UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos

Escola de Química

Fermentação extrativa para produção de lipase e ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica*

Ariane Gaspar Santos

Março/2018

FERMENTAÇÃO EXTRATIVA PARA PRODUÇÃO DE LIPASE E ÁCIDO CÍTRICO POR *Yarrowia lipolytica*

Ariane Gaspar Santos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadores:

Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc.

Bernardo Dias Ribeiro, D. Sc.

Rio de Janeiro

2018

Ariane Gaspar Santos

Fermentação extrativa para produção de lipase e ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada por:

Orientadores

_____

Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc., EQ/UFRJ

_____

Bernardo Dias Ribeiro, D.Sc., EQ/UFRJ

Banca examinadora

_____

Priscilla Filomena Fonseca Amaral, D.Sc., EQ/UFRJ

_____

Ivaldo Itabaiana Jr., D.Sc., EQ/UFRJ

_____

Viridiana Santana Ferreira-Leitão, D.Sc., INT

_____

Adalberto Pessoa Junior, D.Sc., USP

A todos aqueles que não tiveram o privilégio do acesso à educação.

AGRADECIMENTOS

Finda esta longa jornada, não há como deixar de registrar aqui minha gratidão e carinho por todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a elaboração desse trabalho e/ou participaram dessa trajetória ao meu lado, cada um de uma maneira única.

Minha gratidão à Profª Maria Alice, pela orientação, por ter me aberto as portas e confiado no meu potencial. Obrigada pelo seu apreço quase maternal, que nunca deixa de pensar nos nossos próximos passos e está sempre disposta a nos escutar nos momentos mais decisivos.

Ao Prof. Bernardo, por toda a contribuição científica, ensinamentos, confiança e compreensão nos momentos difíceis. Obrigada por abrir meus olhos nas horas certas, pelos puxões de orelha e pelo seu comportamento inquieto e inspirador. E também ao amigo Bernardo, por todas as conversas aleatórias e trocas. Gratidão por me mostrar que é possível formar laços diante de tantas diferenças.

À Profª Isabel Marrucho, por ter me recebido tão bem em seu laboratório (Laboratório de Termodinâmica Molecular) durante o mês que passei no ITQB-Oeiras. Obrigada por compartilhar seus conhecimentos sobre os líquidos iônicos e pelas contribuições para esse trabalho.

Aos colegas portugueses, David, Catarina, Andréia, Liliana e Felipe, pelos dias de trabalho agradáveis, e por toda disponibilidade e ajuda.

Agradeço a todos os integrantes do BIOSE por toda ajuda durante esses anos, em especial aos que compõem o laboratório 103. O que falar desses amores? Etel, Gizele, Kelly, Mariana, Marcelle, de quem sinto saudades, obrigada pelos anos de convívio e troca, nossos almoços/terapia em grupo eram uma delícia! E para os “cremosos”, Fernanda, Veronica, Roseli, Larissa, Caê, Felipe, Andressa, Lili, Dani, Júlio, Luciana, Mari, Marselle, Pietro, Pri, Bia, um agradecimento mais que especial. É maravilhoso fazer parte dessa família, um exemplo de união e companheirismo como nunca vi antes. Obrigada por todas as risadas, lamentações compartilhadas, consolos e o mais importante: problematizações nossas de cada dia. Dividir os dias de trabalho com vocês tornou a jornada muito mais leve!

“Iripe”, sua ajuda foi preciosa. Obrigada por todas as discussões científicas, ajudas técnicas no biorreator e consultorias aleatórias, tu és um orientador nato. Grata por toda tua generosidade e por ter me intimado a dar aulas no pré-vestibular, mudaste minha vida.

Obrigada Bia, pela ajuda nas longas tardes/noites de titulação, que bom que o Felipe aceitou compartilhar você comigo (rs).

Obrigada Mari, pela ajuda nas análises por HPLC.

Às minhas amigas Carol e Tayná, que me apresentaram o Rio e me acompanham desde o mestrado, obrigada pelos cafés, saídas, ouvidos e conselhos. A todos os amigos Recifenses (Dessa, Hugo, Fernanda, Renata, ...), que sempre me incentivaram a trilhar esse caminho, mesmo com o sacrifício da distância.

À minha marida Lili, parceira de laboratório e vizinha, agora nunca me falta cerveja, ops, açúcar.

À minha irmã Amanda, minha musa inspiradora desde a adolescência, obrigada por sempre acreditar na tua pequena, por saber o que eu sinto apenas no olhar, por me dar colo a qualquer momento (ainda que por Skype) e mostrar minha força quando precisei resgatá-la.

À minha irmã Adri, minha segunda mãe, pelo apoio, amizade e preocupação.

Aos agregados da família, Celinho e Júlio, pelo carinho e apoio. Obrigada Celinho, pelos ouvidos atentos, conselhos oportunos e por ter me apresentado ao Carl Sagan.

Àquele com quem tenho dividido meus melhores momentos, Marcio, que me acompanha há 9 anos e amadurece junto comigo. Teu otimismo e tua autoconfiança me completam, tua essência cativante me inspira. Obrigada por todo amor e parceria.

Àqueles que possibilitaram minha existência, painho e mainha, vocês são minha torcida mais ingênua e mais genuína. A distância nos separa fisicamente, apenas, carrego-os sempre comigo, eu sou muito de vocês. Obrigada, com muito amor.

A minha vó Aurea, por ter sido minha família presente durante os primeiros anos e por compreender minhas limitações em mantê-la por perto.

Aos professores que compõem o Programa de Pós-Graduação EPQB, que contribuíram para meu aperfeiçoamento profissional, assim como todos os funcionários da Escola de Química, pela ajuda com os procedimentos burocráticos.

“A ciência é muito mais uma maneira de pensar do que um corpo de conhecimento”

Carl Sagan

RESUMO

SANTOS, Ariane Gaspar. **Fermentação extrativa para produção de lipase e ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica***. Rio de Janeiro, 2018. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Este trabalho propõe o emprego de sistemas aquosos bifásicos (SAB) formados por polietilenoglicol (PEG)/sal ou PEG/líquido iônico na produção de lipase ou ácido cítrico por fermentação extrativa. Inicialmente foi proposta a redução de escala da produção de lipase e ácido cítrico, representando uma redução de custos e otimização de tempo do estudo. O cultivo realizado em Erlenmeyer de 10 mL proporcionou um aumento na taxa específica de crescimento celular e aumento de 37 vezes na produção máxima de lipase, em comparação ao cultivo em escala maior (200 mL). Este incremento foi atribuído ao aumento no coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) devido à miniaturização do cultivo. Ensaios de tolerância foram realizados para avaliar a concentração máxima não tóxica (CMNT) dos componentes do SAB para *Y. lipolytica.* Foram selecionados os sais fosfatos de potássio, fosfato de sódio, sulfato de amônio, sulfato de sódio, PEG 2000, PEG 4000, PEG 6000 e o líquido iônico dihidrogenofosfato de colina [Ch][DHP], para os quais a CMNT obtida foi maior que 9% (m/v). O sistema PEG 2000 (30 % m/v)/sal (7% m/v) proporcionou maior crescimento celular e produção de ácido cítrico. Com o sistema PEG 2000/KH_2PO_4 foi obtido um coeficiente de partição de 0,41 para o ácido cítrico. Já o sistema com melhor rendimento de recuperação (79,75%) de ácido cítrico foi o PEG 2000/Na_2SO_4. Estudos mais detalhados foram realizados para a produção de lipase por fermentação extrativa. O aumento da massa molar do PEG reduziu a produção de lipase e o coeficiente de partição. Na presença de PEG 2000 (30%)/KH_2PO_4-K_2HPO_4 (7%) (pH 7,0) foi obtida uma produção de lipase de 634,32 U/L e K_L = 2,22. Alterações na concentração do tampão fosfato (5% e 9%) e no pH (6,0 e 8,0) reduziram a produção de lipase. A cinética de produção de lipase em Erlenmeyer de 10 mL (250 rpm) e em biorreator 1,5 L (550 rpm) demonstrou que a presença do SAB no meio fermentativo provocou um retardo na curva de crescimento e no pico de produção de lipase, e este último permitiu observar uma redução na concentração de oxigênio dissolvido, a qual é limitante para o metabolismo celular. Estudos de transferência de massa podem elucidar tais questões e possibilitar a obtenção de parâmetros competitivos com o sistema homogêneo.

Palavras-chave: lipase, ácido cítrico, fermentação extrativa, sistema aquoso bifásico, miniaturização

ABSTRACT

SANTOS, Ariane Gaspar. **Extractive Fermentation for lipase and citric acid production by *Yarrowia lipolytica*.** Rio de Janeiro, 2018. Thesis (Doctor of Science) – Chemistry School, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

This work proposes application of aqueous biphasic systems (ABS) formed by polyethylene glycol (PEG)/salt or PEG/ionic liquid in culture medium to produce lipase or citric acid by extractive fermentation. Initially, it was proposed a scale-down of lipase and citric acid production, which represented costs and time reduction. The 10 mL Erlenmeyer culture provided an increase in the specific growth rate and a 37 fold increasing in maximal lipase production as compared to the larger scale (200 mL) culture. This increase was attributed to the volumetric oxygen transfer coefficient (k_La) increment due to the culture miniaturization. Tolerance tests were performed to evaluate the maximum non-toxic concentration (MNTC) of ABS components for *Y. lipolytica*. Potassium phosphates, sodium phosphate, ammonium sulfate, sodium sulfate, PEG 2000, PEG 4000, PEG 6000 and choline dihydrogenophosphate [Ch][DHP] salts were selected, because MNTC obtained was greater than 9% (w/v). The system composed by PEG 2000 (30% w/v)/salt (7% w/v) provided the highest concentration of biomass and citric acid. With PEG 2000/KH_2PO_4 ABS a partition coefficient of 0.41 was obtained for citric acid. The system that showed the best yield of citric acid recovery (79.75 %) was PEG 2000/Na_2SO_4. More detailed studies were carried out for the production of lipase by extractive fermentation. The presence of PEG 2000 (30 %)/KH_2PO_4-K_2HPO_4 (7%) (pH 7.0) provide a lipase production of 634.32 U/L and K_L = 2.22. Changes in phosphate buffer concentration (5% and 9%), besides pH (6.0 and 8.0) reduced lipase production. The kinetics of lipase production in 10 mL Erlenmeyer (250 rpm) and 1.5 L bioreactor (550 rpm) demonstrated that the presence of SAB in the fermentative medium caused a delay in the growth curve and peak lipase production, and the latter allowed to observe a reduction in the concentration of dissolved oxygen, which is limiting for the cellular metabolism. Mass transfer studies can elucidate such questions and enable the achievement of competitive parameters with the homogeneous system.

Key words: lipase, citric acid, extractive fermentation, aqueous biphasic system, miniaturization

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1 Sistema integrado para fermentação e recuperação de produto *in situ*. Fermentação combinada com (a) arraste gasoso, (b) pervaporação. ABE (acetona-butanol-etanol) (Lee et al., 20008). **28**

Figura 3.2 Configurações de sistemas de fermentação extrativa ou remoção do produto in situ. Contato direto em reator (1); contato direto em loop externo (3). Imobilização dos micro-organismos (2a); Membrana interna (2b); loop externo com módulo de membranas (4a); loop externo associado a separação de células (4c); imobilização de células associada a loop externo (4c) (Stark e Von Stockar, 2003). **29**

Figura 3.3 Representação esquemática de fermentação extrativa combinando membrana de fibra oca e solventes orgânicos (Chen e Lee, 1997). **31**

Figura 3.4 Ilustração do diagrama de fase (Sinha et al., 2000a). **35**

Figura 3.5 Efeito da massa molar do PEG na curva binodal para PEG-NaH2PO4-H2O a 25 ºC (Zafarani-Moattar e Sadeghi, 2001). **36**

Figura 3.6 Efeito do tipo de sal na curva binodal para sistema PEG6000-sal-H_2O a 25 ºC (Zafarani-Moattar e Sadeghi, 2001). **37**

Figura 3.7 Estrutura dos principais cátions e ânions utilizados em líquidos iônicos (Fauzi e Amin, 2012) **42**

Figura 3.8 Morfologia das colônias e células de linhagens de *Yarrrowia lipolytica*. (A) Morfologia da colônia da linhagem selvagem H222 (Fil+) e mutante filamentosa (Fil-) em meio rico YPD. (B) morfologia celular, leveduras em YNB (imagem superior) e forma filamentosa na presença de soro (imagem inferior) (Nicaud, 2012). **48**

Figura 3.9 Sumário de reações realizadas por lipase (Rahman e Basri, 2006). **50**

Figura 3.10 Efeito do PFC (% v/v) na produção de lipase por *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 em frasco de 1 L com 200 mL de meio ((100-x)% meio YPD ou meio YP (com 1 % v/v de óleo de oliva) + x % PFC) agitado a 250 rpm. Barra de erro representa desvio-padrão. Fonte: (Amaral, et al., 2006). **54**

Figure 3.11 Exemplo de sensor para monitoramento de pH e oxigênio dissolvido, comercialmente disponível e seu funcionamento. **72**

Figura 4.1 Esquema do ensaio para determinação da concentração máxima não tóxica (CMNT). **73**

Figura 4.2 Estrutura dos ânions e do cátion utilizados para síntese dos líquidos iônicos.

Figura 4.3 Sistemas miniaturizados utilizados. Erlenemeyer de 10 mL (A); Base das microplacas do sistema Duetz (B); microplaca 24 poços de 11mL (24MTP/11mL) (C); microplaca 24 poços de 25mL (24MTP/25mL) (D). **79**

Figura 5.1 Perfil de crescimento de *Yarrowia lipolytica* em diferentes sistemas miniaturizados. Valores de biomassa: (▲) Erlenmeyer de 10 mL (10EF); (♦) microplaca de 24 poços de 11 mL (24MTP/11mL); (●) microplaca de 24 poços de 25 mL (24MTP/25mL); (■) Biorreator 1,5 L. Valores de pH: (Δ)10EF; (◊) 24MTP/11mL; (○) 24MTP/25mL; (□) Biorreator 1,5 L. **88**

Figura 5.2 Perfil da produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* em diferentes sistemas miniaturizados. Os valores são dados como a média de três experimentos ± desvios-padrão. (▲) Erlenmeyer de 10 mL (10EF); (♦) microplaca de 24 poços de 11 mL (24MTP/11mL); (○) microplaca de 24 poços de 25 mL 24MTP/25mL. **91**

Figura 5.3 Perfil cinético da produção de lipase (■) e concentração de oxigênio dissolvido (OD) (▲) para o cultivo de *Yarrowia lipolytica* em 0,75 L de meio YPD em Biorreator de 1,5 L a 550 rpm e 1vvm. **92**

Figura 5.4 Efeito de diferentes sistemas miniaturizados sobre a atividade proteolítica de *Yarrowia lipolytica*. Os valores são dados como a média de três experimentos ± desvios-padrão**:** (▲) Erlenmeyer de 10 mL (10EF); (♦) microplaca de 24 poços de 11 mL (24MTP/11mL); (○) microplaca de 24 poços de 25 mL (24MTP/25mL). **93**

Figura 5.5 Cinética da produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* em frasco Erlenemeyr de 10 mL: (□) biomassa; (▲) ácido cítrico; (■) pH. **97**

Figura 6.1 Valores de concentrações máximas não tóxicas (CMNT) de vários sais inorgânicos e PEG determinados para *Yarrowia lipolytica*, e variação de pH. **98**

Figure 7.1 Dados de crescimento da fermentação extrativa contendo PEG 2000 25%/Sal 15% (m/v) após 96h em meio de produção de ácido cítrico e após 26 h em **105**

meio de produção de lipase. A biomassa final no cultivo controle de lipase foi 20 ± 0,25 g p.s./L e no cultivo de ácido cítrico foi 4,03 ± 0,35 g p.s./L.

Figura 7.2 Células de *Y. lipolytica* localizadas na interface de sistemas aquosos bifásico após centrifugação. **107**

Figura 7.3 Diagramas de fase para os sistemas formados por (A) (B) (C) PEG 2000 e sais, (D) PEG 2000 e [Ch][DHP], todos a 25°C. (A) diagrama de fase para PEG 2000/NaH_2PO_4 (-x-) em água (ZAFARANI-MOATTAR; SADEGHI, 2001); (◊) com componentes majoritários do meio de cultivo. (B) diagrama de fase para PEG 2000/$(NH_4)_2SO_4$ (●) em água (PENG; LI; LI, 1994); (○) com componentes majoritários do meio de cultivo. (C) diagrama de fase para PEG 2000/Na_2SO_4 (■) em água; (□) com componentes majoritários do meio de cultivo. (D) diagrama de fase para PEG 2000/[Ch][DHP] (▲) em água; (Δ) com componentes majoritários do meio de cultivo. **112**

Figura 7.4 Cinética de crescimento de *Yarrowia lipolytica* cultivada em Erlenmeyer de 10 mL (4 mL volume útil) na presença de sistema aquoso bifásico formado por PEG 2000 (30%)/ KH_2PO_4-K_2HPO_4 (pH 7,0) (7%): (▲) Biomassa (g p.s/L); (Δ) ln X (g p.s/L). **125**

Figura 7.5 Cinética de produção de lipase por *Yarrowia lipolytica* cultivada em Erlenmeyer de 10 mL (4 mL volume útil) na presença de sistema aquoso bifásico formado por PEG 2000 (30%)/ KH_2PO_4-K_2HPO_4 (pH 7,0) (7%): (▲) fase de topo; (□) fase de fundo ;(♦) lipase total. **126**

Figura 7.6 Cinética de crescimento de *Yarrowia lipolytica* cultivada em biorreator 1,5L (0,75 L volume útil) na presença de sistema aquoso bifásico formado por PEG 2000 (30%)/ KH_2PO_4-K_2HPO_4 (pH 7,0) (7%): (▲) Biomassa (g p.s/L); (■) Oxigênio dissolvido (OD) (mg/L); (Δ) ln X (g p.s/L). **130**

Figura 7.7 Cinética de produção de lipase por *Yarrowia lipolytica* cultivada em biorreator de 1,5 L (0,75 L de volume útil) na presença de sistema aquoso bifásico formado por PEG 2000 (30%)/ KH_2PO_4-K_2HPO_4 (pH 7,0) (7%): (▲) fase de topo; (□) fase de fundo ;(♦) lipase total. **131**

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1. Exemplos de aplicação de líquidos iônicos em fermentação extrativa. **45**

Tabela 3.2. Lipases disponíveis comercialmente (Casas-Godoy et al., 2012). **51**

Tabela 3.3. Aplicações de ácido cítrico (Soccol et al., 2006). **70**

Tabela 3.4. Comparação de alguns sistemas de cultivo HTP comercialmente disponíveis (adaptado de Long *et al*., 2014) **71**

Tabela 4.1. Concentração das soluções estoque utilizadas na determinação da concentração máxima não tóxica (CMNT). **76**

Tabela 4.2. Concentrações das soluções estoque de líquidos iônicos utilizadas para determinação da concentração máxima não tóxica (CMNT). **77**

Tabela 5.1. Parâmetros do cultivo de *Yarrowia lipolytica* em diferentes sistemas miniaturizados e em biorreator de bancada 1,5 L, incluindo dados da literatura para outros cultivos em escala laboratorial. **89**

Tabela 6.1. Componentes cuja concentração máxima testada não inibiu o crescimento de *Y. lipolytica.* **99**

Tabela 6.2 Valores de concentrações máximas não tóxicas (CMNT) para líquidos iônicos baseados em colina. **101**

Tabela 6.3 Valores de concentrações máximas não tóxicas (CMNT) para líquidos iônicos baseados em colina e aminoácidos. **102**

Tabela 7.1 Efeito de diferentes sais na produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* na presença de sistema aquoso bifásico formado por PEG 2000 (25 % m/v) e Sais (15% m/v), após 96 horas de cultivo **105**

Tabela 7.2 Efeito de diferentes sais na produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* na presença de sistema aquoso bifásico formado por PEG 2000 (30 % m/v) e Sais (7 % m/v) após 96 horas de cultivo. **109**

Tabela 7.3 Efeito de diferentes sais na produção de lipase por *Yarrowia lipolytica* na presença de sistema aquoso bifásico formado por PEG 2000 (30 % m/v) e Sais (7 % m/v) após 26 horas de cultivo. **109**

Tabela 7.4 Influência da massa molar do PEG (30 % m/v) combinado com diferentes sais (7 % m/v) no crescimento de *Y. lipolytica* em meio de cultivo para produção de lipase por fermentação extrativa. **114**

Tabela 7.5 Efeito de diferentes sais e massa molar de PEG na partição da lipase produzida por *Yarrowia lipolytica* na presença de sistema aquoso bifásico formado por PEG (30 % m/v) e Sais (7 % m/v) após 26 horas de cultivo. **116**

Tabela 7.6 Efeito de diferentes sais e massa molar de PEG na produção de lipase total por produzida por *Yarrowia lipolytica* na presença de sistema aquoso bifásico formado por PEG (30 % m/v) e Sais (7 % m/v) após 26 horas de cultivo. **117**

Tabela 7.7 Efeito de diferentes concentrações de tampão fosfato de potássio e massa molar de PEG no crescimento celular e na partição da lipase produzida por *Yarrowia lipolytica* na presença de sistema aquoso bifásico utilizando PEG (30 % m/v) e KH_2PO_4-K_2HPO_4 (pH 7,0) (7 % m/v) após 26 horas de cultivo. **121**

Tabela 7.8 Efeito de diferentes concentrações de tampão fosfato de potássio e massa molar de PEG na produção de lipase total por *Yarrowia lipolytica* na presença de sistema aquoso bifásico utilizando PEG (30 % m/v) e KH_2PO_4-K_2HPO_4 (pH 7,0) (7 % m/v) após 26 horas de cultivo. **121**

Tabela 7.9 Efeito do pH do tampão fosfato de potássio e massa molar de PEG na partição da lipase produzida por *Yarrowia lipolytica* na presença de sistema aquoso bifásico formado por PEG (30 % m/v) e KH_2PO_4-K_2HPO_4 (7 % m/v), após 26 horas de cultivo. **123**

Tabela 7.10 Efeito do pH do tampão fosfato de potássio e massa molar de PEG na produção de lipase total por *Yarrowia lipolytica* na presença de sistema aquoso bifásico formado por PEG (30 % m/v) e KH_2PO_4-K_2HPO_4 (7 % m/v) após 26 horas de cultivo. **123**

