	126	4	5	*Talaromyces marneffei* ATCC 18224	14				
	gi|32127383	Actin	36,605	5,95	124	3	13	*Yarrowia lipolytica*	14	ATP binding			citoplasma
	gi|365985389	hypothetical protein NDAI_0C06250	38,53	4,54	99	4	11%	*Naumovozyma dairenensis* CBS 421	14				
	gi|50288123	hypothetical protein	35,129	4,68	97	2	11	*Candida glabrata* CBS 138	14				

Tabela II - continuação

	gi|50549875	YALI0D04554p	49,056	8,42	78	1	3	*Yarrowia lipolytica* CLIB122	14				Membrana Externa de mitocôndria
	gi|50547337	YALI0B20482p (UNIPROT) prohibitin 2 (KEGG)	33,176	9,91	65	1	3	*Yarrowia lipolytica* CLIB122	14	Biogênese Mitocondrial (KEGG)			Membrana Interna Mitocondrial (Tatsuta et al., 2005)
15	gi|50545255	YALI0A17468p (UNIPROT) ubiquinol-cytochrome c reductase cytochrome c1 subunit (KEGG)	36,772	8,66	120	4	16	*Yarrowia lipolytica* CLIB122	15	Atividade transportadora de elétrons	Fosforilação Oxidativa	Metabolismo-Metabolismo Energético	
	gi|6522910	Actin (UNIPROT) actin beta/gamma 1(KEGG)	41,987	5,61	76	3	6	*Yarrowia lipolytica*	15 e 19	ATP binding	Phagosome	Processo Celular-Tansporte e catabolismo	citoplasma, citoesqueleto
	gi|50552520	YALI0E07623p	20,382	9,04	72	1	7	*Yarrowia lipolytica* CLIB122	15				
	gi|50555469	YALI0F07975p (UNIPROT) mitochondrial fission process protein 1 (KEGG)	24220	8,91	71	1	6	*Yarrowia lipolytica* CLIB122	15	Biogênese Mitocondrial (KEGG)			
16	gi|50547939	**YALI0C04389p**	28,56	9,18	73	1	6	*Yarrowia lipolytica* CLIB122	16 e 17				
18	gi|50550487	**YALI0D11814p (UNIPROT) e F-type H+-transporting ATPase subunit f (KEGG)**	11,447	10,33	60	2	22	*Yarrowia lipolytica* CLIB122	18		Fosforilação oxidativa	Metabolismo-Metabolismo Energético	
19	gi|210076047	**YALI0F18359p (UNIPROT) NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 5 (KEGG)**	10,240	8,4	65	2	22	*Yarrowia lipolytica* CLIB122	19		Fosforilação oxidativa	Metabolismo-Metabolismo Energético	Mitocondria