Tabela 7.11 Cinética de produção de lipase por *Yarrowia lipolytica* cultivada em Erlenmeyer de 10 mL (4 mL volume útil) na presença de sistema aquoso bifásico formado por PEG 2000 (30%)/ KH_2PO_4-K_2HPO_4 (pH 7,0) (7%). **127**

Tabela 7.12 Cinética de produção de lipase por *Yarrowia lipolytica* cultivada em biorreator 1,5L (0,75 L volume útil) na presença de sistema aquoso bifásico formado por PEG 2000 (30%)/ KH_2PO_4-K_2HPO_4 (pH 7,0) (7%). **131**

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

10EF	Erlenmeyer de 10 mL
24MTP/11mL	Microplaca 24 poços de 11mL
24MTP/25mL	Microplaca 24 poços de 25mL
Ac	Acetato
AEL	Atividade específica de lipase (U/mg)
AEL_F	Atividade específica de lipase na fase de fundo (U/mg)
AEL_T	Atividade específica de lipase na fase de topo (U/mg)
AL	Atividade lipolítica (U/mL)
Ala	Alaninato
Asn	Asparaginato
Asp	Aspartato
BF_4	Tetrafluoroborato
But	Butanoato
Bz	Benzoato
C/N	Razão carbono/nitrogênio
C_4mmim	1-butil-2,3-dimetilimidazólio;
C_4mpyr	1-butil-1-metilpirrolidínio;
C_6mpyr	1-hexil-1-metilpirrolidínio;
C_6py	*N*-hexylpiridínio.
C_B	Concentração na fase de fundo (g/L ou U/L)
Ch	Colina
CLSI/NCCLS	*Clinical and Laboratory Standards Institute*
CMNT	Concentração máxima não tóxica
C_P	Concentração de proteína (mg/mL)
C_T	Concentração na fase de topo (g/L ou U/L)
DHP	Dihidrogenofosfato
-dS/dt	Taxa de consumo de glicose (g/L.h)
EOPO	Copolímero randômico de óxido de etileno e óxido de propileno
FDA	*Food and Drug Administration*
Gln	glutamina

Glu	Glutamato
Gly	Glicinato
GRAS	*Generally Regarded as Safe*
Hex	Hexanoato
His	Histidinato
HTP	*High-throughput screening*
ISPR	*in situ product removal*
K	Coeficiente de partição
K_{AC}	Coeficiente de partição do ácido cítrico
K_{AE}	Coeficiente de partição da atividade específica de lipase
K_L	Coeficiente de partição da lipase
$k_L a$	Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (h^{-1})
K_P	Coeficiente de partição de proteínas
Lac	Lactato
LI	Líquido iônico
MTP	Microplaca
NTf_2	Bis(trifluorometilsulfonil)imida
OD	Oxigênio dissolvido (mg/L)
p.s.	Peso seco
PEG	Polietilenoglicol
PF_6	Hexafluorofosfato
PFC	Perfluorocarboneto
pI	Ponto isoelétrico
pK_a	Cologarítimo da constante de acidez
pO_2	Concentração de oxigênio dissolvido
Pro	Prolinato
R_V	Razão do volume das fases
SAB	Sistema aquoso bifásico
Sal	Salicilato
Ser	Serinato
STR	*Stirred tank Reactor*
TTO	Taxa de transferência de oxigênio
V_F	Volume da fase de fundo (L)

$\mathbf{V_m/V_f}$	Volume de meio/volume de frasco
$\mathbf{V_T}$	Volume da fase de topo (L)
vvm	Volume de ar por volume de meio por minuto
YPD	*Yeast Extract, Peptone, Dextrose*
$\boldsymbol{\eta_F}$	Percentual de recuperação do ácido cítrico na fase de fundo (%)
$\boldsymbol{\eta_T}$	Percentual de recuperação dos componentes na fase de topo (%)

SÚMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 22
2. OBJETIVOS 25
2.1 Objetivos específicos 25
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 26
3.1 REMOÇÃO DE PRODUTO *IN SITU* 26
3.1.1 Configurações e Técnicas de ISPR 27
3.1.1.1 Arraste gasoso e Pervaporação 27
3.1.1.2 Adsorção e Absorção 28
3.1.1.3 Fermentação Extrativa 29
3.1.2 Sistemas de Extração Líquido-Líquido 31
3.1.2.1 Extração Reativa 33
3.1.2.2 Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB) 34
3.1.2.3 Líquidos Iônicos 41
3.2 *Yarrowia lipolytica* 46
3.3 LIPASE 50
3.3.1 Produção de Lipase por *Yarrowia lipolytica* 52
3.3.1.1 Meios de Cultivo 53
3.3.1.2 Temperatura e pH 56
3.3.1.3 Agitação e Aeração 56
3.4 ÁCIDO CÍTRICO 58
3.4.1 Produção de Ácido Cítrico por *Yarrowia lipolytica* 62
3.4.1.1 Fontes de Carbono 62
3.4.1.2 Fontes de Nitrogênio 66
3.4.1.3 Temperatura e pH 67
3.4.1.4 Agitação e Aeração 68
3.4.1.5 Recuperação do Produto 69
3.5 MINIATURIZAÇÃO DE FERMENTAÇÕES 70
4. MATERIAIS E MÉTODOS 74
4.1 MATERIAIS 74
4.2 EQUIPAMENTOS 74

4.3 MICRO-ORGANISMO 74
4.4 ENSAIO DE TOLERÂNCIA 75
4.4.1 Preparo dos líquidos iônicos 77
4.5. CULTIVOS 78
4.5.1 Composição do meio para produção de lipase 78
4.5.2 Composição do meio para produção de ácido cítrico 78
4.5.3 Experimentos preliminares 79
4.5.3.1 Cultivo e sistemas miniaturizados 79
4.5.3.2 Cultivo em biorreator 80
4.5.4 Experimentos em sistemas bifásicos 80
4.5.4.1 Fermentação em sistemas de duas fases aquosas 80
4.5.4.2 Diagrama de fase 81
4.5.5 Autoclavação 81
4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS 81
4.6.1 Quantificação da concentração celular 81
4.6.2 Determinação da atividade lipolítica 82
4.6.3 Determinação da atividade proteolítica 83
4.6.4 Quantificação de glicerol, glicose e ácido cítrico 84
4.6.5 Determinação do teor de proteína 84
4.6.6 Determinação do pH 84
4.6.7 Determinação do $k_L a$ 85
4.7 Determinação dos parâmetros de separação da fermentação extrativa 85
5. CULTIVO DE *Yarrowia lipolytica* EM SISTEMAS MINIATURIZADOS 87
5.1 PRODUÇÃO DE LIPASE EM SISTEMA MINIATURIZADO 87
5.1.1 Cinética de crescimento 87
5.1.2 Produção enzimática 90
5.2 PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO EM SISTEMA MINIATURIZADO 96
6. DETERMINAÇÃO DA TOLERÂNCIA DA *Yarrowia lipolytica* A COMPONENTES DOS SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS 98
6.1 Polietilenoglicol e sais 98
6.2 Líquidos iônicos 100

7. PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO E LIPASE POR FERMENTAÇÃO EXTRATIVA 104

7.1 Ensaios preliminares 104

7.2 Influência dos componentes do meio de cultivo no diagrama de fase 110

7.3 Influência da massa molar do polietilenoglicol na produção de lipase por fermentação extrativa 113

7.4 Influência da concentração do tampão fosfato de potássio na produção de lipase por fermentação extrativa 120

7.5 Influência do pH tampão fosfato de potássio na produção de lipase por fermentação extrativa 122

7.6 Cinética da produção de lipase por fermentação extrativa em sistema miniaturizado.. 124

7.7 Cinética da produção de lipase por fermentação extrativa em biorreator 129

8. CONCLUSÕES 133

9. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS 134

REFERÊNCIAS 135

ANEXO I – CROMATOGRAMAS 159

ANEXO II - DIAGRAMAS DE FASE DISPONÍVEIS NA LITERATURA 163

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

Diversas abordagens podem ser desenvolvidas para otimização da produtividade e custo-benefício de um bioprocesso, desde a forma de operação (batelada simples, batelada alimentada, processos contínuos, etc) à manipulação genética dos micro-organismos produtores. Além da fase de produção, as etapas de recuperação e purificação do produto são de grande importância para a eficiência de um bioprocesso, podendo representar a etapa de maior custo. A integração das etapas de produção e separação vem sendo considerada como uma estratégia de aumento de rendimento, redução de tempo e de custos (HORI; UNNO, 2011).

A remoção do produto *in situ* (do inglês *In Situ* Product Removal - ISPR) envolve a simultânea produção e separação do produto acumulado, e pode evitar o efeito de inibição causada pelo produto, ou de subprodutos tóxicos formados durante o cultivo e, em alguns casos a decomposição do produto durante sua formação (SCHÜGERL; HUBBUCH, 2005). As técnicas aplicadas para este fim incluem por exemplo pervaporação, adsorção, absorção e fermentação extrativa. Essas podem ser aplicadas na recuperação de produtos voláteis (etanol e acetona-butanol), ácidos orgânicos (acético, lático, propiônico e butírico) e também para proteínas, peptídeos e antibióticos (DAFOE; DAUGULIS, 2014; MALINOWSKI, 2001).

A fermentação extrativa, uma das técnicas aplicadas (VAN HECKE; KAUR; DE WEVER, 2014), configura-se como um sistema de remoção interna na presença de uma fase de extração que pode ser formada a partir de um solvente orgânico ou polímero líquido imiscível em água, ou um sistema aquoso bifásico (SAB) composto por polímero-sal ou polímero-polímero. Além disso, os líquidos iônicos têm sido utilizados recentemente como potenciais substituintes dos solventes orgânicos e também como componentes dos SAB (DAFOE; DAUGULIS, 2014).

Os SAB têm sido aplicados tradicionalmente para a recuperação de proteínas e antibióticos (MARQUES et al., 2011; OOI et al., 2011; PANDEY; BANIK, 2011), cujas estruturas instáveis podem ser preservadas nesses meios aquosos. Já o seu uso na recuperação de moléculas pequenas é mais raro (DISSING; MATTIASSON, 1994; KWON; KAUL; MATTIASSON, 1996).

Dextrana de alta massa molar e polietilenoglicol são os dois polímeros mais utilizados em fermentação extrativa. Dextrana não exibe toxicidade e tem um efeito estabilizante para

células microbianas (SINHA; DEY; PANDA, 2000a). Esses sistemas têm sido aplicados na obtenção de produtos como enzimas (OOI et al., 2011; PANDEY; BANIK, 2011; SINHA; DEY; PANDA, 2000b), surfactantes (DROUIN; COOPER, 1992) e ácido lático (KATZBAUER et al., 1995). No entanto, a dextrana tem um custo elevado, sendo os sistemas formados por polietilenoglicol (PEG)/sal uma alternativa mais econômica. O desafio, neste caso, é ajustar as concentrações do sal para reduzir o seu efeito inibitório sobre o metabolismo celular de forma a garantir o sucesso da fermentação.

Líquidos iônicos podem ser definidos como sais orgânicos líquidos, com a possibilidade de ajuste de suas propriedades físico-químicas através da modificação da estrutura química de seus cátions e ânions. Seu uso no campo da biotecnologia, mais especificamente em processos com células microbianas envolve o uso de líquidos iônicos baseados em cátion imidazólio e os ânions [PF_6] e [NTf_2], que são imiscíveis em água. Sua aplicação como segunda fase orgânica é voltada principalmente para biossíntese de álcoois quirais (FAN; LI; CHEN, 2014). Novas classes de líquidos iônicos formados por compostos mais biocompatíveis e biodegradáveis, tais como colina (antiga vitamina B4) (FUKAYA et al., 2007; NOCKEMANN et al., 2007), ainda têm seus estudos de aplicação limitados sem registro de sua utilização em processo de fermentação extrativa, surgindo como uma alternativa mais verde ao uso de solventes orgânicos.

Como exposto acima, na técnica de fermentação extrativa a recuperação do produto alvo acontece continuamente à produção e suas vantagens podem incluir aumento de rendimento e produtividade, redução da degradação do produto, do tempo de processo e dos custos de recuperação. Além disso, diversos estudos vêm demonstrando melhores resultados na produção de enzimas em sistemas de fermentação extrativa quando comparado ao método convencional, tais como fosfatase alcalina (PANDEY; BANIK, 2011), lipase (OOI et al., 2011), endoglucanase (SINHA; DEY; PANDA, 2000b), e também para ácidos orgânicos, como ácido lático (PLANAS et al., 1996).

Nas etapas iniciais de investigação, em que se realiza um grande número de experimentos exploratórios em bioprocessos, a utilização de alguns componentes, tais como os líquidos iônicos ou mesmo PEG em fermentação extrativa, por exemplo, podem representar um custo econômico significativo. Geralmente, as investigações de parâmetros de cultivo são realizadas em frascos de agitação convencionais (25 mL a 2 L) e a proposta de promover a redução de escala do cultivo (2 a 4 mL) vem se tornando uma estratégia atrativa, principalmente nas etapas iniciais dos estudos em bioprocessos. Cultivo em escala

miniaturizada, tais como frascos agitados de volume reduzido e ainda as microplacas de poços redondos ou quadrados (DUETZ; WITHOLT, 2004) apresentam vantagens quanto a realização de diversos ensaios em paralelo, além de representarem redução de tempo de trabalho e custos (KUMAR; WITTMANN; HEINZLE, 2004).

Levando em consideração as vantagens desta abordagem, o presente trabalho teve como objetivo explorar a fermentação extrativa em sistemas miniaturizados utilizando a levedura não-convencional, *Yarrowia lipolytica*, capaz gerar produtos de grande interesse industrial, como lipases (BRÍGIDA et al., 2014), ácido cítrico (da SILVA et al., 2013), biossurfactante (FONTES et al., 2010) e eritritol (NASCIMENTO, 2016).

Capítulo 2

OBJETIVOS

2. OBJETIVO PRINCIPAL

O objetivo principal deste trabalho consiste em empregar a técnica de fermentação extrativa utilizando sistemas aquosos bifásicos na produção e recuperação de lipase e ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682.

2.1 Objetivos específicos

- Miniaturizar da produção de ácido cítrico e lipase em Erlenmeyer e microplacas;
- Determinar a tolerância de *Yarrowia lipolytica* frente a componentes dos sistemas de fermentação extrativa (sais inorgânicos, polietilenoglicol (PEG), líquidos iônicos (LI));
- Produzir e extrair lipase e ácido cítrico em sistemas aquosos bifásicos;
- Determinar a influência das variáveis massa molar do PEG, concentração dos sais e pH na produção e na partição de lipase em sistemas aquosos bifásicos;
- Produzir e extrair lipase utilizando sistemas aquosos bifásicos em biorreator, na melhor condição obtida.

Capítulo 3

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 REMOÇÃO DE PRODUTO *IN SITU*

Os bioprocessos consistem, usualmente de três etapas principais – *upstream,* produção/biorreator e *downstream* (HORI; UNNO, 2011), e para todas as etapas, mais especialmente nos processos de *downstream,* existe uma forte demanda para intensificação e integração de processos a fim de aumentar rendimentos, reduzir tempo de processo e custos (SCHÜGERL; HUBBUCH, 2005).

Um processo biotecnológico utilizando células íntegras como biocatalisadores pode ter sua produtividade afetada pela inibição do produto. Além disso o produto encontra-se diluído, e diversas etapas de separação e/ou purificação precisam ser aplicadas dependendo do nível de pureza necessária, o que leva a altos custos dos processos de *downstream* (HORI; UNNO, 2011; STARK; VON STOCKAR, 2003). Além de otimização no fornecimento de oxigênio, na transferência de calor no sistema, concentração e idade celular, e componentes do meio de produção, outras estratégias para aumento de produtividade de um processo biotecnológico envolvem a remoção do produto, simultaneamente à sua formação. A remoção de produto *in situ* (do inglês *in situ product removal,* ISPR) é uma parte da ideia geral de integração de processos, representando uma coordenação entre as etapas de reação e purificação, que pode aumentar a produtividade ou rendimento do bioprocesso (STARK; VON STOCKAR, 2003).

As vantagens de se investir em tecnologias de recuperação que permitam separação seletiva do produto durante a fermentação são (VAN HECKE; KAUR; DE WEVER, 2014):

1) Enriquecimento do produto, levando à diminuição de custos no processo de *downstream*;

2) Aumento da produtividade volumétrica através da atenuação da inibição pelo produto;

3) Redução do fluxo de processo (diminuindo a quantidade de resíduo por unidade de peso do produto);

4) Aumento do rendimento através da remoção do produto alvo do meio de fermentação tornando-o indisponível para reações paralelas.

Pesquisas envolvendo diferentes técnicas de remoção de produto *in situ* (ISPR) iniciaram no começo dos anos 1980's com o objetivo de aumentar a produtividade de etanol por via fermentativa em relação a sua produção pela indústria do petróleo (STARK; VON

STOCKAR, 2003). O sistema BIOSTIL, realizado em escala industrial e introduzido no Brasil, consistia em um sistema contínuo onde as células de levedura eram concentradas por centrifugação e recicladas, e o etanol separado em uma coluna de destilação em um *loop* externo. Além da aplicação de tecnologias de fermentação extrativa na produção de etanol, estas técnicas têm sido exploradas em outros bioprocessos como a produção dos solventes butanol e acetona, alguns ácidos orgânicos, tais como ácido lático e butírico, na conversão de esteroides, produção de compostos aromáticos, metabólitos secundários e vários compostos de química fina (STARK; VON STOCKAR, 2003).

Segundo levantamento de dados realizado de 2004 a 2014, 32% das publicações no assunto são direcionadas para a fermentação de álcool/solvente enquanto que para ácidos orgânicos e aromas/fragrâncias/outros produtos constituem 21% e 46% respectivamente (VAN HECKE; KAUR; DE WEVER, 2014).

3.1.1 Configurações e Técnicas de ISPR

Entre as técnicas de ISPR existem três métodos gerais de interação do meio fermentativo com a fase extratora: 1) arraste a gás e pervaporação; 2) adsorção e/ou absorção em matrizes poliméricas e 3) fermentação extrativa com solventes moleculares, líquidos iônicos, sistemas aquosos bifásicos. Ainda existem métodos combinados geralmente associados aos processos de separação por membranas.

3.1.1.1 Arraste gasoso e Pervaporação

Técnicas de evaporação só podem ser aplicadas a produtos que apresentam baixo ponto de ebulição, ou seja, são voláteis, tais como etanol e butanol (FREEMAN; WOODLEY; LILLY, 1993).

O arraste gasoso é uma técnica relativamente simples que não oferece risco a cultura microbiana e pode ser operado em modo contínuo. Durante o arraste gasoso, um fluxo de gás é aspergido através do meio durante a fermentação, capturando os produtos voláteis. O gás contendo os produtos é levado a uma unidade de resfriamento onde os produtos condensam, resultando em uma solução concentrada do solvente (DE VRIJE et al., 2013).

A pervaporação é um processo baseado em membrana que permite a remoção seletiva de compostos voláteis do meio reacional (Figura 3.1b). A membrana é colocada em contato com o meio reacional e os líquidos voláteis ou solventes difundem através da membrana, os quais são recuperados por condensação (LEE et al., 2008).

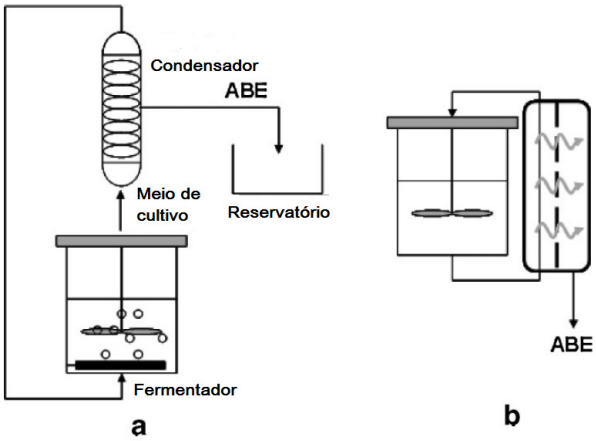


Figura 3.1. Sistema integrado para fermentação e recuperação de produto *in situ*. Fermentação combinada com (a) arraste gasoso, (b) pervaporação. ABE (acetona-butanol-etanol) (LEE et al., 2008).

3.1.1.2 Adsorção e Absorção

A remoção de produto por imobilização via adsorção em matrizes poliméricas tem sido demonstrado para uma ampla variedade de produtos, tais como etanol, ácido salicílico, ciclohexamida, antraquinonas, alcalóides, monoterpenos e ativador do plasminogênio tecidual (FREEMAN; WOODLEY; LILLY, 1993). Adsorventes neutros, tais como zeólitas, carbono ativado e resinas não-funcionalizadas interagem com as moléculas alvo através de interações hidrofóbicas (DAFOE; DAUGULIS, 2014). Além da hidrofobicidade, outras características adsorventes promovem seletividade. A exclusão por tamanho baseada no tamanho dos poros da resina correspondente as dimensões moleculares é uma ferramenta promissora para a recuperação de produtos durante a fermentação (DAFOE; DAUGULIS, 2014).

No caso da remoção de ácidos orgânicos, que por serem carregados negativamente não interagem com as resinas hidrofóbicas convencionais, resinas de troca-iônica podem ser aplicadas para extração dos ácidos na sua forma iônica (DAFOE; DAUGULIS, 2014).

Uma limitação destes materiais pode ser a adsorção não específica de compostos orgânicos da solução, o que resulta na remoção de ambos, produtos e substratos, levando a

redução da eficiência da remoção do produto assim como a necessidade de aumento no fornecimento de substrato para compensar o material adsorvido (HORI; UNNO, 2011). Além disso a recuperação de moléculas fortemente adsorvidas frequentemente requerem aquecimento ou soluções salinas concentradas para regenerar a resina, o que significa demanda por energia e geração de águas residuais (DAFOE; DAUGULIS, 2014).

Alternativamente aos polímeros adsorventes acima mencionados, uma classe distinta de polímeros amorfos (com reduzido grau de cristalinidade) e flexíveis (tendo baixa temperatura de transição vítrea) tem sido usada como "solventes sólidos" na remoção de produto *in situ*, uma vez que operam por solução e difusão passiva das moléculas alvo para o interior do polímero (DAFOE; DAUGULIS, 2014). A captação de pequenas moléculas para o interior destes polímeros termoplásticos é análoga à captação por solventes orgânicos, onde o mecanismo de absorção opera; enquanto que para adsorventes sólidos o fenômeno de adsorção de superfície é que comanda (PRPICH; DAUGULIS, 2007). Outra vantagem em relação aos polímeros adsorventes é a recuperação do produto através do contato do polímero com um solvente pelo qual a molécula alvo tenha maior afinidade do que pela água; e no caso de compostos voláteis basta que o material seja aquecido para recuperação do produto (DAFOE; DAUGULIS, 2014).

Polímeros absorventes exibem a mesma desvantagem com relação à redução da eficiência da extração no caso de afinidade do produto pela água. Devido a isso, blocos de copolímeros contendo diferentes segmentos de cadeia hidrofílica podem ser incorporados possibilitando propriedades de distribuição únicas dos metabólitos de interesse (DAFOE; DAUGULIS, 2014).

3.1.1.3 Fermentação Extrativa

Existem diversas técnicas utilizadas para remoção de produto *in situ*, que podem se apresentar em diferentes configurações, como demonstrado na Figura 3.2.

O contato direto pode ser efetuado em um reator (1) ou em um *loop* externo (3). Contato direto pode ser evitado dentro de um biorreator através de imobilização dos micro-organismos em uma matriz de gel, tal como alginato (2a) ou por uma membrana interna (2b). O contato indireto externo ao reator pode ser provido por três configurações diferentes: o meio de reação contendo as células é circulado em um *loop* externo através de módulo de membranas (4a); em outra configuração o meio pode ser clarificado a partir de micro-/ultrafiltração ou centrifugação antes de circular em uma unidade de separação externa (4c);

ou ainda o meio reacional que circula pelo *loop* separação externo é livre de células, uma vez que estas estarão imobilizadas dentro do reator (4b) (STARK; VON STOCKAR, 2003).

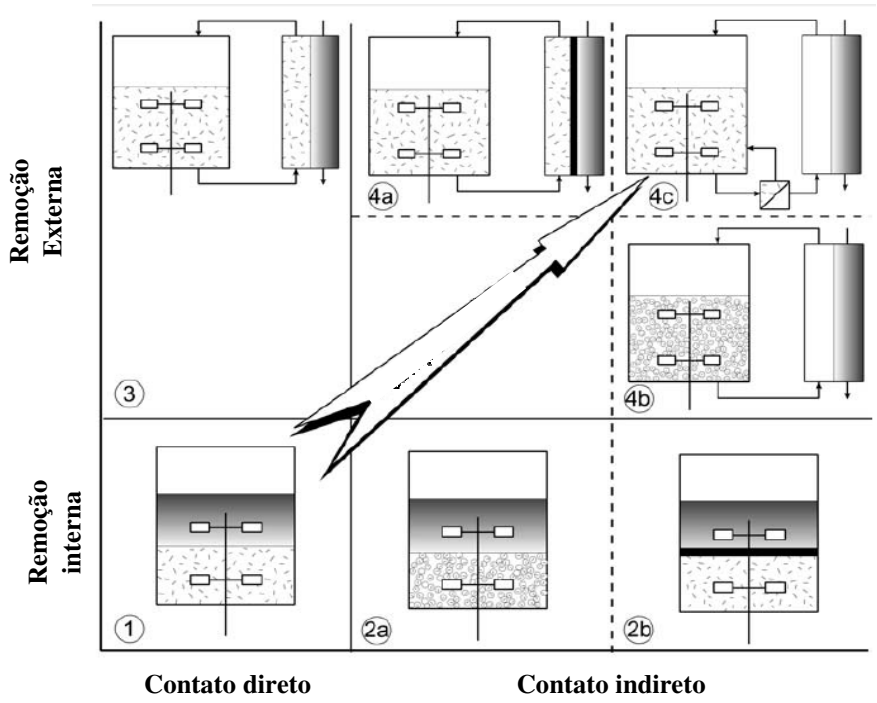


Figura 3.2. Configurações de sistemas de fermentação extrativa ou remoção do produto *in* situ. Contato direto em reator (1); contato direto em *loop externo* (3). Imobilização dos micro-organismos (2a); Membrana interna (2b); *loop* externo com módulo de membranas (4a); *loop* externo associado a separação de células (4c); imobilização de células associada a *loop* externo (4c) (STARK; VON STOCKAR, 2003).

Dentro dos métodos combinados, o uso de técnicas de permeação seletiva pelo uso de membranas tais como, diálise, eletrodiálise, osmose reversa ou nanofiltração são baseados nas diferenças de tamanho, pressão, concentração, e/ou potencial elétrico (STARK; VON STOCKAR, 2003), como explicado acima e visualizado na Figura 3.2, e todos os tipos de operação podem ser utilizados, batelada simples, batelada alimentada e modo de operação contínua (CARSTENSEN; APEL; WESSLING, 2012).

O uso de eletrodiálise foi descrito na produção contínua e recuperação de piruvato (ZELIĆ et al., 2004) e ácido lático (MIN-TIAN et al., 2004). A eletrodiálise é um processo utilizado para separação de substâncias ionizáveis em solução. O processo utiliza membranas com cargas positivas (aniônicas) e com cargas negativas (catiônicas), as quais são posicionadas, alternadamente, no interior do equipamento, formando uma série de compartimentos, sendo a diferença de potencial elétrico aplicada entre o conjunto de membranas a força motriz do processo (PESSOA JUNIOR; KILIKIAN, 2005).

A combinação do uso de membranas com uma segunda técnica tem sido demonstrada na separação de produtos por permeação do meio de cultivo através de membranas para uma fase contendo solvente orgânico (perstração). Chen e Lee (1997) investigaram a produção de ácido lático por *Lactobacillus delbrueckii* em um processo de fermentação com uma membrana de fibra oca submersa no fermentador e preenchida com uma amina terciária

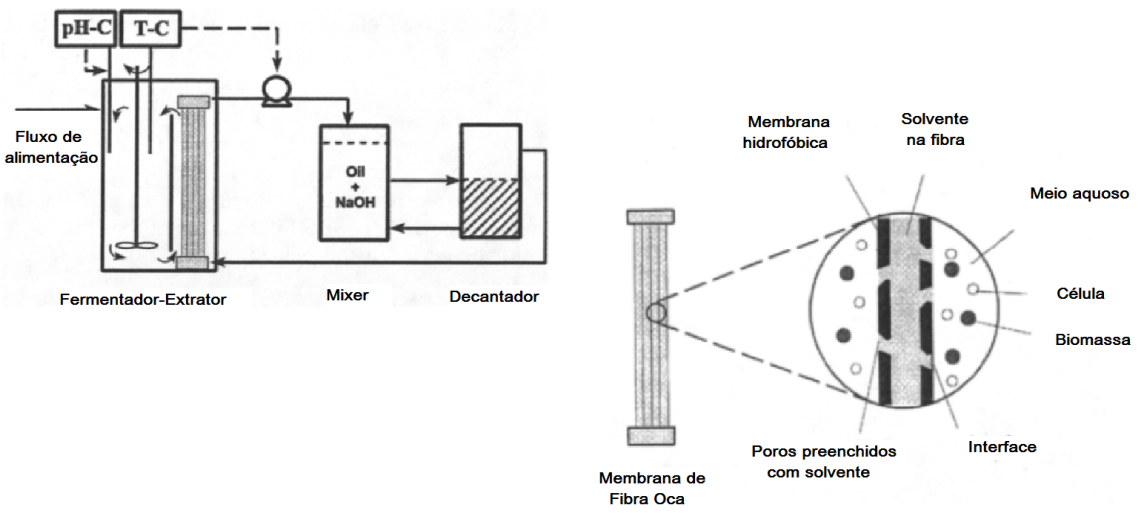


Figura 3.3. Representação esquemática de fermentação extrativa combinando membrana de fibra oca e solventes orgânicos (CHEN; LEE, 1997).

(Alamina 336) atuando como extrator do ácido lático (Figura 3.3).

3.1.2 - Sistemas de Extração Líquido-Líquido

Técnicas de remoção interna de produto, tais como extração líquido-líquido e sistemas aquosos bifásicos, são as mais utilizadas nas pesquisas de fermentação extrativa, por apresentarem uma configuração menos complexa a ser aplicada (VAN HECKE; KAUR; DE WEVER, 2014). Sistemas de extração líquido-líquido são tipicamente formados por solventes orgânicos imiscíveis em água, polímeros líquidos imiscíveis (polidimetilsiloxano), ou sistemas aquosos bifásicos baseados em polímeros líquidos e, mais recentemente, os líquidos iônicos que podem ser utilizados como solventes imiscíveis e como componentes de sistemas aquosos bifásicos (DAFOE; DAUGULIS, 2014).

Sistemas bifásicos formados por fase aquosa e solventes orgânicos têm sido amplamente estudados e podem ser considerados o centro de estudos envolvendo fermentação extrativa, como revisado por van Hecke et al. (2014). A seleção adequada do solvente é de

crucial importância no desenvolvimento de um processo de fermentação extrativa eficiente, e dentro dos critérios a serem atendidos o mais importante é a biocompatibilidade. É aceito na literatura, que a tolerância do micro-organismo ao solvente pode ser, até certo ponto, correlacionada com o log *P* (coeficiente de partição octanol/água) (INOUE; HORIKOSHI, 1991; SALTER; KELL, 1995; SARDESSAI; BHOSLE, 2002). Quanto maior a polaridade, menor o valor de log *P* e maior é a toxicidade do solvente (SARDESSAI; BHOSLE, 2002). Uma vez que os solventes orgânicos utilizados nestes sistemas bifásicos são hidrofóbicos, o potencial de extração é relacionado à hidrofobicidade e afinidade química da molécula alvo pelo solvente utilizado para extração (DAFOE; DAUGULIS, 2014). Sendo assim, a interação com produtos hidrofílicos pode não ser favorecida, não superando a sua afinidade pela água, o que reduz o coeficiente de distribuição e a eficiência do processo (DAFOE; DAUGULIS, 2014).

Na tentativa de aperfeiçoar a extração de etanol, um produto miscível em água, Keasler et al. (2013) utilizaram ferramentas de simulação molecular para explorar a interação entre soluto e solvente extrator, que no caso foram sete álcoois com 10 carbonos cada. A fim de atender aos principais critérios de escolha do solvente para os processos, foi possível demonstrar que solventes biocompatíveis, porém ineficientes na extração, podem ser combinados com solventes tóxicos com melhor desempenho resultando em uma mistura de solventes mais eficiente na extração e ainda biocompatível (BRUCE; DAUGULIS, 1991).

Problemas relacionados ao uso de solventes orgânicos em bioprocessos reside também na formação de emulsões estáveis com adesão das células, o que dificulta a separação do produto (HORI; UNNO, 2011), além de serem custosos e apresentarem conhecidos efeitos prejudiciais ao meio ambiente.

Sistemas aquosos bifásicos podem representar uma alternativa eficiente na aplicação em processos de fermentação extrativa. Ao invés de uma segunda fase formada por solvente orgânico, sistemas aquosos bifásicos são formados por duas fases ricas em água e, normalmente mais biocompatíveis (HORI; UNNO, 2011), resultado de incompatibilidade ou imiscibilidade de polímeros em água ou uma solução de polímero com uma solução salina (BANIK et al., 2003).

Nas últimas duas décadas, uma nova classe de materiais que surgiu com potencial uso em sistemas de fermentação extrativa são os líquidos iônicos. São definidos geralmente como sais líquidos a temperaturas menores que 100ºC, consistindo de um par de íons, com ampla possibilidade de combinações e propriedades. Esta capacidade de “construção” do par

cátion/ânion é a principal razão que vem atraindo pesquisadores pra investigar seu uso como solventes em extração (DAFOE; DAUGULIS, 2014).

Esses dois últimos sistemas (extração líquido-líquido com solventes e SAB) serão abordados com mais detalhe nas sessões a seguir, assim como exemplos de aplicações específicas para os metabólitos de interesse no presente trabalho, quando existentes.

3.1.2.1 – Extração Reativa

Como citado anteriormente, a extração efetiva de compostos hidrofílicos em sistemas bifásicos formados por solventes orgânicos apresenta coeficientes de distribuição modestos. Sendo assim, a inclusão de espécies reativas na fase orgânica, que interajam com o grupo reativo da molécula alvo, melhoram a sua extração (DAFOE; DAUGULIS, 2014).

Este método tem sido amplamente investigado na extração de ácido orgânicos e também na remoção simultânea em fermentações extrativas. Aminas secundárias e terciárias formam pares iônicos com ácidos carboxílicos não dissociados, resultando em maior eficiência de extração quando comparado à extração líquido-líquido convencional (KILIÇ et al., 2002). Uma vez que aminas secundárias podem formar amidas irreversíveis em reação com ácidos, as aminas terciárias são as mais utilizadas em estudos de fermentação (PAZOUKI; PANDA, 1998).

O uso de solventes orgânicos como diluentes nestes sistemas pode acarretar efeitos tóxicos para os micro-organismos. Uma estratégia para reduzir esse efeito pode ser o uso de um componente imiscível e biocompatível, tal como óleos vegetais, em substituição aos solventes tóxicos (KILIÇ et al., 2002; TIK; BAYRAKTAR; MEHMETOGLU, 2001).

Kiliç et al. (2002) investigaram a fermentação extrativa pelo fungo *Aspergillus niger* na presença de óleo de milho e Hostarex A327, uma amina terciária, em álcool oleílico. Parâmetros como, razão do volume da fase orgânica em relação a fase aquosa (V_{or}/V_{aq}), 0,5-1,5), concentração de óleo de milho (0-20%, v/v), e conteúdo de Hostarex A327 em álcool oleílico (10-50% v/v) foram avaliados. Na melhor condição de V_{or}/V_{aq} de 1,25 : 13,7% de óleo de milho e 33% de amina terciária em álcool oleílico, a concentração ótima de ácido cítrico (5,7 g/L) foi obtida, aumentando em 40 % a produção de ácido cítrico em relação ao controle.

Óleo de girassol e Alamine-336 (com álcool oleílico como diluente) foram aplicados na fermentação extrativa de ácido lático produzido por *Lactobacillus delbrueckii*, alcançando uma produção 2,5 vezes maior que o controle (TIK; BAYRAKTAR; MEHMETOGLU, 2001). Contudo a afinidade entre o reagente extrator e o produto torna a recuperação deste

igualmente difícil, este é um ponto que deve ser considerado quanto à viabilidade do processo (DAFOE; DAUGULIS, 2014).

3.1.2.2- Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB)

Sistemas aquosos bifásicos (SAB) resultam da incompatibilidade entre polímeros e água ou de uma solução de polímero com uma solução de sais. Os SAB contém considerável quantidade de água (80-90 %) e por isso são considerados um excelente ambiente para células, organelas celulares e substâncias biologicamente ativas (BANIK et al., 2003). Apresentam menor tensão interfacial entre as duas fases do que sistemas água/solventes orgânicos e orgânico/orgânico (WALTER; JOHANSSON; BROOKS, 1991). Reduzida tensão superficial entre as fases resulta em dispersão de uma das fase em pequenas partículas, o que aumenta a taxa de transferência de massa entre as duas fases, um fator importante em processos fermentativos (SINHA; DEY; PANDA, 2000a).

Diferentes tipos de composições de fase têm sido classificados em dois principais grupos, primeiro grupo contendo dois polímeros diferentes, enquanto o outro grupo contém um polímero e um sal em solução aquosa. Exemplos de polímeros utilizados são polietilenoglicol (PEG), dextrana, polipropilenoglicol, polivinilpirrolidona, e hidroxipropildextrana (RATANAPONGLEKA, 2010). Muitos sais, tais como fosfato de potássio monobásico, cloreto de potássio, fosfato de sódio monobásico, carbonato de sódio, citrato de sódio, sulfato de magnésio e sulfato de amônio, podem ser utilizados para formar SAB (BANIK et al., 2003). A seleção de polímeros para formação de SAB polímero-polímero é definida levando em consideração aspectos econômicos do processo, nestes casos polímeros de alto custo, tal como a dextrana, condicionam a aplicação destes sistemas a processos nos quais o custo do produto é considerável e compensa o do componente do SAB. Sistemas do tipo polímero-sal, apresentam custos mais baixos e são interessantes para o desenvolvimento de processos. Dentro desse grupo, os sistemas PEG-fosfatos são os mais utilizados e estudados (RITO-PALOMARES, 2004).

O primeiro sistema de duas fases aquosas foi descrito por Beijerink em 1896 onde gelatina, ágar e água foram misturados em determinadas proporções e, a uma dada faixa de temperatura, formaram duas fases imiscíveis. Porém, foi somente em meados da década de 50, que Albertsson e sua equipe desenvolveram várias aplicações no campo da separação/purificação de proteínas e materiais biológicos, contribuindo para o reconhecimento do potencial tecnológico desses sistemas (TISELIUS; PORATH;

ALBERTSSON, 1963). Os trabalhos iniciais focaram na aplicação de SAB como um método para isolamento de organelas de células intactas e partículas de plantas e células microbianas (BANIK et al., 2003). Mais recentemente tem crescido o interesse na aplicação destes sistemas em processos bioquímicos na recuperação de biofármacos, biorremediação, purificação de proteínas e fermentação extrativa (RATANAPONGLEKA, 2010).

A) Curva Binodal

O SAB é representado por uma curva binodal a qual separa a área bifásica da área monofásica homogênea (Figura 3.4). O diagrama de fase determina a exata composição das duas fases. As composições representadas pelos pontos abaixo da curva são homogêneas, duas fases se formam apenas por composições acima da curva. A linha ligando os pontos que representam as composições da fase do topo e fase de fundo é chamada de linha de amarração (*tie-line*) e qualquer ponto na mesma linha de amarração terá a mesma composição de fase, porém razões volumétricas entre as fases diferentes. O ponto M representa a composição do

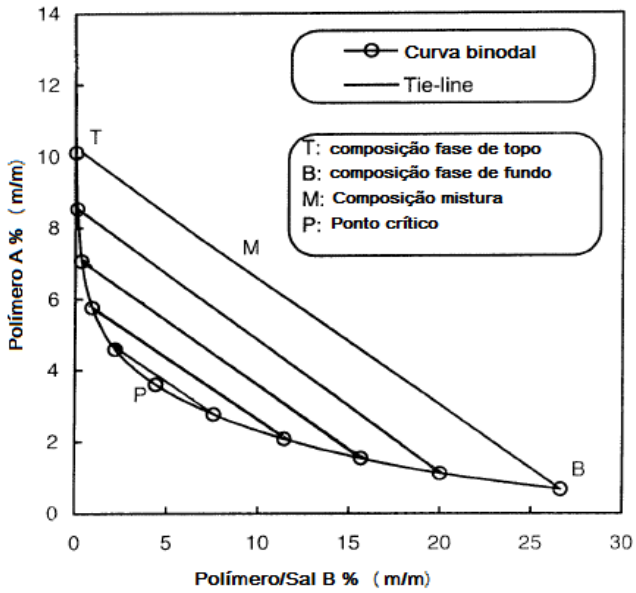


Figura 3.4. Ilustração do diagrama de fase (SINHA; DEY; PANDA, 2000a).

sistema de fase, pontos T e B são as composições da fase de topo e da fase de fundo no sistema SAB, respectivamente. O ponto P representa o ponto crítico, no qual a composição e volume das duas fases tornam-se virtualmente iguais (SINHA; DEY; PANDA, 2000a).

A curva binodal é influenciada pela temperatura e no caso de sistemas polímero-polímero, quanto maior a temperatura, menor a viscosidade, deslocando a curva binodal para

cima, ou seja, uma maior concentração dos polímeros é necessária para formar o sistema bifásico. Contudo, sistemas de PEG/sal comportam-se de maneira oposta: uma menor concentração é requerida para a formação de fases com o aumento da temperatura e vice-versa (BANIK et al., 2003).

A massa molar do PEG também tem um efeito sobre a curva binodal, a qual se desloca para baixo. Quanto maior for a massa molar do PEG, ou seja, menores concentrações dos componentes são necessárias para separação de fases (Figura 3.5). Isso acontece devido a redução da solubilidade do PEG com o aumento da sua massa molar e, de fato, a fase rica em PEG satura com concentrações mais baixas do polímero (ZAFARANI-MOATTAR; GASEMI, 2002).

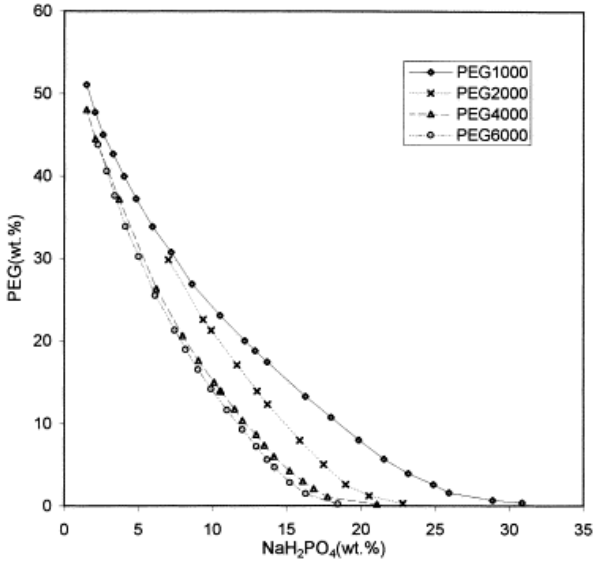


Figura 3.5. Efeito da massa molar do PEG na curva binodal para PEG-NaH_2PO_4-H_2O a 25 ºC (ZAFARANI-MOATTAR; GASEMI, 2002).

A eficiência de vários sais na promoção da separação de fases parece seguir a série Hofmeister, que classifica os íons baseada em sua habilidade "*salting-out*". A contribuição do ânion é mais importante do que a do cátion em determinar a eficiência de um sal em particular (YANG, 2009).

Os ânions multivalentes HPO_4^{-2} e SO_4^{-2} são mais eficientes na indução da separação de fases com polietilenoglicol (PEG) (HATTI-KUAL, 2000). Como pode ser observado na Figura 3.6, o aumento da carga de valência do ânion reduz a concentração de sal necessária para separação de fases, uma vez que ânions com maior valência hidratam mais, reduzindo a quantidade de água disponível para o PEG (Figura 3.6) (ZAFARANI-MOATTAR; GASEMI, 2002).

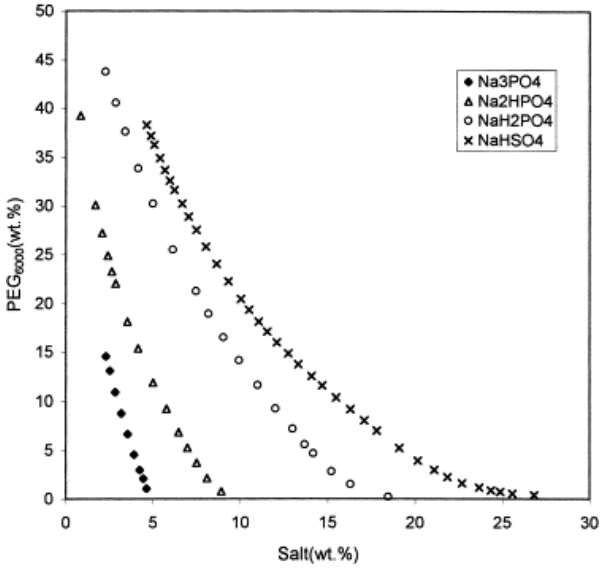


Figura 3.6. Efeito do tipo de sal na curva binodal para sistema PEG_{6000}-sal-H_2O a 25 ºC (ZAFARANI-MOATTAR; GASEMI, 2002).

O pH também desempenha papel importante na localização da curva binodal. O aumento do pH resulta no deslocamento da curva em direção a origem, expandindo a região de duas fases, sendo necessárias menores concentrações de PEG e sal para a separação de fases em pH básico (GLYK; SCHEPER; BEUTEL, 2015). Isso pode acontecer devido a menor protonação dos ânions e, portanto, maior valência quando o pH do meio está alto (GLYK; SCHEPER; BEUTEL, 2015).

B) Coeficiente de Partição

Em um sistema de fermentação extrativa ideal, as células e o substrato devem particionar em favor de uma fase, enquanto a molécula do produto deve particionar em favor da outra fase (SINHA; DEY; PANDA, 2000a). As duas fases estão em equilíbrio, sendo que na fase de topo predomina o polímero, enquanto o segundo polímero ou sal predomina da fase de fundo. As biomoléculas encontram-se distribuídas entre as fases, sendo a distribuição resultado de vários parâmetros relacionados ao sistema de fases, propriedades físico-químicas da biomolécula (hidrofobicidade, carga superficial e massa molar) e suas interações, além de características da solução (pH e força iônica) (PESSOA JUNIOR; KILIKIAN, 2005; RATANAPONGLEKA, 2010). A partição de proteínas ou de outras biomoléculas entre as duas fases é regida pela condição de menor potencial químico ou maior solubilidade, isto é, a

biomolécula apresentará maior concentração na fase em que seu potencial químico for menor ou sua solubilidade for maior (PESSOA JUNIOR; KILIKIAN, 2005).

O coeficiente de partição, K é definido como a razão da concentração da biomolécula na fase de topo (C_T) e na fase de fundo (C_B) (como demonstrado na eq. (1)) (RATANAPONGLEKA, 2010).

$$K = \frac{C_T}{C_B} \tag{1}$$

Outros parâmetros também podem ser avaliados afim de entender o comportamento de distribuição da molécula alvo entre as duas fases. A razão do volume das fases (R_V) é definida como a razão do volume da fase de topo (V_T) e do volume da fase de fundo (V_B) (RATANAPONGLEKA, 2010).

$$R_V = \frac{V_T}{V_B} \tag{2}$$

A partição de moléculas entre as duas fases é um fenômeno complexo por causa do envolvimento de muitos fatores de interação entre o soluto e os componentes que formam o SAB, tais como ligações de hidrogênio, interações de carga, forças de van der Waals, interações hidrofóbicas e efeitos estéricos (HACHEM; ANDREWS; ASENJO, 1996).

O coeficiente de partição pode ser influenciado pela massa molar do polímero. O aumento da massa molar do polímero causará partição de uma proteína para a fase oposta (BANIK et al., 2003). A razão para este fenômeno é que o aumento na massa molar do polímero resulta em aumento no tamanho da cadeia e no efeito da exclusão molecular, reduzindo volume de espaço livre (RATANAPONGLEKA, 2010). Fato este que pode ser ajustado com a mudança da concentração do polímero, uma vez que o aumento da concentração deste aumenta a diferença entre as fases, aumentando o tamanho da linha de amarração (*tie-line length*), o que favorece a polarização da proteína a ser particionada (BANIK et al., 2003).

Uma vez que a superfície de uma proteína é formada por diferentes tipos de aminoácidos, duas propriedades da sua superfície, que são carga e hidrofobicidade, desempenham um papel importante na partição de proteínas em SAB (HACHEM; ANDREWS; ASENJO, 1996). Sendo a interação das cargas superficiais de uma proteína com os íons em solução um fator importante na extração em SAB, o valor do pH é portanto uma variável importante nessa dinâmica (PESSOA JUNIOR; KILIKIAN, 2005). Em pH básico, a

proteína é mais carregada negativamente (SCHMIDT; VENTOM; ASENJO, 1994). Em geral, para sistemas PEG-sal, proteínas carregadas negativamente tendem a preferir a fase rica em PEG, enquanto que as positivamente carregadas preferem a fase rica em sais (SCHMIDT; VENTOM; ASENJO, 1994). Contudo, uma fermentação extrativa em um SAB tem sua composição de meio fixa, além do pH e temperatura (SINHA; DEY; PANDA, 2000a), o que reduz a possibilidade de alterar esses parâmetros a fim de aperfeiçoar a extração.

Como abordado anteriormente, o efeito da temperatura pode variar de acordo com os componentes do SAB. Em sistema PEG e sal um aumento da temperatura resulta em maior diferença na composição das fases, o que aumenta a concentração de PEG e sal na fase de topo e na fase de fundo, respectivamente (RATANAPONGLEKA, 2010). Isso é devido à interação preferencial das moléculas de água à superfície polar do sal, ao invés do PEG (GAUTAM; SIMON, 2006). Consequentemente, o número de moléculas de água disponíveis para solvatação do soluto na fase de fundo reduz devido ao aumento da concentração de sal, por fim reduz a solubilidade da biomolécula na fase, conhecido como efeito "*salting-out*" (GAUTAM; SIMON, 2006; RATANAPONGLEKA, 2010). O coeficiente de partição da biomolécula é então, influenciado pela variação nas composições das fases.

C) Aplicações

Diversos produtos vêm sendo produzidos e extraídos *in situ* utilizando sistemas de duas fases aquosas, tais como antibióticos, solventes, surfactantes, ácidos orgânicos e enzimas (SINHA; DEY; PANDA, 2000a).

Utilizando PEG e fosfato de potássio (uma mistura de KH_2PO_4 e K_2HPO_4) para formar SAB, Kuboi et al. (1994) produziram e separaram subtilina, um antibiótico hidrofóbico, a partir de *Bacillus subtilis* ATCC 6633. A subtilina recuperada da fase de topo em sistema composto por PEG 6000 (20%) e fosfato de potássio (5,5 %) foi 1,6 vezes maior que a recuperada do meio homogêneo.

Sistemas formados por PEG e dextrana, este último um polissacarídeo formado por subunidades de glicose e considerado não tóxico para células microbianas (OOI et al., 2011), são bastante utilizados na produção de enzimas por fermentação extrativa. Por exemplo, a endoglucanase, enzima chave para conversão de substâncias celulósicas em açúcares fermentescíveis, foi produzida a partir de um híbrido intergenérico de *Trichoderma reesei/Saccharomyces cerevisiae* em SAB. O sistema composto por 6,5 % (m/m) de dextrana

e 7,5 % (m/m) de PEG 6000 teve um coeficiente de partição de 2,89 e 1,31 para endoglucanase a partir do híbrido e de *T. reesei* (utilizada como controle), respectivamente (SINHA; DEY; PANDA, 2000b). Em outro estudo, *Burkholderia pseudomallei* foi cultivada e produziu lipase em diferentes sistemas SAB formados por PEG de diferentes massas molares e dextrana T500 (OOI et al., 2011). A melhor composição de meio foi composta por 9,6 % (m/m) de PEG 8000 e 1,0 % (m/m) de Dextrana T500, onde a biomassa foi acumulada na fase de fundo enquanto a lipase foi extraída para a fase de topo. Um rendimento de 92,1 % foi atingido em batelada simples. Já em bateladas sucessivas, com a reposição contínua da fase de topo a cada 24 h, uma média de concentração de lipase de 16,5 U/mL para sete bateladas foi atingida durante 168 h (OOI et al., 2011).

Dentre os ácidos orgânicos, o ácido lático se destaca no número de trabalhos que utilizam SAB em sua produção (SINHA; DEY; PANDA, 2000a). A alta concentração de ácido lático excretada no meio de cultivo pode inibir o crescimento do micro-organismo produtor, e com a extração *in situ* deste produto seu efeito inibitório pode ser reduzido (DISSING; MATTIASSON, 1994). Sistema de bateladas sucessivas foi aplicado por Planas et al. (1997) na produção de ácido lático por *Lactobacillus lactis*. Utilizando PEG 8000 e dextrana T40 foram realizadas 5 bateladas sucessivas com reposição da fase do topo, atingindo um rendimento de 1,1 mol/mol e produtividade de 4,7 $mM.h^{-1}$ na produção de ácido lático. Neste estudo foi observada redução da razão do volume das fases ao longo das bateladas, o que pode afetar a estabilidade do sistema de extração a longo prazo (PLANAS; LEFEBVRE; TJERNELD, 1997).

Pandey et al. (2011) avaliaram a produção de fosfatase alcalina utilizando *Bacillus licheniformis* em SAB composto por PEG de diferentes massas molares (2000, 4000, 6000) com sais (sulfato de magnésio, sulfato de sódio, citrato de sódio) e polímeros (dextrana 40, dextrana T500). O sistema composto por PEG 4000 [9,0 % (m/v)] e dextrana T500 [9,6 % (m/v)] foi selecionado como o sistema mais adequado para a produção de fosfatase alcalina apresentando um coeficiente de partição de 5,23. A produção de enzima se mostrou menor do que em sistema homogêneo nos estágios iniciais da fermentação, mas ao final da fermentação atingiu valores maiores no sistema bifásico (PANDEY; BANIK, 2011).

Outros polímeros, além do PEG, também podem ser aplicados em fermentação extrativa. Sistemas de fases compostas por um polietetrólito, polietilenoimina (PEI), e um polímero neutro, hidroxietilcelulose (HEC), têm sido aplicados na fermentação extrativa de ácido lático (DISSING; MATTIASSON, 1994; KWON; KAUL; MATTIASSON, 1996). O

PEI é carregado positivamente com uma densidade de carga dependente do pH, e o lactato pode formar par iônico com o PEI durante a fermentação extrativa (DISSING; MATTIASSON, 1994). Além desses, sistemas compostos por PEG/hidroxipropilamido (HPA) e um copolímero randômico de óxido de etileno e óxido de propileno (EOPO)/HPA também foram aplicados no sistema de produção de ácido lático por fermentação extrativa (PLANAS et al., 1996).

EOPO é um copolímero solúvel em água, capaz de separar em duas fases, a uma temperatura maior que a temperatura de solução crítica inferior (do inglês *lower critical solution temperature*, LCST). Este sistema foi utilizado como uma técnica de fermentação extrativa para produção de lipase por *Burkholderia cepacia* (SHOW et al., 2012). Com adição de EOPO ao processo fermentativo e manipulação da temperatura acima da LCST após a fermentação, duas fases são formadas, onde a fase superior contendo o produto é pobre em EOPO e a fase inferior concentrada em EOPO e as células podem ser recicladas e reutilizadas no processo fermentativo (SHOW et al., 2012). Uma solução de 10% (m/m) de EOPO 3900, pH 8,5, 200 rpm e 30ºC foram as condições ótimas para produção de 55 U/mL de lipase. Bateladas sucessivas foram realizadas com reciclo da fase de fundo contendo EOPO e células com reposição de meio a cada 24 h. Ao longo de 10 bateladas consecutivas houve somente uma pequena variação nos parâmetros de partição e no fator de purificação, demonstrando estabilidade a longo prazo do sistema (SHOW et al., 2012). Apesar dos autores considerarem como um processo de fermentação extrativa, neste estudo a extração não foi de fato simultânea à produção uma vez que a formação das duas fases com aquecimento do sistema se dava ao final da fermentação.

3.1.2.3– Líquidos Iônicos

Líquidos iônicos podem ser definidos como uma nova classe de sais com baixo ponto de fusão (< 100ºC) (EARLE; SEDDON, 2000; RANKE et al., 2007; SEDDON, 1997). Muitos deles apresentam-se em estado líquido à temperatura ambiente. Esta classe de solventes neotéricos é constituída inteiramente de íons, onde um ou ambos os íons são assimétricos, resultando em baixa interação intermolecular, razão pela qual seu ponto de fusão é baixo quando comparado ao cloreto de sódio, por exemplo, cujo ponto de fusão é de 800ºC (SEDDON, 1997; EARLE; SEDDON, 2000; RANKE *et al.*, 2004). Os centros catiônicos são geralmente grandes, orgânicos e com baixa simetria, em sua maioria envolvem um nitrogênio

ou fósforo carregado positivamente, e os ânions podem ser compostos orgânicos ou inorgânicos (CLARE *et al.*, 2010) (Figura 3.7).

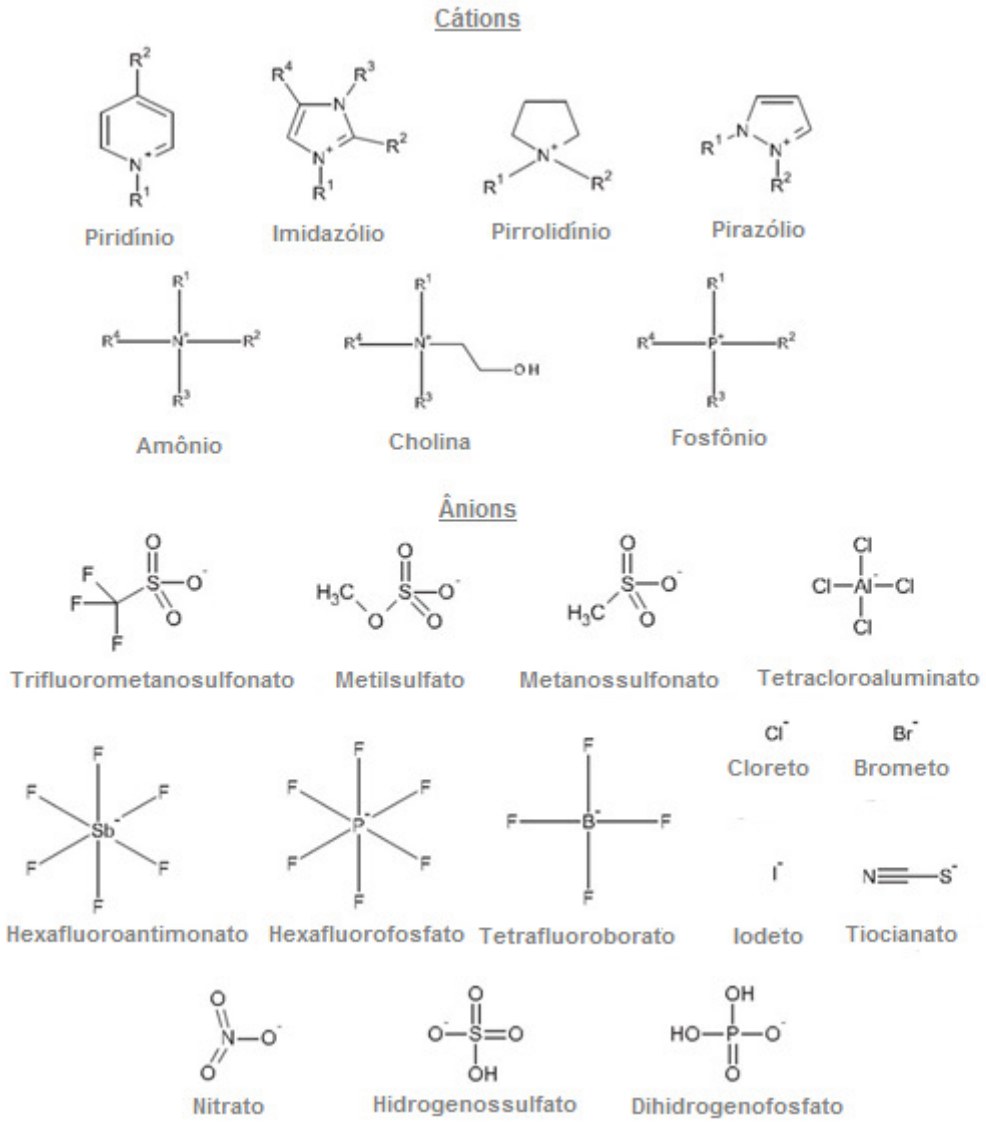


Figura 3.7 Estrutura dos principais cátions e ânions utilizados em líquidos iônicos (FAUZI; AMIN, 2012).

O primeiro líquido iônico, nitrato de etilamônio $[EtNH_3][NO_3]$ (ponto de fusão 12ºC), foi descoberto em 1914 por Paul Walden (WALDEN, 1914 apud EARLE; SEDDON, 2000), e o interesse por esses compostos só se desenvolveu anos mais tarde a partir da descoberta do líquido iônico binário produzido a partir da mistura de tricloreto de alumínio e cloreto de N-alquilpiridínio (HURLEY; WIER, 1951) e cloreto de 1,3-dialquilimidazólio (WILKES, JOHN et al., 1982). Mas somente nos anos 90, com o surgimento de líquidos iônicos estáveis em contato com o ar e água, baseados em alquilimidazólio com ânions fracamente complexados, tais como $[PF_6]^-$ e $[BF_4]^-$ (WILKES; ZAWOROTKO, 1992), houve uma

expansão do seu uso em outros campos de estudo, mas particularmente como solventes para síntese e catálise (BAKER et al., 2005).

A inerente flexibilidade sintética através do pareamento de diferentes cátions e ânions, concede a possibilidade para certo ajuste fino de suas propriedades físico-químicas de forma a atender os requerimentos de um processo em particular (BAKER et al., 2005; EARLE; SEDDON, 2000). Propriedades como ponto de fusão, viscosidade, densidade, e hidrofobicidade podem variar através de mudanças na estrutura dos íons (EARLE; SEDDON, 2000) e por isso são conhecidos como "solventes versáteis", sendo capazes de oferecer uma gama de novos meios reacionais com características e aplicações diversas em comparação aos tradicionais solventes.

Inicialmente os líquidos iônicos eram assumidos como "solventes verdes", principalmente devido a sua pressão de vapor desprezível e não inflamabilidade (SEDDON, 1997). Este conceito generalizado vem sendo discutido com mais cautela em vista da enorme variedade de estruturas químicas dos líquidos iônicos, além da necessidade da avaliação de outros parâmetros, tais como, ecotoxicidade e biodegradabilidade (DOCHERTY; DIXON; KULPA, 2007; DOCHERTY; KULPA, 2005; PHAM; CHO; YUN, 2010) para ser considerado como tal.

E mais uma vez, a sua grande versatilidade, que pode ser considerada como a sua propriedade mais atrativa, possibilita a combinação de cátions e ânions que atendam aos princípios da química verde. Devido a isso, uma nova abordagem vem sendo representada pela síntese de líquidos iônicos constituídos inteiramente de biomateriais, tais como os baseados em colina, cuja produção pode ser conduzida de forma bastante simples apenas substituindo hidróxido de colina com um ácido carboxílico (encontrado na natureza) correspondente, a temperatura ambiente, produzindo água como único subproduto (FUKAYA et al., 2007; YU et al., 2008). Além do cátion colina, há ainda a possibilidade de incorporação de ânions biocompatíveis, tais como sacarinato, acesulfamato (HOUGH-TROUTMAN et al., 2009; NOCKEMANN et al., 2007), alcanoatos (PETKOVIC et al., 2010), aminoácidos (FUKUMOTO; YOSHIZAWA; OHNO, 2005) e ácidos orgânicos (FUKAYA et al., 2007).

A) Aplicações

A primeira aplicação de líquidos iônicos em biotecnologia teve como foco principal a biocatálise enzimática, em que se tem o registro de aumento da atividade, estabilidade e

seletividade de várias enzimas na presença dos LI's (QUIJANO; COUVERT; AMRANE, 2010).

O primeiro processo com células íntegras envolvendo líquidos iônicos foi desenvolvido por Cull et al. (2000), no qual [C_4mim][PF_6] foi utilizado como segunda fase substituindo os tradicionais solventes orgânicos, neste caso o tolueno, na biotransformação de 1,3-dicianobenzeno em 3-cianobenzamida depois em ácido 3-cianobenzóico por *Rhodococcus* R312, atuando como um reservatório para o substrato hidrofóbico e reduzindo o efeito tóxico deste para o micro-organismo. O sistema água-[C_4mim][PF_6] demonstrou uma menor taxa inicial da produção da amida quando comparado ao sistema água-tolueno. Contudo, *Rhodococcus* R312 apresentou tolerância ao líquido iônico. Assim, os autores atribuíram a reduzida taxa inicial na presença de [C_4mim][PF_6] a sua alta viscosidade, o que limita a transferência de massa do substrato.

Seguindo a mesma abordagem, uma série de outros trabalhos tem sido realizados desde então. A maioria deles aplicando os líquidos iônicos em reações de redução assimétrica em sistemas bifásicos, mais especificamente na redução de cetona a álcool quiral, como mostrado na Tabela 3.1. As enzimas que catalisam este tipo de biotransformação são as oxirredutases, álcool desidrogenase (ADH), as quais necessitam de regeneração de cofactor (NAD^+/$NADP^+$). Assim, o uso de enzimas isoladas requer a adição de cofatores exógenos, representando um aumento no custo do processo. Já os processos envolvendo células íntegras (*wholle-cell process)* permitem a regeneração *in situ* dos cofatores. No entanto, alguns fatores podem interferir na eficiência do processo, tais como a solubilidade limitada dos substratos, e os efeitos tóxicos dos substratos e produtos para os micro-organismos. Visando solucionar estes problemas, os líquidos iônicos vêm sendo aplicados de duas formas: (i) como co-solventes em sistemas monofásicos; neste caso, líquidos iônicos miscíveis em água são utilizados para melhorar a solubilidade dos substratos; e (ii) como segunda fase, onde líquidos iônicos imiscíveis em água atuam como reservatório tanto para os substratos quanto para os produtos, reduzindo seus efeitos prejudiciais. Além disso, o uso de líquidos iônicos pode melhorar o rendimento e enantiosseletividade do processo (DENNEWALD; PITNER; WEUSTER-BOTZ, 2011; HE et al., 2009; PFRUENDER et al., 2004).

Até o momento, poucos líquidos iônicos têm sido testados para o uso em processos de biotransformação microbiana, sendo os baseados em cátion imidazólio os mais investigados, e os ânions [PF_6] e [NTf_2] mais recorrentes (QUIJANO; COUVERT; AMRANE, 2010), por serem líquidos iônicos de primeira geração imiscíveis em água. Além disso, ainda são

escassos os estudos que investigam sua utilização em sistemas de reação mais complexos, como a produção de enzimas e ácidos orgânicos. Um exemplo são as pesquisas preliminares que avaliaram o crescimento de bactérias lácticas na presença dos líquidos iônicos [C_4mim][PF_6], [C_6mim][PF_6], [C_8mim][PF_6], assim como sua capacidade de extração do ácido lático buscando LI's biocompatíveis que possam ser empregados em fermentação extrativa (MATSUMOTO et al., 2004; MATSUMOTO; MOCHIDUKI; KONDO, 2004).

Tabela 3.1. Exemplos de aplicação de líquidos iônicos em sistemas de biotransformação.

Micro-organismos	**Líquidos iônicos[a]**	**Reação**	**Referência**
Leveduras de panificação imobilizadas	[C_4mim][PF_6]	Redução de cetonas	Howarth et al. (2001)
Lactobacillus kefir	[C_4mim][PF_6] [C_4mim][NTf_2] [N_{1888}][NTf_2]	Redução assimétrica de 4-cloroacetofenona	Pfruender et al. (2004)
Saccharomyces cerevisiae *Lactobacillus kefir*	[C_4mim][PF_6] [C_4mim][NTf_2]	Síntese de álcoois quirais	Pfruender et al. (2006)
Células imobilizadas de *Saccharomyces cerevisiae*	[C_4mim][PF_6] [C_4mim][BF_4]	Redução assimétrica de acetiltrimetilsilano	Lou et al. (2006)
Escherichia coli	[C_4mim][PF_6] [C_6mim][PF_6] [C_4mim][NTf_2] [C_6mim][NTf_2] [C_4mpyr] [NTf_2] [C_4mpyr][NTf_2]	Redução assimétrica de 4-cloro acetoacetato de etila Síntese de (*S*)-α-cloro-1-feniletanol	Bräutigam et al. (2007)
Aureobasidium pullulans	[C_4mim][PF_6]	Redução assimétrica de 4-cloro-3-oxobutanoato de etila	Fan et al. (2008)
Escherichia coli	[C_4mim][PF_6]	Síntese de álcool quiral	Kratzer et al. (2008)
Células imobilizadas de *Candida parapsilosis*	[C_4mim][PF_6]	Síntese de álcool quiral	Lou et al. (2009a)
Células imobilizadas de *Trigonopsis variabilis*	[C_2OHmim][NO_3]	Redução assimétrica de 4'-metoxiacetofenona	Lou et al. (2009)
Pichia membranaefaciens	[C_4mim][BF_4]	Redução assimétrica de etil acetoacetato	He et al.(2009)
Rhodotorula sp.	[C_4mim][PF_6]	Redução assimétrica de 4'-	Wang et al.

imobilizada	$[C_5mim][PF_6]$ $[C_6mim][PF_6]$ $[C_7mim][PF_6]$ $[C_2mim][NTf_2]$ $[C_4mim][NTf_2]$	metoxiacetofenona	(2009)
Escherichia coli recombinante	$[C_6mpyr][NTf_2]$	Redução assimétrica de 2-octanona	Bräutigam et al. (2009)
	$[C_6mpyr][NTf_2]$ $[C_4mim][NTf_2]$	Redução assimétrica de4-cloroacetofenona	Bräutigam et al. (2009)
	$[C_6mpyr][NTf_2]$	Redução assimétrica de 2-octanona	Dennewald et al. (2011)
	$[C_6py][NTf_2]$	Glicosilação de geraniol	Schmideder et al. (2016)
	$[C_6mpyr][NTf_2]$ $[C_6mim][PF_6]$ $[C_6py][NTf_2]$	Redução assimétrica de (R)-carvona	Castiglione et al. (2017)

Abreviação para alguns líquidos iônicos: $[C_4mmim]$ = 1-butil-2,3-dimetilimidazólio; $[C_6mpyr]$ = 1-hexil-1-metilpirrolidínio; $[C_4mpyr]$ = 1-butil-1-metilpirrolidínio; $[C_6py]$ = *N*-hexylpiridínio.

3.2 *Yarrowia lipolytica*

A levedura *Yarrowia lipolytica* pertencente à classe dos Ascomicetos, subclasse Hemiascomiceto, foi inicialmente classificada como *Candida lipolytica*, reclassificada como *Endomycopsis lipolytica, Saccharomyces lipolytica* e finalmente como *Yarrowia lipolytica,* a partir da observação dos seus ascósporos (BARTH; GAILLARDIN, 1997).

Y. lipolytica é estritamente aeróbia e na natureza, pode ser isolada a partir de laticínios, tais como queijos, sendo uma das espécies predominantes nos queijos *Camembert* e *Blue-veined,* (FICKERS et al., 2005). Pode ser também encontrada em vários alimentos refrigerados (queijos, iogurte e salsicha). Linhagens também foram isoladas a partir do solo, águas residuárias, e ambientes poluídos por óleo (THEVENIEAU; NICAUD; GAILLARDIN, 2009), além de ambientes marinhos e hipersalinos, indicativo do seu metabolismo versátil e habilidade de sobreviver sob condições extremas (BEOPOULOS et al., 2010).

Pertence ao grupo das espécies de leveduras “não-convencionais”, termo utilizado para diferenciar certas espécies de leveduras das mais comumente e intensivamente estudadas, *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*, e classificadas, portanto, como “convencionais”. Sendo a mais estudada deste grupo, o interesse por esta levedura cresceu

devido a capacidade de algumas linhagens utilizarem *n*-parafinas como fonte de carbono para produção de proteína microbiana unicelular (SCP - *single cell protein*) e ácidos orgânicos (ácido α-cetoglutárico e ácido cítrico) (BARTH; GAILLARDIN, 1997) e vem sendo usada como modelo para o estudo de secreção de proteínas, biogênese dos peroxissomos, dimorfismo, degradação de substratos hidrofóbicos e outros campos de estudo (FICKERS et al., 2005). É considerada não-patogênica, o que permite que vários processos que empregam essa levedura, principalmente na agroindústria e na indústria de alimentos, sejam classificados como GRAS (*Generally Regarded as Safe*) pela FDA (*Food and Drug Administration*) (BEOPOULOS et al., 2010).

O catabolismo de substratos hidrofóbicos, tais como alcanos, ácidos graxos e triglicerídeos, é um metabolismo bastante complexo, ocorrendo em diferentes compartimentos celulares, e devido a sua eficiente capacidade de utilizar esse tipo de substrato, tem sido muito importante na construção de um acervo de informações referentes aos genes envolvidos na β-oxidação, utilização de substratos hidrofóbicos e proliferação dos peroxissomos (FICKERS et al., 2005; NICAUD, 2012). Além disso, a assimilação de compostos pouco miscíveis ou imiscíveis em água tem como primeiro obstáculo o acesso das células às partículas dispersas no meio. Mecanismos sofisticados que permitem o acesso a esse tipo de substrato são observados em *Y. lipolytica,* tais como o aumento da solubilidade através da produção de biossurfactantes, e remodelamento da própria superfície celular (THEVENIEAU; NICAUD; GAILLARDIN, 2009).

O biossurfactante denominado Yansan foi produzido a partir da cepa selvagem *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 isolada da Baía de Guanabara no Rio de Janeiro, cuja composição química consiste de um complexo polissacarídeo-proteína com baixo teor lipídico. Secretado durante crescimento da levedura em glicose, apresentou alta atividade emulsificante e estabilidade na faixa de pH de 3,0 a 9,0 (AMARAL et al., 2006). Posteriormente teve suas condições de produção otimizadas em meio contendo sulfato de amônio (10 $g.L^{-1}$), extrato de levedura (0,5 $g.L^{-1}$), glicose (40 $g.L^{-1}$) e glicerol (20 $g.L^{-1}$), fornecendo um índice de emulsificação de 81,3 % e uma variação de tensão superficial de 19,5 $mN.m^{-1}$ (FONTES et al., 2010). A superfície celular de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 foi investigada quanto a sua capacidade de interação com compostos e superfícies hidrofóbicas, e foi demonstrada particular e intensa hidrofobicidade desta linhagem (AMARAL et al., 2006) quando comparada com outra estirpe, *Y. lipolytica* W29, já estudada anteriormente (AGUEDO et al., 2005).

Y. lipolytica é um fungo dimórfico, ou seja, pode apresentar-se de forma reversível como células isoladas de levedura, pseudo-hifas e hifas septadas, constituindo um micélio verdadeiro (BARTH; GAILLARDIN, 1997). Capaz de sofrer uma verdadeira transição levedura-hifa, esses fenótipos podem ser observados até no formato macroscópico das colônias em placa (Figura 3.8) (NICAUD, 2012). Esta diferenciação é determinada por condições de crescimento (aeração, fonte de nitrogênio e carbono, pH, etc.), e por fatores genéticos (BARTH; GAILLARDIN, 1997). Através do estudo de *S. cerevisiae* foram possíveis avanços significativos no entendimento da transição dimórfica, porém esta não forma hifas septadas, somente pseudo-hifas e, tratando-se de mecanismos diferentes, seria ideal o uso de um modelo que apresentasse as duas formas. Em vista disso, *Y. lipolytica,* por não ser patogênica, vem sendo bastante estudada como modelo dos mecanismos de transição dimórfica (MORÍN et al., 2007). Eletroforese bidimensional foi utilizada para estudar, pela primeira vez, o proteoma do citosol de *Y. lipolytica* na forma de levedura e de hifa, onde foram detectadas 45 proteínas diferencialmente expressas, entre as duas formas (MORÍN et al., 2007). Em um trabalho mais recente foram identificados genes envolvidos nos primeiros estágios de transição levedura-micélio de *Y. lipolytica* através de alteração de pH (MORALES-VARGAS; DOMÍNGUEZ; RUIZ-HERRERA, 2012).

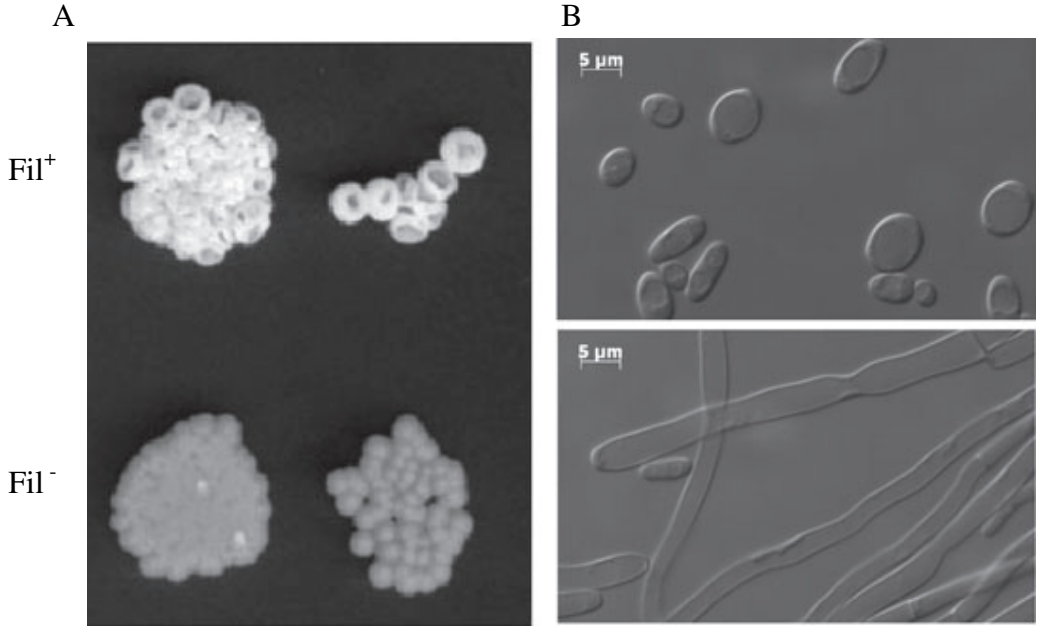


Figura 3.8. Morfologia das colônias e células de linhagens de *Yarrrowia lipolytica*. (A) Morfologia da colônia da linhagem selvagem H222 (Fil+) e mutante filamentosa (Fil-) em meio rico YPD. (B) morfologia celular, leveduras em YNB (imagem superior) e forma filamentosa na presença de soro (imagem inferior) (NICAUD, 2012).

Paralelamente aos estudos genéticos, diferentes condições de cultivo, como fonte de nitrogênio e pH, demonstram influenciar fortemente a morfologia celular de *Y. lipolytica* e atuar de forma interdependente. Szabo (1999) observou que as fontes de carbono estudadas (glicose, glicerol, frutose, acetato de sódio) não influenciaram a morfologia de *Y. lipolytica* cultivada em meio líquido. Já a fonte de nitrogênio teve um efeito positivo no crescimento de filamentos, diferente do que acontece com outras leveduras como *S. cerevisiae* e *C. albicans*, as quais tendem a formar filamentos na presença de quantidades limitantes de nitrogênio (BROWN; GOW, 1999; GIMENO et al., 1992). Em relação ao pH, foi relatado que este afetou a formação de hifas, mas somente na presença de uma fonte de nitrogênio complexa, não apresentando efeitos significativos em meio mínimo (SZABO, 1999). Posteriormente o mesmo grupo avaliou mais detalhadamente a regulação da transição dimórfica por influência do pH e fonte de nitrogênio orgânica (SZABO; ŠTOFANÍKOVÁ, 2002). Recentemente, estudos demonstraram também que a concentração de oxigênio dissolvido é crucial para a transição morfológica de *Y. lipolytica*, independente da fonte de carbono e/ou nitrogênio utilizada (BELLOU et al., 2014). Quando cultivadas em baixa concentração de oxigênio dissolvido, pseudo-hifas e hifas foram as formas predominantes. Tal comportamento pode ser observado em diferentes condições de cultivo (meio sólido, culturas submersas e cultivo contínuo) (BELLOU et al., 2014).

Conforme o interesse por essa levedura foi avançando, informações genéticas foram sendo acumuladas ao longo do tempo, e permitindo que sua relevância em campos antes dominados por leveduras convencionais crescesse. É o que vem acontecendo no campo da produção de proteínas heterólogas. *Y. lipolytica* apresenta uma capacidade particular de secretar naturalmente diversas proteínas no meio de cultura, tais como proteases (alcalinas e ácidas), lipases e fosfatases, RNase e esterase (MADZAK; GAILLARDIN; BECKERICH, 2004). Além disso, características peculiares no seu mecanismo de secreção, que se destacam em relação às outras leveduras e, em alguns aspectos, se assemelham ao das células de mamíferos, ratificam o seu interesse como hospedeira, especialmente para produção de proteínas complexas (MADZAK; GAILLARDIN; BECKERICH, 2004).

Yarrowia lipolytica apresenta a capacidade de gerar diversos produtos, sendo a lipase um dos seus metabólitos mais importantes, que possui potencial de aplicação em diversos setores industriais (detergentes, fármacos, alimentos). Também vem sendo amplamente estudada por produzir ácido cítrico a partir de diferentes fontes de carbono, incluindo glicose,

alcanos, óleos vegetais, amido hidrolisado, etanol e glicerol bruto (COELHO; AMARAL; BELO, 2010; GONÇALVES; COLEN; TAKAHASHI, 2014).

3.3 LIPASE

Lipases são serina hidrolases definidas como triacilglicerol acilhidrolases (E.C. 3.1.1.3) que catalisam a hidrólise das ligações éster de tri-, di-, e monoacilgliceróis em ácidos graxos e glicerol na interface água-lipídio e podem realizar a reação reversa em meio não aquoso (CASAS-GODOY et al., 2012; SAXENA et al., 2003) (Figura 3.9). Podem ser diferenciadas das esterases (E.C. 3.1.1.1) pela natureza do substrato, lipases são definidas como enzimas capazes de hidrolisar triacilgliceróis de cadeia acil longas (≥ 10 átomos de carbono), enquanto as esterases hidrolisam triacilgliceróis de cadeia acil curtas (≤ 10 átomos de carbono) (CASAS-GODOY et al., 2012).

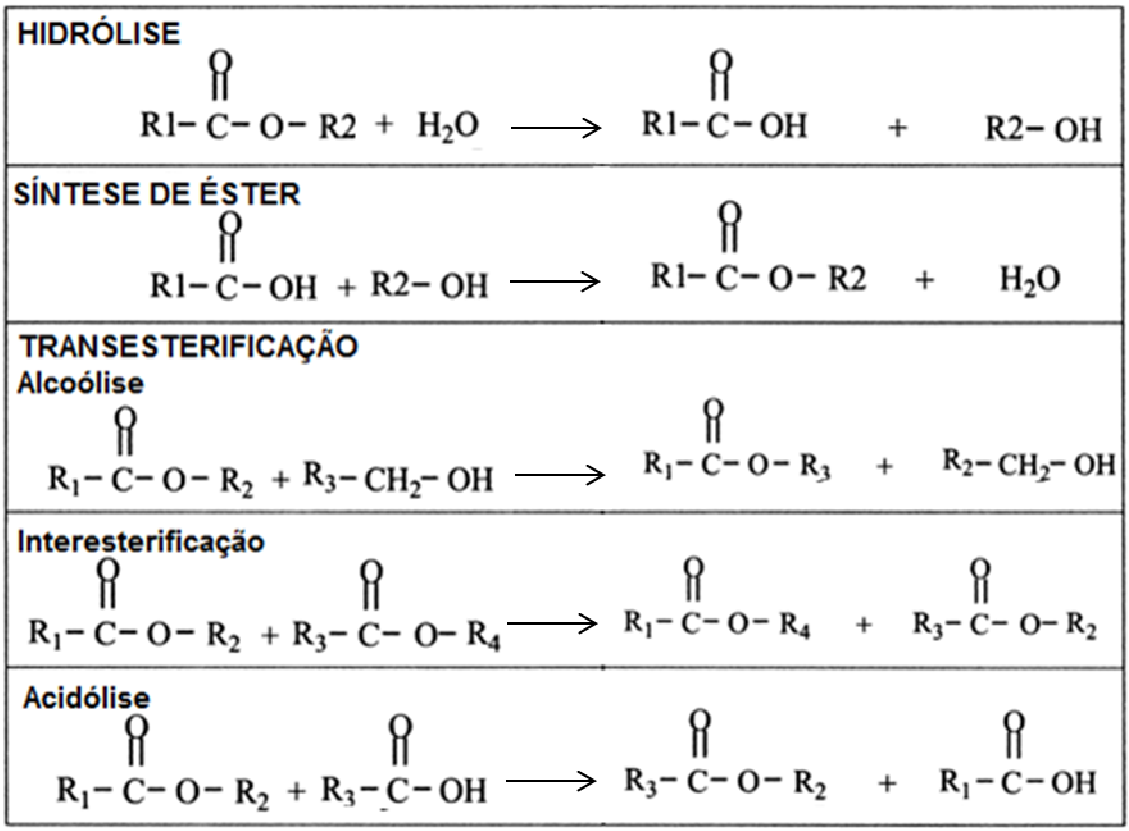


Figura 3.9. Sumário de reações catalisadas por lipase (ABU BAKAR SALLEH; RAHMAN; BASRI, 2006).

Uma vez que as lipases são fisiologicamente necessárias para todos os organismos vivos, elas são encontradas em diversas fontes, tais como animais, vegetais e micro-organismos, e suas diferentes origens refletem suas variadas características.

Lipases têm sido tradicionalmente obtidas a partir de pâncreas animal (bovinos, ovinos e suínos) e são usadas para auxiliar a digestão humana, porém a difícil disponibilidade e coleta de material gerou o interesse pelas lipases microbianas (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). Além disso, impurezas incluindo viroses animais e hormônios podem estar presentes nestes extratos enzimáticos (CASAS-GODOY et al., 2012). Devido a sua habilidade de utilizar substratos hidrofóbicos como fonte de carbono, micro-organismos produtores de lipases são isolados a partir de alimentos em deterioração, onde são responsáveis pela mudança de sabor de produtos lácteos tais como, queijos, ou a partir de ambientes que contenham óleo (esgotos, locais de despejo de lixo, e efluentes de fábricas de óleo) (CASAS-GODOY et al., 2012).

Lipases microbianas constituem um importante grupo de enzimas no âmbito da biotecnologia, principalmente devido a sua versatilidade de aplicações e fácil produção em massa (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). Comparada as lipases bacterianas, lipases produzidas a partir de leveduras *GRAS* são amplamente aceitas em diversas indústrias incluindo a de alimentos (CASAS-GODOY et al., 2012) (Tabela 3.2).

Tabela 3.2. Lipases disponíveis comercialmente (CASAS-GODOY et al., 2012).

Tipo	**Fonte**	**Forma**	**Exemplos de companhias produtoras**
Fungo	*Candida rugosa*	Pó	Atlus Biologics, Amano, Biocatalysts, Boehringer Mannheim, Meito Sangyo, Fluka, Genzyme, Sigma
	Candida antarctica A/B	Imobilizada	Boehringer Mannheim, Novozymes, Sigma
	Thermomyces lanuginosus	Imobilizada	Boehringer Mannheim, Novozymes
	Rhyzomucor miehei	Imobilizada /líquida	Novozymes, Biocatalysts, Amano
	Yarrowia lipolytica	Pó	Amano, Artechno S.A.
	Geotricum candidum	Liquida	Boehringer Mannheim, Novozymes
Bactéria	*Burkholderia cepacia*	Pó	Amano, Fluka, Boehringer Mannheim
	Pseudomonas alcaligenes	Pó	Gist-Brocades, Genencor International
	Pseudomonas mendocina	Pó	Genencor International
	Chromobacterium viscosum	Líquida	Asashi, Biocatalysts
Animal	Lipase pancreática suína	Granulada	Solvay pharma

3.3.1 Produção de Lipases por *Yarrowia lipolytica*

Lipase é um dos mais importantes produtos secretados por *Y. lipolytica*, e atrai o interesse de cientistas e pesquisadores do âmbito industrial devido à diversidade de possíveis aplicações na indústria de detergentes, alimentos, produtos farmacêuticos e ambiental (COELHO; AMARAL; BELO, 2010).

A aplicação de lipase de *Yarrowia lipolytica* na indústria de alimentos vai desde a sua atuação na produção de ácidos graxos, que após oxidação são responsáveis pelo desenvolvimento dos aromas em produtos como linguiças (PATRIGNANI et al., 2011) e queijos maturados (GKATZIONIS et al., 2013) até a produção de ácido cítrico a partir de fontes oleaginosas, tal como resíduo da indústria de azeite de oliva (PAPANIKOLAOU et al., 2008). Ainda na indústria de alimentos há estudos visando a aplicação da lipase desta levedura na hidrólise e enriquecimento de óleos provenientes de microalgas (YAN; ZHANG; CHEN, 2013) e sardinha (FERNÁNDEZ-LORENTE et al., 2011) aumentando a concentração de ácidos graxos, tal como o ômega-3, de grande importância para a saúde humana.

Na química fina, a utilização de enzimas que permitem a reação estereosseletiva são uma alternativa a química quiral clássica (FICKERS; MARTY; NICAUD, 2011). Aplicações envolvendo lipase de *Yarrowia lipolytica* vêm sendo desenvolvidas na resolução de misturas racêmicas de intermediários importantes na indústria farmacêutica (CAMBON et al., 2010; CANCINO et al., 2008). Uso de lipases de *Y. lipolytica* também vem sendo explorada em reações de polimerização da ε-caprolactona (BARRERA-RIVERA; FLORES-CARREÓN; MARTÍNEZ-RICHA, 2008; BARRERA-RIVERA; FLORES-CARREÓN; MARTÍNEZ-RICHA, 2012).

Muitas indústrias geram nos seus processos grandes quantidades de subprodutos com um alto conteúdo lipídico, e diferentes linhagens de *Y. lipolytica* têm sido utilizadas no tratamento e degradação de uma variedade de resíduos (BANKAR; KUMAR; ZINJARDE, 2009). Em particular, tem sido efetiva no tratamento de águas residuais da indústria de azeite de oliva (LANCIOTTI et al., 2005; LOPES et al., 2009, 2016) e efluentes da produção de óleo de palma (OSWAL et al., 2002).

A habilidade de *Y. lipolytica* para crescer em diversos substratos e produzir além de diversos metabólitos, enzimas importantes tais como as lipases, vem sendo bastante reconhecida e valorizada, e por isso amplos estudos têm discutido suas melhores condições de

produção. A seguir, serão explorados brevemente alguns tópicos relacionados aos fatores que influenciam sua produção.

3.3.1.1 – Meios de Cultivo

Segundo Fickers et al. (2013), *Y. lipolytica* tem preferência por fontes de carbono, tais como glicose e glicerol, e compostos nitrogenados facilmente assimiláveis, porém essas condições não estimulam a produção de lipase. A produção de lipase pela cepa selvagem de *Y. lipolytica* CBS6303 e nove linhagens mutantes derivadas foi comparada na presença de glicose e glicerol como fontes de carbono, antes e depois da sua depleção (FICKERS et al., 2003). De maneira geral, não foi constatada diferença significativa entre a primeira e a segunda fase na presença de glicose, já na presença de glicerol foi observada uma diferença de até 80 vezes na produtividade de algumas cepas (FICKERS et al., 2003). Comportamento similar em relação ao glicerol já foi observado em outros trabalhos (BABU; RAO, 2007; CORZO; REVAH, 1999). Tal efeito repressor do glicerol sobre a produção de lipase se deve ao fato deste ser o produto final na hidrólise de triacilgliceróis (CORZO; REVAH, 1999). Já na presença de glicose, alguns estudos demonstram que essa fonte de carbono pode produzir melhores resultados para a produção de lipase extracelular do que triacilgliceróis (BABU; RAO, 2007; CORZO; REVAH, 1999).

O uso de triacilgliceróis (óleo de oliva, óleo de girassol, tributirina), ácidos graxos (ácido oleico) e metil ésteres tanto como indutores quanto como fonte de carbono podem ser utilizados com o objetivo de maximizar a produção de lipase (DARVISHI et al., 2011; DOMÍNGUEZ et al., 2003; FICKERS et al., 2004; FICKERS et al., 2003; TURKI et al., 2010). Óleo de oliva e de milho funcionaram como boas fontes de carbono para produção de lipase por *Y. lipolytica* 681, apesar de resultados melhores terem sido obtidos quando a fonte de carbono foi glicose (CORZO; REVAH, 1999). Resultado similar foi obtido por Babu e Rao (2007) com uma outra cepa desta levedura, onde valores similares de produção de lipase foram apresentados na presença de óleo de oliva e de milho como fonte de carbono, mas ainda sim menores que na presença de glicose. Amaral et al. (2006b) avaliaram a atividade lipolítica de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 em meio contendo glicose ou óleo de oliva como fonte de carbono, na presença de uma segunda fase líquida formada por um carreador de oxigênio (perfluorodecalina), e detectaram maior produção desta enzima em meio contendo glicose (Figura 3.10).

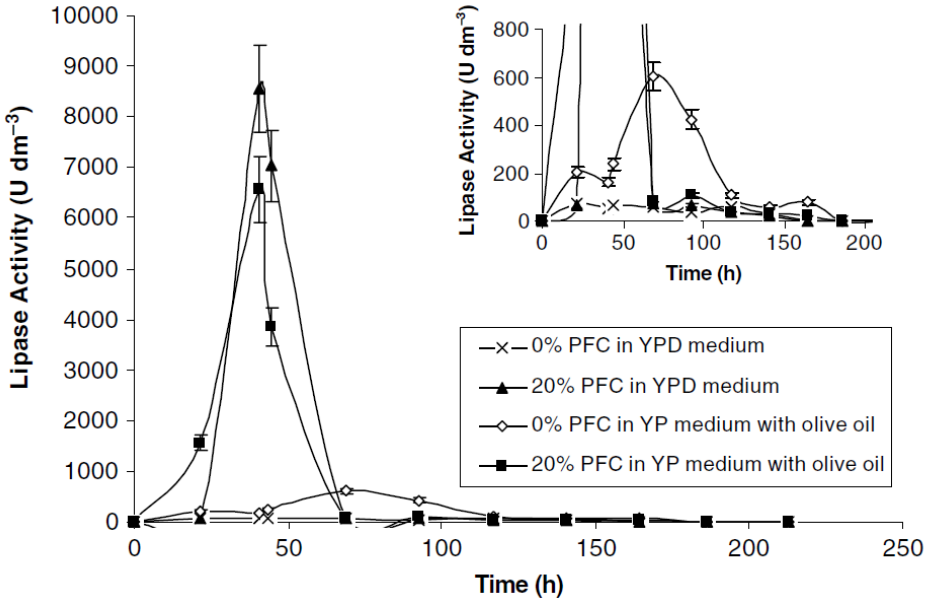


Figura 3.10. Efeito do PFC (% v/v) na produção de lipase por *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 em frasco de 1 L com 200 mL de meio ((100-x)% meio YPD ou meio YP (com 1 % v/v de óleo de oliva) + x % PFC) agitado a 250 rpm. Barra de erro representa desvio-padrão. Fonte: (AMARAL et al. 2006b).

Fickers et al. (2004) investigaram a secreção de lipase e nível de indução do gene responsável pela lipase extracelular de *Y. lipolytica* (*LIP2*) na presença de ácido oleico como fonte de carbono, além de localizar a enzima durante o crescimento da levedura. Não encontraram uma correlação positiva entre a concentração de ácido oleico e produtividade de lipase, que foi maior em baixas concentrações do ácido. Porém, uma correlação positiva foi encontrada com a indução do gene, surgindo a hipótese de que diferente do que acontece no meio contendo glicose, onde a lipase é secretada conforme vai sendo produzida, nos estágios iniciais do cultivo quando o ácido oleico é abundante, lipases ficam ligadas a célula, e somente após a redução da concentração de ácido oleico elas seriam liberadas no meio (FICKERS et al., 2004).

Compostos hidrofóbicos de baixo custo, mais especificamente ésteres, vêm sendo estudados como fonte de carbono alternativa ao óleo de oliva e ácido oleico puro para produção de lipase por *Y. lipolytica* (DESTAIN et al., 2005). Neste estudo, oleato de metila, oleato de etila e metil caprilato-caprato foram avaliados quanto à capacidade de induzir e aumentar a produtividade de lipase por uma cepa mutante de *Y. lipolytica* LgX64.81. A presença de 3% de oleato de metila no meio de cultivo em biorreator de 500 L levou a uma produção cerca de 2 vezes maior do que a obtida em estudo prévio utilizando óleo de oliva (DESTAIN et al., 2005; DESTAIN; ROBLAIN; THONART, 1997).

Além de fontes de carbono, óleos vegetais e ácidos graxos podem atuar como indutores na presença de uma outra fonte de carbono de fácil assimilação como a glicose. Corzo e Revah (1999) obtiveram os melhores resultados de produção de lipase utilizando óleo de milho e de oliva como indutores. Óleo de girassol, seguido do óleo de oliva geraram o maior nível de atividade lipolítica para *Y. lipolytica* CECT 1240, quando comparados a tributirina e ao ácido oleico (DOMÍNGUEZ et al., 2003). Outros estudos apontam o óleo de oliva como um bom indutor (DARVISHI et al., 2011; DEIVE; SANROMÁN; LONGO, 2010).

Fontes de nitrogênio também devem ser cuidadosamente consideradas para o crescimento e otimização da produção de lipase (TREICHEL et al., 2010). Buscando avaliar qual composto nitrogenado é melhor para produção de lipase por esta levedura, diversas fontes vêm tendo sua influência investigada. Alguns resultados contraditórios levam a crer que a cepa utilizada representa uma importante fonte de variação. Corzo e Revah (1999) investigaram diversas fontes de nitrogênio orgânicas e inorgânicas, inclusive algumas misturas entre elas e para a cepa estudada (*Y. lipolytica* 681), a maior produtividade foi obtida com a ureia. Comportamento similar foi reportado num estudo envolvendo a cepa NCIM 3589 (BABU; RAO, 2007). Contrapondo esta tendência, Pereira-Meirelles et al. (1997) conseguiram aumentar em quase 14 vezes a produtividade de lipase em meio contendo peptona comparado a ureia como fonte de nitrogênio.

Sulfato de amônio parece apresentar um efeito repressivo na produção de lipase, como reportado por trabalhos envolvendo várias cepas, inclusive cepas superprodutoras de lipase (BABU; RAO, 2007; CORZO; REVAH, 1999; FICKERS, et al., 2004). Porém, para quatro linhagens de *Y. lipolytica* o sulfato de amônio representou uma excelente fonte de nitrogênio para compor o meio de produção de lipase (KEBABCI; CİHANGİR, 2012). Após avaliar uma série de compostos nitrogenados, orgânicos e inorgânicos, Fickers *et al.* (2004) constataram que triptona N1 e caseína hidrolisada, resultaram num aumento de 166 vezes na produção de lipase por uma cepa mutante, em relação ao meio não suplementado.

Com o objetivo de aumentar a secreção de lipase, adição de surfactantes para aumentar a permeabilidade celular pode ser uma estratégia eficiente, porém os efeitos desses componentes parecem variar entre as linhagens de *Y. lipolytica.* Corzo e Revah (1999) aumentaram a atividade lipolítica extracelular cerca de 3 vezes com a adição de Tween 80 sem alteração na concentração de biomassa, indicando que não houve rompimento celular nas concentrações utilizadas. Em um estudo mais recente, onde foram utilizados diversos

surfactantes diferentes para o mesmo fim (Tween 80, Triton X-100, goma arábica e polietilenoglicol 200) nenhum efeito positivo foi obtido na produção de lipase extracelular de *Y. lipolytica*, inclusive houve redução na produção quando na presença de Tween 80 (DOMÍNGUEZ et al., 2003).

3.3.1.2 – Temperatura e pH

Temperatura e pH também são fatores que afetam significativamente a produção de lipase e o crescimento do micro-organismo. Para Corzo e Revah (1999), a temperatura foi o fator estatisticamente mais importante para a produção de lipase por *Yarrowia lipolytica* 681, sendo estabelecido que as melhores condições de produção foram 29,5ºC e pH inicial igual a 4,7. Temperatura e pH próximos aos valores acima foram determinados para outras 4 linhagens desta levedura, onde a temperatura de maior produção foi de 30ºC e o pH entre 4,4 e 4,8 (KEBABCI; CİHANGİR, 2012).

3.3.1.3 – Agitação e Aeração

A taxa de transferência de oxigênio (TTO) é um parâmetro importante a ser considerado em culturas aeróbias, uma vez que grande parte da atividade metabólica depende do consumo de oxigênio (ANDERLEI et al., 2004). Sistemas de frascos agitados são amplamente utilizados na seleção de micro-organismos de interesse e em experimentos básicos no desenvolvimento de bioprocessos. Eles apresentam design mecânico simples, requerem pequenas quantidades de material e potência e, assim, representam baixo custo de operação (MAIER; BÜCHS, 2001). Em frascos agitados, o oxigênio pode se tornar um fator limitante em culturas microbianas se a demanda de oxigênio exceder a capacidade de transferência do mesmo, que pode ser influenciada pela resistência da tampa do frasco e da interface gás-líquido (MAIER; BÜCHS, 2001). Em termos operacionais, parâmetros que afetam a TTO são: (a) tamanho e formato dos frascos; (b) frequência de agitação; (c) diâmetro da agitação; (d) volume útil; (e) propriedades da superfície do material (hidrofóbico/hidrofílico) e (f) propriedades físico-químicas do líquido (viscosidade, solubilidade do oxigênio e difusividade) (MAIER; BÜCHS, 2001).

A fim de avaliar o efeito da aeração na produção de lipase por *Y. lipolytica* 681 em frascos agitados, Corzo e Revah (1999) realizaram o cultivo desta levedura em frascos Erlenmeyer de 250 mL com diferentes volumes de meio (30, 50 e 100 mL). A produção de lipase foi melhor ao utilizar volumes maiores de cultivo (ou seja, pouca aeração). A atividade

lipolítica reduziu em 20 vezes quando o volume foi de 30 mL e 8 vezes em 50 mL de meio de cultivo, em relação ao volume de 100 mL. Comportamento diferente foi observado por Amaral et al. (2006b), ao avaliar em frascos agitados a relação volume de meio/volume de frasco (V_m/V_f) na produção de lipase, detectaram que a redução da razão V_m/V_f de 0,4 para 0,2 sob agitação de 250 rpm, ou seja, aumentando a área de superfície de contato, houve um incremento na produção de lipase por *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682.

Deive *et al.* (2010) cultivaram *Yarrowia lipolytica* CECT 1240 (ATCC 18 942) em um biorreator do tipo STR e investigaram diferentes taxas de agitação (200 a 1000 rpm) e aeração (0,2 a 1,0 vvm). Observaram que o limite para o valor de agitação ficou em torno de 400 rpm e para valores abaixo desse (200 rpm), as condições de mistura no biorreator foram deficientes, apresentando duas fases distintas (meio aquoso/óleo). Já em velocidades de agitação superiores, por exemplo 1000 rpm, reduzida biomassa e consequentemente baixa atividade lipolítica foi obtida, fato que foi atribuído aos efeitos causados por estresse mecânico em altas velocidades (DEIVE; SANROMÁN; LONGO, 2010). A biossíntese da enzima foi então favorecida a baixas taxas de aeração, e a melhor condição para a produção de lipase neste estudo foi 0,2 vvm de taxa de aeração e velocidade de agitação no intervalo de 400 – 700 rpm (DEIVE; SANROMÁN; LONGO, 2010). Conclusões semelhantes, quanto ao aumento da agitação foram obtidas por Alonso et al. (2005) na produção de lipase por *Y. lipolytica* em um biorreator de 2 L. O aumento da agitação de 300 para 400 rpm resultou na diminuição da biomassa, cujo efeito do estresse mecânico sobre a célula pode ser confirmado através de teste de viabilidade celular. Apesar da viabilidade celular ter sido mantida na agitação a 300 rpm, a biomassa foi reduzida e a atividade lipolítica também, sendo a melhor condição de agitação a 200 rpm com pico de produção em 240 h (5,3 $U.L^{-1}$). Condição de agitação ótima de 200 rpm para outras 3 linhagens de *Y. lipolytica* também foram reportadas para sistema de frascos agitados (KEBABCI; CİHANGİR, 2012).

Outras estratégias visam aumentar a taxa de transferência de oxigênio (TTO), como biorreatores pressurizados (LOPES et al., 2008) e uso de carreadores de oxigênio (AMARAL et al., 2006). *Y. lipolytica* W29 (ATCC 20460) foi cultivada em um biorreator pressurizado com 150 mL de meio de cultivo variando os valores de pressão de 4 a 8 bar. A TTO aumentou de 2 a 3 vezes com a variação de pressão, resultando num aumento de 5,5 a 2,3 na atividade lipolítica a 4 e 8 bar respectivamente (LOPES et al., 2008).

O uso de perfluorocarbonetos (PFC), moléculas que são quimicamente estáveis e inertes devido a presença de fortes ligações flúor-carbono e que apresentam alta solubilidade

para o oxigênio, podem aumentar a TTO em cultivos de micro-organismos (AMARAL et al., 2006). A adição de 20 % (v/v) de PFC, mais especificamente perfluorodecalina, resultou num efeito positivo na produção de lipase por *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682, causando um aumento de 23 vezes na produtividade de lipase com glicose como fonte de carbono, em comparação ao controle sem PFC (AMARAL et al., 2006).

A partir destes estudos é possível concluir que o oxigênio dissolvido tem um impacto considerável na produção de lipase. Pesquisas vêm comprovando esse efeito em fenômenos internos à célula, como o nível de expressão do gene LIP2, que codifica a principal lipase de *Y. lipolytica,* diante de flutuações no nível de oxigênio (KAR et al., 2008; KAR et al., 2010).

3.4 ÁCIDO CÍTRICO

Ácido cítrico (ácido 2-hidroxi-propano-1,2,3-tricarboxílico) é um nome que deriva da palavra latim *citrus*, uma árvore frutífera similar ao limão, tendo sido isolado a partir do suco de limão em 1784 por Karl Wilhelm, um químico suíço (GREWAL; KALRA, 1995; MAX et al., 2010; PAPAGIANNI, 2007). A produção comercial do ácido cítrico começou na Inglaterra em 1860 a partir do citrato de cálcio proveniente de limão importado da Itália. E o suco de limão prevaleceu como a principal fonte de ácido cítrico até 1919, quando o primeiro processo industrial usando *Aspergillus niger* foi iniciado na Bélgica (PAPAGIANNI, 2007).

Em 1893, o ácido cítrico foi identificado pela primeira vez por Wehmer, um botânico alemão, como produto de fermentação pelo fungo filamentoso *Penicillium glaucum.* Após alguns anos, ele isolou duas novas cepas com habilidade de acumular ácido cítrico, designadas como *Citromyces pfefferianis* e *C. glaber* (*Penicillium)*, mas fracassou na tentativa de produzi-lo em escala comercial (GREWAL; KALRA, 1995; SOCCOL et al., 2006). Currie, em 1917, descobriu uma série de linhagens de *A. niger* que cresciam abundantemente em um meio de cultivo com alta concentração de açúcar e sais minerais a pH inicial 2,5 – 3,5. E que enquanto se desenvolviam, esses micro-organismos excretavam grandes quantidades de ácido cítrico. Sua descoberta determinou a base da produção de ácido cítrico estabelecida pela Pfizer, em 1923, nos Estados Unidos (PAPAGIANNI, 2007).

Ácido cítrico puro é incolor, facilmente solúvel em água, massa molar de 210,14 $g.mol^{-1}$, possuindo três pK_a (3,1; 4,7; 6,4), devido a presença dos três grupos funcionais de ácido carboxílico. É o primeiro produto metabólico formado no ciclo do ácido tricarboxílico

(ou Krebs) e é encontrado em pequenas quantidades, virtualmente em todas as plantas e animais (MAX et al., 2010; PAPAGIANNI, 2007).

É um aditivo alimentar versátil e inócuo, mundialmente reconhecido como GRAS (*generally recognized as* safe) pela FDA (*Food and Drug Administration*) e aprovado pelo Comitê Misto FAO/OMS (*Food and Agriculture Organization/*Organização Mundial da Saúde) de Especialistas em Aditivos Alimentares (JECFA) (SOCCOL et al., 2006). Apresenta uma variedade de aplicações na indústria que estão sumarizadas na Tabela 3.3.

Diversos micro-organismos têm conhecida habilidade de acumular ácido cítrico, incluindo fungos filamentosos e bactérias: *A. niger, A. awamori, A. nidulans, A. fonsecaeus, A. luchensis, A. phoenicus,A. wentii, A. saitoi, A. flavus, Absidia sp., Acremoniumsp., Botrytis sp., Eupenicillium sp., Mucor piriformis, Penicillium janthinellum, P. restrictum, Talaromyces sp.,Trichoderma viride, Ustulina vulgaris, Arthrobacter paraffinens, Bacillus licheniformis* e *Corynebacterium ssp.* (DHILLON, et al., 2011).

E leveduras também são utilizadas na produção comercial de ácido cítrico a partir de hidrocarbonetos de baixo custo. Gêneros produtores de ácido cítrico são: *Candida, Hansenula, Pichia, Debaromyces, Torula, Torulopsis, Kloekera, Saccharomyces, Zygosaccharomyces* e *Yarrowia.* Destas, somente as espécies de *Candida,* incluindo *C. tropicalis, C. catenula, C. guilliermondii,* e *C. intermedia* têm sido usadas industrialmente (PAPAGIANNI, 2007).

A maioria destas espécies, contudo, não são capazes de produzir rendimentos comercialmente aceitáveis devido ao fato do ácido cítrico ser um metabólito do metabolismo energético, e seu acúmulo aumentar em quantidades apreciáveis somente em condições drásticas de desequilíbrio metabólico (SOCCOL et al., 2006). E apesar de muitos organismos serem capazes de produzir ácido cítrico, *A. niger* permanece o principal produtor industrial, devido a sua maior produtividade (PAPAGIANNI, 2007; SOCCOL et al., 2006). O rendimento de ácido cítrico a partir de cepas de *A. niger*, frequentemente excedem 70% do rendimento teórico (PAPAGIANNI, 2007).

Tabela 3.3. Aplicações de ácido cítrico (Soccol et al., 2006).

Aplicações	Indústria	Função
Bebidas	Vinhos e cidras	Prevenir escurecimento em vinhos brancos, turbidez em vinhos e cidras. Ajuste de pH.
	Bebidas gaseificadas e xaropes	Estimular sabor natural de fruta. Acidulante em bebidas carbonatadas e baseadas em sacarose.
Alimentos	Geléias, compotas e conservantes	Usado em ajuste de pH. Atua como acidulante. Promove o desejado grau de acidez,
	Produtos lácteos	Como emulsificante em sorvetes e queijos processados. Agente acidificantes e antioxidante em queijos.
	Doces	Atuar como acidulante. Minimizar inversão de sacarose. Produzir coloração escura em balas. Prevenir cristalização da sacarose.
	Frutas congeladas	Proteger ácido ascórbico pela inativação de metais traço. Reduzir pH para inativar enzimas oxidativas
	Gorduras e óleos	Sinergismo com outros antioxidantes, como sequestrantes. Ação estabilizante.
	Ração animal	Complementação da ração
Agricultura		Aumento de disponibilidade de fósforo em plantas
Produtos farmacêuticos	Fármacos	Com efervescente em pó e tabletes combinados com bicarbonatos. Anticoagulante. Promove rápida dissolução de ingredientes ativos. Acidulante em formulações ligeiramente adstringente.
	Cosméticos e artigos de higiene pessoal	Agente tamponante. Ajuste de pH. Antioxidante como quelador de íons metálicos
Outras	Limpeza de metais	Remove óxidos metálicos da superfície de metais ferrosos e não ferrosos, para limpeza operacional de óxidos de ferro e cobre.
		Em galvanoplastia, revestimento de cobre, limpeza de metais, curtimento de couro, tintas de impressão, lavagem de garrafas, têxteis, reagentes fotográficos, concreto, gesso, refratários e moldes, adesivos, papel, polímeros, tabaco, tratamento de resíduos, complexação de íons no fabrico de cerâmica.

A produção em larga escala de ácido cítrico por *A. niger* é realizada em fermentação submersa e as principais fontes de carbono utilizadas são os melaços de cana e de beterraba. Os melaços são matérias primas de baixo custo, subprodutos da indústria de açúcar. Dentre esses dois tipos de melaço, o meio contendo melaço de beterraba apresenta maior rendimento em relação ao meio contendo melaço de cana, devido ao alto conteúdo de metais traço (tais como, cálcio, magnésio, manganês, ferro, zinco), os quais podem retardar a síntese de ácido cítrico (GREWAL; KALRA, 1995). É necessário que essas matérias primas passem por pré-tratamentos para remoção dos metais, o que gera uma série de resíduos prejudiciais ao meio ambiente. Os cátions são normalmente removidos por precipitação com ferrocianeto de potássio ou com resina de troca iônica (PAPAGIANNI, 2007). Em vista da complexidade e prejuízo ecológico causado pelos métodos tradicionais de produção de ácido cítrico a partir de melaço, pesquisas têm buscado investigar o uso de fontes de carbono mais refinadas, tais como glicose e sacarose (PAZOUKI et al., 2000; PEKSEL; KUBICEK, 2003). Além disso, diversos resíduos agroindustriais e subprodutos têm sido investigados na produção deste ácido por fermentação em estado sólido, tais como bagaço de maçã, resíduos de citrinos, bagaço de malte, turfa de *Sphagnum* (DHILLON et al., 2011), casca de banana (KARTHIKEYAN; SIVAKUMAR, 2010), casca de café (SHANKARANAND; LONSANE, 1994), resíduos de abacaxi (TRAN; SLY; MITCHELL, 1998), entre outros. O uso destas matérias primas de baixo custo pode ser mais viável economicamente, além de minimizar vários problemas ambientais (DHILLON et al., 2011).

Devido aos problemas causados pelo processo tradicional de produção de ácido cítrico, desenvolveu-se o interesse por processos alternativos utilizando leveduras, com especial destaque para *Yarrowia lipolytica* conhecida pela habilidade de produzir expressiva quantidade de ácido cítrico (DHILLON et al., 2011). Algumas vantagens quanto ao uso de leveduras na produção de ácido cítrico são: (1) leveduras podem tolerar altas concentrações de substrato; (2) toleram metais traço e podem efetuar a fermentação na presença de fontes brutas de carbono sem a necessidade de tratamento, reduzindo o problema dos resíduos gerados por pré-tratamentos (como abordado anteriormente); (3) tem um potencial para o uso em culturas contínuas; e (4) possuem alta taxa de conversão (GREWAL; KALRA, 1995). Detalhes da produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica* serão abordados a seguir.

3.4.1 Produção de Ácido Cítrico por *Yarrowia lipolytica*

Dentre as leveduras produtoras de ácido cítrico, *Yarrowia lipolytica* tem sido amplamente estudada por sua habilidade em produzir grandes quantidades deste metabólito e ser considerada uma alternativa ao fungo filamentoso tradicionalmente utilizado em escala industrial, *A. niger* (FICKERS et al., 2005). Porém, um problema enfrentado na fermentação por leveduras é a indesejável produção simultânea de ácido isocítrico em quantidades substanciais (DHILLON et al., 2011). Taxas e rendimentos de produção de ácido cítrico são altamente dependentes do tipo de micro-organismo, do tipo de substrato e das condições de cultivo (concentração de nutrientes, modo de operação e outros) (ANTONUCCI et al., 2001; FICKERS et al., 2005). Seleção de mutantes com baixa atividade da enzima aconitase pode ser uma estratégia na tentativa de reduzir a produção de ácido isocítrico (PAPAGIANNI, 2007). Segundo Holz et al. (2009), a superexpressão da enzima aconitase em cepas mutantes de *Y. lipolytica* resultou num aumento da produção de ácido isocítrico.

3.4.1.1 Fontes de Carbono

Yarrowia lipolytica é capaz de acumular ácido cítrico a partir de várias fontes de carbono, tais como glicose, melaço, etanol, alcanos, óleos vegetais, glicerol, além de inulina e sacarose por cepas recombinantes.

O interesse inicial por *Y. lipolytica* foi despertado principalmente pelo fato de utilizar *n*-parafinas como fonte de carbono para a síntese de metabólitos, entre eles o ácido cítrico. Com isso, alguns estudos investigaram melhores condições de produção utilizando este substrato. A partir da cepa selvagem *Y. lipolytica* A-101, Wojtatowicz et al. (1993) obtiveram cepas mutantes visando a seleção de linhagens superprodutivas na presença de *n*-hexadecano. Porém sem sucesso, conseguiram os melhores resultados com a cepa selvagem com uma produção de 69,3 g/L da mistura dos ácidos, com valores para fração de ácido cítrico/isocítrico variando entre 54-64 %. Resultados pouco expressivos foram obtidos por Crolla e Kennedy (2001) com a cepa *Candida lipolytica* NRRL-Y-1095 na presença de *n*-parafinas, com 9,8 g/L sendo a maior produção de ácido cítrico em condições otimizadas. Posteriormente, realizaram experimentos em batelada alimentada com três ciclos e conseguiram aumentar a concentração final de ácido cítrico para 42 g/L, valor significativamente maior do que 12g/L obtido em batelada alimentada com um ciclo e 6 g/L em batelada simples (CROLLA; KENNEDY, 2004).

O uso de etanol como substrato é de grande interesse para o crescimento de leveduras, uma vez que é efetivamente utilizado e é considerado um substância ecologicamente correta (FINOGENOVA et al., 2002). Alguns trabalhos vêm avaliando a biossíntese de ácido cítrico em diversas condições de cultivo, principalmente com o uso de cepas mutantes. A linhagem mutante *Y. lipolytica* VKM Y-2373 foi utilizada na produção de ácido cítrico em bateladas sucessivas na presença de etanol e, em condições otimizadas, se manteve estável por cerca de 700 h de cultivo (ARZUMANOV; SHISHKANOVA, 2000). Neste trabalho, a concentração de ácido cítrico obtida para a batelada simples e sucessiva foi de 116,8 g/L e 105,4 g/L, respectivamente, após cerca de 145 h de cultivo. Porém, o rendimento total e a produtividade em batelada sucessiva (1097 g – 1,25g/L.h) foi maior que em batelada simples (997 g – 1,15 g/L.h) (ARZUMANOV; SHISHKANOVA, 2000). Quantidades semelhantes de ácido cítrico foram obtidas por Kamzolova et al. (2003) utilizando a cepa mutante *Yarrowia lipolytica* N1, para a qual o ácido cítrico é virtualmente o único produto quando cresce em diferentes fontes de carbono sob condições limitantes de nitrogênio. Foi obtida uma concentração maior que 120 g/L e produtividade de 1,15 g/L.h após 144 h de cultivo em batelada simples na presença de etanol como fonte de carbono. Para esta mesma cepa, o efeito das concentrações de etanol, zinco e ferro, além do suprimento de oxigênio na produção de ácido cítrico e isocítrico em cultivo contínuo foram avaliados (FINOGENOVA et al., 2002). As concentrações de etanol utilizadas variaram de 0,01 a 18,0 g/L e maior produção de ácido cítrico (14,2 – 19,2 g/L) e isocítrico (6,4 – 8,7 g/L) foram obtidas em concentrações baixas de etanol variando de 0,01 a 1,0 g/L. O aumento de 1,5 vezes no conteúdo lipídico e alteração da composição de ácidos graxos foi observado quando a concentração de etanol inibiu o crescimento celular e não havia produção de ácido cítrico e isocítrico, fato que foi atribuído a mudanças na composição lipídica na membrana devido à presença de altas concentrações de etanol. Acetil-CoA é precursor tanto da síntese de lipídeos quanto dos metabólitos formados a partir do ciclo dos ácidos tricarboxílicos; portanto na presença de altas concentrações de etanol houve desvio deste precursor para a síntese de lipídeos (FINOGENOVA et al., 2002).

Os óleos vegetais também são bastante estudados como matéria prima para produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica*, com destaque para o óleo de colza (KAMZOLOVA et al., 2007; KAMZOLOVA et al., 2005; KAMZOLOVA; LUNINA; MORGUNOV, 2011; KAMZOLOVA et al., 2013). Trinta espécies de *Y. lipolytica* foram investigadas quanto a sua capacidade de secretar ácido cítrico e lipase em meios de cultivo contendo óleo de colza e gordura animal como única fonte de carbono e energia. A linhagem *Y. lipolytica* 187/1 exibiu

máxima produção de ácido cítrico em óleo de colza, e em condições otimizadas essa produção chegou a 135 g/L com produção de 7,8 g/L de ácido isocítrico após 144 h de cultivo (KAMZOLOVA et al., 2005). Ao avaliar uma cepa selvagem, *Y. lipolytica* VKM Y-2373, e sua mutante, *Y. lipolytica* NG40/UV7, quanto ao seu crescimento e biossíntese dos ácidos cítrico e isocítrico em óleo de coza, Kamzolova et al. (2011) obtiveram altos valores de produção com a cepa mutante, atingindo a concentração máxima de 175 g/L para ácido cítrico e insignificante concentração de ácido isocítrico (5,6 g/L), resultando na razão ácido cítrico : ácido isocítrico igual a 32:1. Enquanto que para a cepa selvagem produziu quantidades quase iguais dos ácidos cítrico e isocítrico. Neste trabalho, a atividade de enzimas importantes do ciclo dos ácidos tricarboxílicos foram monitoradas, tais como citrato sintase, aconitase e NAD-isocitrato desidrogenase, e verificou-se que a cepa mutante apresentou atividade de aconitase consideravelmente menor que a cepa selvagem, além de maior atividade citrato sintase (KAMZOLOVA; LUNINA; MORGUNOV, 2011).

Alguns estudos também reportam aplicação de resíduo industrial, tal como águas residuais da indústria de azeite, na produção de ácido cítrico por linhagens de *Y. lipolytica*. *Yarrowia lipolytica* ACA-DC 50109 foi cultivada em águas residuais da indústria de azeite enriquecida com glicose comercial (65 g/L), gerando uma quantidade de 28,9 g/L de ácido cítrico (PAPANIKOLAOU et al., 2008). Neste estudo também foi demonstrada a capacidade desta cepa crescer em meio contendo alto conteúdo fenólico, como é o caso deste resíduo, e ainda reduzir a quantidade destes no meio, reduzindo assim sua toxicidade.

O efeito da concentração inicial de glicose na produção de ácido cítrico foi investigada por alguns autores. Antonucci et al. (2001) variaram a concentração inicial de glicose (70 – 150 g/L) e avaliaram a cinética de produção pela cepa *Y. lipolytica* ATCC 20346. Constatando que altas concentrações de glicose são favoráveis à produção de ácido cítrico, obtendo produtividade de 0,059 g/L.h e rendimento de 0,384 g/g. Seguindo a mesma tendência, *Y. lipolytica* ACA-DC 50109 foi cultivada em condições limitantes de nitrogênio (0,5 g/L $(NH_4)_2SO_4$ e apresentou como respostas a diferentes concentrações de glicose (33 – 150 g/L) na produção de ácido cítrico (PAPANIKOLAOU et al., 2006): (i) não houve diferença na concentração final de biomassa entre as várias concentrações de glicose; (ii)porém na maior concentração de glicose a levedura produziu 42,9 g/L de ácido cítrico, com aumento do rendimento de 0,53 g/g em meio contendo 52 g/L de glicose para 0,82 g/g na maior concentração (150 g/L). Valores semelhantes foram obtidos por Papanikolaou et al. (2009) com a linhagem selvagem *Y. lipolytica* W29, a qual destacou-se dentre outras nove

linhagens, incluindo algumas mutantes, quanto a produção de ácido cítrico em meio de cultivo contendo glicose. Foi observado um aumento significativo na produção de ácido cítrico com aumento da concentração de glicose de 30 g/L para 60g/L, resultando em uma produção de 18 g/L e 49 g/L, respectivamente. Em 60 g/L de glicose também houve aumento do rendimento de ácido cítrico para 0,85 g/g de glicose, em comparação a 0,62 g/g na menor concentração (PAPANIKOLAO et al., 2009).

Na produção de biodiesel a partir da transesterificação química de compostos lipídicos e álcool, é gerado glicerol bruto, considerado como o principal subproduto desta reação (RYWIŃSKA et al., 2013). Este resíduo, apesar de aplicação limitada devido a sua composição e impurezas, vem sendo amplamente estudado e utilizado como fonte de carbono na produção de vários compostos de valor agregado por bactérias, leveduras, fungos filamentosos e microalgas sob condições aeróbias e anaeróbias (RYWIŃSKA et al., 2013). Formas alternativas de valorização de glicerol estão relacionadas a sua biotransformação em ácido cítrico, pirúvico e biomassa unicelular por *Y. lipolytica* (AMARAL et al., 2009). A produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica* LGAM S(7)1 foi realizada comparando-se o efeito de glicose e glicerol bruto em frascos agitados (PAPANIKOLAOU et al., 2002). Dados de crescimento e produção do ácido foram similares em ambas as fontes de carbono, atingindo 35 g/L de ácido cítrico com 0,42 – 0,44 g/g de rendimento quando em meio de cultivo tamponado contendo alta concentração de glicerol (120 g/L) (PAPANIKOLAOU et al., 2002).

A razão carbono / nitrogênio é um fator bastante importante na formulação do meio fermentativo e na razão ácido cítrico/isocítrico (AC/AIC), como vem sendo demonstrado por alguns trabalhos. Ao investigar 27 cepas de *Y. lipolytica*, quanto à produção de ácido cítrico a partir de glicerol, destacou-se a cepa YB-423 com produção de 21,6 g/L e razão ácido cítrico/isocítrico igual a 11,3. O meio de crescimento para esta cepa teve a relação carbono/nitrogênio (C/N) otimizada, onde a melhor razão AC/AIC (9,0) foi alcançada na razão C/N de 343 e 686 (LEVINSON; KURTZMAN; KUO, 2007).

A cepa *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 tem sido explorada quanto a sua habilidade de consumir glicerol puro e glicerol bruto e produzir ácido cítrico a partir dessa fonte de carbono (da SILVA et al., 2010, 2012, 2013). Aplicando planejamento experimental, da Silva *et al.* (2013) estabeleceram condições ótimas de concentração de glicerol, extrato de lêvedo e agitação para a produção de ácido cítrico em frascos agitados. A melhores razões molares C/N iniciais foram 714 e 1561 para glicerol puro e glicerol bruto, respectivamente. Alcançando

16,5 g/L de ácido cítrico e razão AC/AIC igual a 12,0 em glicerol puro, e 9,2 g/L de ácido cítrico em glicerol bruto com menor razão AC/IAC (10,4). A diferença do efeito da razão C/N entre glicerol puro e glicerol bruto é atribuída ao fato do desvio da via metabólica devido a presença de impurezas o que foi evidenciado pelo aumento em 3 vezes na produção de biomassa em glicerol bruto. Com o aumento da razão C/N houve redução do produção de biomassa em 30 %, e aumento na produção de ácido cítrico e razão AC/IAC (da SILVA et al., 2013).

Outras fontes de carbono vêm sendo utilizadas e seu uso é possível graças ao emprego de cepas recombinantes como é o caso do uso de inulina pela cepa *Y. lipolytica* 30, expressando o gene *INU1* que codifica exo-inulinase clonado a partir de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 (LIU et al., 2010), e também do uso de sacarose por uma cepa de *Y. lipolytica* recombinante expressando o gene ScSUC2 proveniente de *S. cerevisiae* que codifica invertase (FÖRSTER et al., 2007).

3.4.1.2 Fontes de Nitrogênio

O crescimento de *Y. lipolytica* em condições limitantes de nitrogênio com excesso de fonte de carbono resulta em intensa síntese dos ácidos cítrico e isocítrico. Em condições de crescimento limitada pela fonte de nitrogênio, o conteúdo total de nucleotídeos é reduzido e aumenta a razão ATP/AMP e $NADH/NAD^+$ (MORGUNOV et al., 2004). Investigando o mecanismo de regulação deste mecanismo de acúmulo, Morgunov *et al.* (2004) isolaram a enzima isocitrato desidrogenase NAD^+-dependente, uma enzima chave na regulação da biossíntese destes ácidos, a partir de células de *Y. lipolytica*. O efeito de alguns intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico na atividade desta enzima sugere que o aumento da excreção de ácido cítrico pode ser causada pela inibição de isocitrato desidrogenase NAD^+-dependente devido a redução do conteúdo de AMP e aumento na razão $NADH/NAD^+$ sob condições de depleção de nitrogênio (MORGUNOV et al., 2004).

Mesmo em condições limitadas é preciso definir melhores fontes, orgânicas e inorgânicas, de nitrogênio, além de melhores concentrações, a fim de maximizar a produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica*. Imandi et al. (2007) definiram através de planejamento experimental Doehlert a melhor concentração de extrato de levedura (0,268 g/L) maximizando a produção de ácido cítrico (77,4 g/L) por *Y. lipolytica* NCIM 3589.

Utilizando uma fonte inorgânica de nitrogênio (NH_4Cl), Karasu-yalcin et al. (2010) analisaram o efeito da concentração deste sal no intervalo de 0-6 g/L, em intervalos de 2 g/L, e concluíram que em meio contendo 2 g/L de NH_4Cl maiores concentrações de ácido cítrico e taxa de produção foram obtidas por *Y. lipolytica* 57 e *Y. lipolytica* NBRC 1658.

O efeito de diferentes concentrações de extrato de levedura e sulfato de amônio foi estudado na produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682, determinando que num intervalo de 0,05 – 0,24 g/L de extrato de levedura, maior concentração de ácido cítrico e razão AC/IAC foram obtidas em 0,1705 g/L desse composto na presença de 30 g/L glicerol (DA SILVA,, 2014). Além disso também foi avaliado o uso simultâneo de sulfato de amônio (0,7 g/L) e extrato de lêvedo (0,1705 g/L), cujo resultado foi uma redução de 39 % na produção de ácido cítrico e 1,74 vezes na produção de ácido isocítrico, o que reduziu a razão AC/ICA e a produtividade de ácido cítrico (DA SILVA, 2014).

3.4.1.3 Temperatura e pH

A concentração de íons hidrogênio influencia consideravelmente a produção de ácido cítrico e valores de pH para o crescimento podem ser diferentes do que aquele requerido para formação de produto (KARASU-YALCIN; TIJEN BOZDEMIR; YESIM OZBAS, 2010). Para as cepas *Y. lipolytica* NBRC 1658 e *Y. lipolytica* 57 foi demonstrado que máxima taxa de crescimento foi obtida a pH 6,0 e pH 5,2, respectivamente. Produção máxima de ácido cítrico foi obtida na faixa de 5,2-7,0 para ambas as cepas.

Moeller et al. (2007) investigaram a influência do pH inicial (3,0 – 8,5) e da temperatura (24 – 36 ºC) na produção e taxa específica de crescimento de *Y. lipolytica* H222 utilizando glicose como fonte de carbono. A condição ótima foi estabelecida a pH 6,0 e temperatura 30 ºC. Nestas condições foram obtidos 41 g/L de ácido cítrico com seletividade de 93,1 %, e um rendimento de 0,55 g/g de glicose. Valor equivalente de temperatura ótima foi obtido para outras duas cepas de *Y. lipolytica* (KARASU-YALCIN; TIJEN BOZDEMIR; YESIM OZBAS, 2010)

Em um estudo com a cepa selvagem *Y. lipolytica* VKM 2373 a mudança de pH inicial demonstrou ser um fator importante na razão entre ácido cítrico e isocítrico. Em pH 6,0 concentrações de ácido cítrico e isocítrico foram de 55,4 e 21,7 g/L, respectivamente, com razão AIC:AC de 2,55:1; já em pH 4,5, a razão foi para 1:1,18 (KAMZOLOVA et al., 2007).

3.4.1.4 Agitação e Aeração

Suprimento de oxigênio tem um efeito determinante na produção de ácido cítrico, uma vez que este é um processo aeróbio (SOCCOL et al., 2006). Não somente o crescimento da levedura, mas também a formação de ácido depende do nível de saturação de O_2 no meio. O efeito da concentração de oxigênio dissolvido (pO_2) em meio de cultivo contendo etanol foi avaliado para a cepa *Candida lipolytica* 704 VKM Y-2373, selecionada por produzir altas quantidades de ácido isocítrico. Em valores de 90 – 95 % de saturação de O_2, as leveduras sintetizaram quantidades aproximadamente iguais de ácido cítrico e ácido isocítrico (AIC:AC = 1: 1,1). Reduzindo o conteúdo de O_2 no meio para 60 – 65%, a síntese de ácido cítrico foi inibida (ICA:CA = 2:1) (FINOGENOVA et al., 1991).

Efeito de interação entre a concentração de ferro e oxigênio na produção de ácido cítrico foi observado por Kamzolova *et al.* (2003), verificando que em baixa concentração de ferro (0,7 mg/L) e o aumento de pO_2 de 5% para 60% resultou em aumento de produção de 0 para 18,2 g/L de ácido cítrico. Já em alta concentração de ferro (3,5 mg/L), a mudança de 20% para 60% de pO_2 não demonstrou efeitos significativos na produção de ácido cítrico. Em meio enriquecido com ferro (3,5 mg/L) foi possível produzir citrato em concentrações de oxigênio relativamente baixas (20 %), com acúmulo de ácido cítrico de até 120 g/L e rendimento de 0,87 g/g de etanol utilizando a cepa mutante *Y. lipolytica* N1 (KAMZOLOVA et al., 2003).

Segundo Rywińska et al. (2012), mais importante do que valores das taxas de aeração e agitação é a manutenção da concentração de oxigênio dissolvido, sendo a saturação de ar o fator real determinante para a produção de ácido cítrico. Em estudo realizado com as cepas mutantes acetato-negativas *Y. lipolytica* Wratislavia 1.31 e Wratislavia AWG7, a pO_2 foi mantida em 50 – 80% nas melhores condições de produção de ácido cítrico. Estas concentrações foram estabelecidas através da investigação de diferentes condições de agitação e aeração. Inicialmente foi determinado que entre 5 velocidades de agitação variando de 400 a 900 rpm, a melhor condição para as duas cepas foi a 800 rpm. Fixada a velocidade de agitação (800 rpm), os cultivos foram submetidos a diferentes taxas de aeração (0,18 – 0,6 vvm). As maiores concentrações de ácido cítrico 92,8 g/L e 85 g/L foram alcançadas em 0,24 e 0,36 vvm para Wratislavia 1.31 e Wratislavia AWG7, respectivamente. Taxas de aeração e velocidade de agitação menores favoreceram a produção de ácido isocítrico (RYWIŃSKA et al., 2012).

Para produção de ácido cítrico em biorreator, da Silva (2014) definiu, entre diferentes taxas de agitação (350, 450, 550, 650 rpm) e a uma taxa de aeração constante de 1 vvm, maiores valores de produção e rendimento de ácido cítrico em 550 rpm utilizando a cepa *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 e glicerol como fonte de carbono.

Estes resultados sugerem diferenças essenciais na regulação da síntese deste metabólito dependendo da concentração de oxigênio dissolvido (pO_2) no meio de cultivo.

3.4.1.5 Recuperação do Produto

O método clássico e comercialmente implantado atualmente na recuperação do ácido cítrico é a sua precipitação do meio fermentativo pela adição de carbonato de cálcio. O *downstream* se inicia com a filtração do caldo fermentado contendo o ácido cítrico para remoção do micélio ou células e outras impurezas em suspensão. Em seguida é adicionado carbonato de cálcio ao caldo que depois é aquecido. O ácido cítrico precipita como citrato de cálcio, o qual é separado por filtração e os resíduos removidos com água. O precipitado é tratado com ácido sulfúrico (H_2SO_4) seguido de remoção de sulfato de cálcio (gesso) por filtração (Pazouki e Panda, 1998). A solução contendo ácido cítrico é tratada com carbono ativado e passa através de uma coluna de troca iônica sendo posteriormente concentrada por evaporação em sistema a vácuo a 40ºC. Finalmente a cristalização é realizada em cristalizadores a vácuo a 20-25º C para obtenção de cristais de ácido cítrico monohidratados; e a 36,5 ºC para o produto anidro (GREWAL; KALRA, 1995; SOCCOL et al., 2006).

Os principais problemas na produção de ácido cítrico são ainda as etapas de separação e purificação. Os vários estágios de filtração, precipitação, cristalização e secagem tornam o processo complicado e custoso, além disso é responsável pela disposição de uma enorme quantidade de gesso, gerando problemas ambientais (SOCCOL et al., 2006).

Alguns métodos alternativos para purificação e cristalização do ácido cítrico vêm sendo desenvolvidos, tal como a extração com solvente. Aminas alifáticas com elevada massa molar exibem uma boa seletividade para ácido cítrico (PAZOUKI; PANDA, 1998). Outros métodos são a fase líquida suportada em membrana, onde uma membrana polimérica inerte é impregnada com solvente que apresente afinidade pelo ácido cítrico (FRIESEN et al., 1991; JUANG; HUANG; WU, 1997), e a eletrodiálise (LUO et al., 2004; PINACCI; RADAELLI, 2002) um processo de separação eletroquímico, onde uma membrana carregada eletricamente e uma diferença de potencial elétrico são usados para separar espécies iônicas numa solução aquosa (SOCCOL et al., 2006).

3.5 MINIATURIZAÇÃO DE FERMENTAÇÕES

No desenvolvimento de processos biotecnológicos modernos, microbiorreatores e minibiorreatores tem desempenhado um importante papel na chamada seleção de alto rendimento (do inglês *high-throughput screening*) e em cultivos de pequena escala (LATTERMANN; BÜCHS, 2015). A necessidade de realização de um grande número de experimentos para alcançar desde o melhor meio de cultivo até o melhoramento de cepas para otimização de processos, tem resultado no avanço cada vez mais generalizado do desenvolvimento de sistemas de fermentação miniaturizados (BETTS; BAGANZ, 2006). Cultivo em pequena escala tem como vantagens a paralelização, automatização (em alguns casos) e redução de custos dos constituintes do meio (KUMAR; WITTMANN; HEINZLE, 2004).

Os sistemas miniaturizados vão desde sistemas de frascos de pequenos volumes e microplacas agitados, a miniaturas de biorreatores do tipo STR, e atualmente existem vários modelos disponíveis comercialmente (Tabela 3.4).

Sistemas de frascos agitados são ainda a abordagem mais utilizada para seleções de alto rendimento (*high-throughput screening*), permitindo que muitas condições sejam testadas simultaneamente (HANSON; RAO; FLICKINGER, 2009). Porém, diferente dos biorreatores, sistemas de frascos agitados e microplacas são tipicamente menos instrumentados e além disso têm limitada oportunidade de amostragem devido ao pequeno volume usado (de 0,1 mL a aproximadamente 100 mL), além da limitação espacial (BETTS; BAGANZ, 2006). O limitado controle de condições resulta em um número restrito de variáveis a serem consideradas e alteradas, por exemplo, para investigar o impacto do aumento do oxigênio dissolvido, a rotação do agitador pode ser aumentada para aumentar o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$), ou ainda o volume pode ser reduzido, beneficiando assim a área de transferência em relação ao volume. Ou ainda, os fechamentos dos frascos podem ser alterados para aqueles de menor resistência a transferência de oxigênio (HANSON; RAO; FLICKINGER, 2009). Ao invés de controle qualitativo, como descrito acima, tem se buscado estratégias de monitoramento quantitativo direto destas mudanças. Devido a isso, métodos de monitoramento *on-line* não-invasivos, tais como métodos de fluorescência e luminescência (Figura 3.11) podem ser utilizados para a aferição de parâmetros como pH e oxigênio dissolvido (LATTERMANN; BÜCHS, 2015; LONG et al., 2014).

Tabela 3.4. Comparação de alguns sistemas de cultivo para "*high-throughput screening*"(HTP) comercialmente disponíveis (adaptado de Long et al., 2014)

Nome do Sistema	*MicroFlask*por Duetz	Placas de 24- e 96 poços com sensores em disco	*Biolector*	μ-24	*Micro-matrix*	*Ambr*
Características básicas	Miniatura de frascos agitados na configuração de placa de poços quadrados e redondos	Placas de microtitulação de 6 ou 24 poços com sensores de luminescência integrados	Sistema de microfermentação baseado em microplacas com sensores óticos não invasivos. Sendo possível automatização.	Microbiorreator com 24 colunas de bolhas.	24 biorreatores no formato de microplacas com controles independentes assim como em biorreatores do tipo STR. Possibilita alimentação individual.	Microbiorreator do tipo STR. Automatização do manuseio de líquidos para configuração do reator, alimentação e amostragem.
Volume do cultivo/Biorreator	Placas de poços quadrados: 24 poços (2,5-4 mL) e 96 poços (0,3-0,75 mL). Placas de poços redondos: 24 (0,75-1,5 mL) e 96 (0,1-0,2 mL)	Placas de 6 ou 24 poços. Volume do cultivo de 0,1-6 mL.	*Flower-plate*: 0,8-1,5 mL	Volume de trabalho: 3 -7 mL	Volume de trabalho: 1 – 7 mL por coluna	Volume de trabalho: 10 – 15 mL por frasco
Informações do processo e controle de parâmetros	Ausência de informação do processo e controle de parâmetro	pH e oxigênio dissolvido de cada cultura pode ser monitorado, mas não controlado	Monitoramento online de biomassa, pH e oxigênio dissolvido e moléculas fluorescentes	Monitoramento contínuo e controle de temperatura, pH e oxigênio dissolvido de cada coluna,	Suprimento de gás independente (O_2/N_2/CO_2/NH_3), controle e monitoramento individual de temperatura, pH e oxigênio dissolvido.	Controle de circuito fechado de pH e Oxigênio Dissolvido. Controle individual de O_2 e CO_2 para cada frasco.

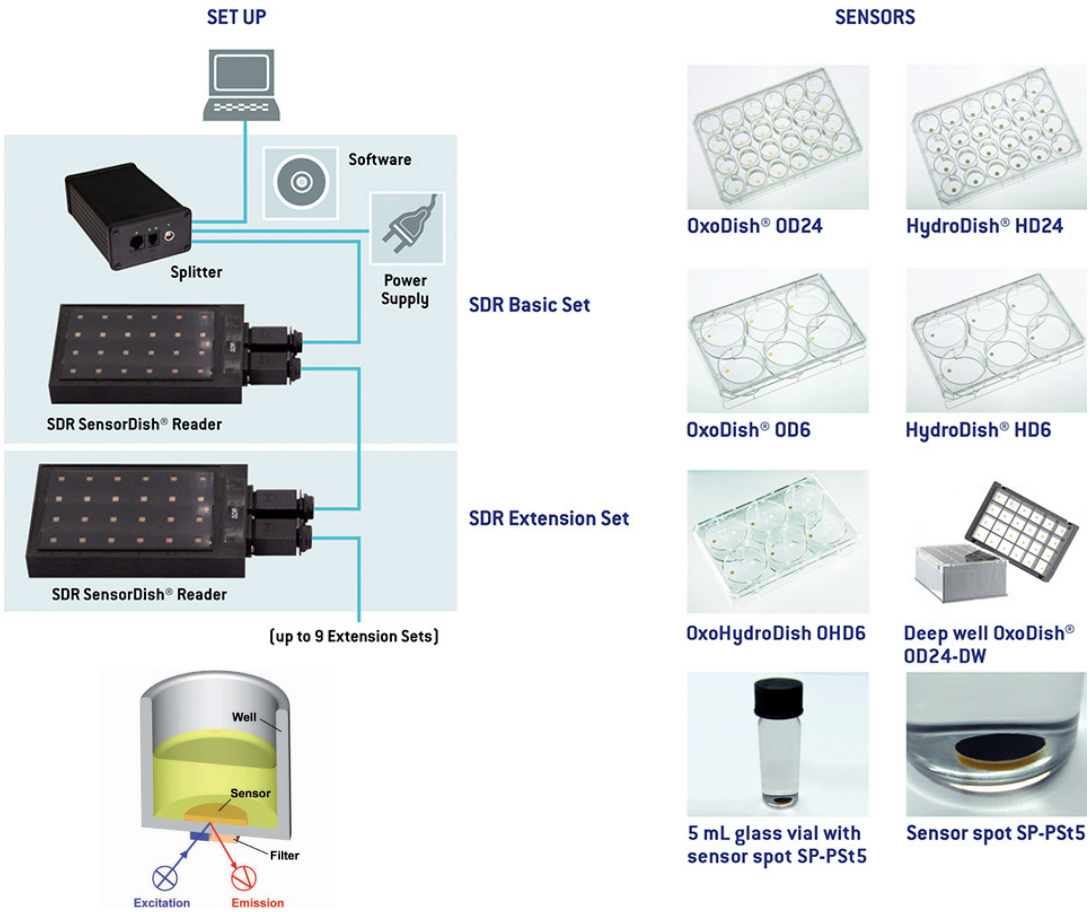


Figure 3.11. Exemplo de sensor para monitoramento de pH e oxigênio dissolvido, comercialmente disponível e seu funcionamento.

Muitos bioprocessos em larga escala são realizados em batelada alimentada, quando a glicose inicialmente oferecida é totalmente consumida, e alimentação contínua com uma solução de glicose concentrada é fornecida. Em alguns casos, *screening* de componentes de meio ou mutantes precisam ser realizados em batelada alimentada, e há sistemas de liberação de glicose que podem ser aplicados a cultivos miniaturizadas em microplacas de 24 ou 96 poços (DUETZ; CHASE; BILLS, 2010). Uma estratégia é a adição de discos de elastômero contendo cristais de glicose em cada poço os quais, através da difusão lenta da glicose para o meio líquido, vão alimentando o cultivo (JEUDE et al., 2006).

Outro método de cultivo, chamado EnBase^{TM}, que combina a difusão contínua do amido, um polímero metabolicamente inativo, a partir de uma fase em gel no meio de cultura e a conversão enzimática do amido em glicose (PANULA-PERÄLÄ et al., 2008). Neste sistema, a taxa de liberação de glicose é controlada pela quantidade da enzima glucoamilase adicionada no sistema.

Estes tipos de sistemas miniaturizados têm sido aplicados principalmente em estudos de *screening* de linhagens de células animais e seleção de micro-organismos recombinantes (DUETZ, 2007; LONG et al., 2014). Alguns estudos também vêm sendo desenvolvidos com o intuito de realizar a otimização das condições de operação e componentes de meio de cultivo em sistemas miniaturizados. HEVEKERL, KUENZ e VORLOP (2014) utilizaram placas de microtitulação como plataforma para a otimização do processo de produção de ácido itacônico por *Aspergillus terreus*. O cultivo foi realizado em placas de 96 poços com fundo redondo, contendo 100 µL de volume útil. Os resultados obtidos foram comparados com o cultivo realizado em frascos agitados de 250 mL. Os resultados de produção do ácido foram comparáveis nos dois sistemas. O cultivo em microplaca possibilitou a realização de muitos experimentos em paralelo, para otimização dos componentes do meio de produção com baixo desvio entre os poços (HEVEKERL; KUENZ; VORLOP, 2014). Em um outro estudo, o cultivo do fungo filamentoso *Aspergillus carbonarius* foi investigado em placas de 24 poços para fermentação de ácido cítrico, etanol e glicerol. Este método demostrou boa reprodutibilidade entre os poços quando realizado em sextuplicata (LINDE et al., 2014). Com o interesse de miniaturizar bioprocessos envolvendo *Trichoderma reesei,* Giese et al. (2014) otimizaram as condições de produção e suprimento de oxigênio em frascos agitados (250 mL) e, em seguida, buscaram reproduzir igual capacidade máxima da taxa de transferência de oxigênio (TTO_{max}) através do estudo de diversas condições de operação. A TTO_{max} de 20 mmol/L/h foi obtida com 1 mL de volume útil por poço, 200 rpm e 50 mm de diâmetro de agitação.

Capítulo 4
MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

Os componentes dos meios de cultivo utilizados foram: peptona bacteriológica (*Oxoid*– Hampshire, UK), extrato de lêvedo e glicerol (*Sigma-Aldrich* - Brasil), glicose e agar-agar (Vetec – RJ, Brasil).

Os componentes dos sistemas aquosos bifásicos Polietilenoglicol (PEG) 2000, 4000 e 6000 e os sais inorgânicos (*Vetec* – RJ, Brasil).

Os reagentes *ρ*-nitrofenil laurato, bicarbonato de colina ($ChHCO_3$), aminoácidos, ácidos orgânicos, azocaseína, dimetilsulfóxido, azul de Comassie, iodo foram adquiridos através da *Sigma-Aldrich* (Brasil).

Foram utilizadas membrana de éster de celulose 0,45 µm e membrana para seringa (PVDF) 0,45 µm e diâmetro de 13 mm com baixa ligação às proteínas (*Millipore,* SP, Brasil).

4.2. EQUIPAMENTOS

Os equipamentos utilizados nos experimentos e nas análises foram:

1) Incubadora com agitação (shaker) (Tecnal TE-420);
2) Capela de fluxo laminar *BioFlux II 90A;*
3) Centrífuga *Fanem* modelo *204-NR;*
4) Centrífuga *Eppendorf* modelo *Centrifuge 5804R;*
5) Espectrofotômetro *Bel Photonic* modelo *SP2000-UV*;
6) HPLC (High Pressure Liquid Chromatography), *Shimadzu;*
7) Leitor de Microplacas (*Molecular Devices, SpectraMax M2e*);
8) pHmetro de bancada digital *Digimed*, modelo *DM-22*.
9) Microplacas de 24 poços de 11 mL e 25 mL (Enzyscreen B.V., Holanda)
10) Biorreator de 1,5L (modelo Tec-bio-1,5, Tecnal, SP, Brasil)

4.3. MICRO-ORGANISMO

O micro-organismo empregado no presente trabalho foi uma cepa selvagem de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, selecionada de um estuário da Baía de Guanabara no Rio de Janeiro, Brasil (HAGLER; MENDONÇA-HAGLER, 1981) e identificada pelo Instituto de

Microbiologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro. As células foram conservadas em tubos de ensaio contendo YPD ("*Yeast Extract, Peptone, Dextrose*") composto por (m/v): extrato de lêvedo 1%, peptona 2%, glicose 2% e Agar-agar 2%, e acondicionadas a 4ºC após 26 horas de crescimento a 28ºC.

4.4. ENSAIO DE TOLERÂNCIA

Foram realizados ensaios de microdiluição, para verificar a concentração máxima na qual seria possível observar o crescimento de *Y. lipolytica* na presença de diferentes compostos, tais como sais, PEG e líquidos iônicos, tendo em vista a possível aplicação destes em sistemas aquosos bifásicos. O esquema do ensaio econtra-se apresentado na Figura 4.1.

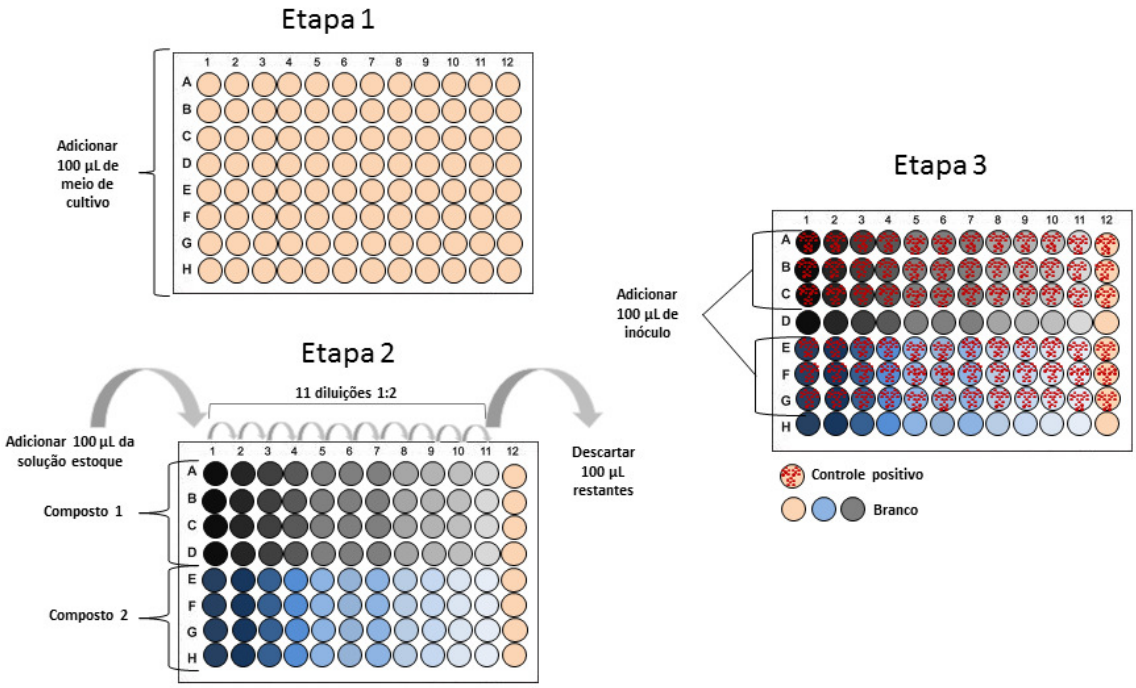


Figura 4.1 Esquema do ensaio para determinação da concentração máxima não tóxica (CMNT).

Para determinação de concentração máxima não tóxica (CMNT) foram utilizadas microplacas de 96 poços onde foram adicionados 100 µL de meio YPD* (1% de extrato de lêvedo, 0,64% de peptona, 2% de glicose, p/v) (AMARAL et al., 2007). Em seguida, foram realizadas 11 diluições seriadas (1:2) de uma solução estoque contendo os componentes a serem testados, cuja concentração foi determinada utilizando como base os dados de solubilidade do composto em água a 25ºC (Tabela 4.1 e 4.2). A partir dos tubos contendo as células preservadas em meio sólido YPD inoculou-se, de forma estéril, utilizando uma alça de platina, 200 mL de meio de cultivo YPD em frascos erlenmeyers de 500 mL. Os frascos

foram submetidos à agitação em incubador rotatório a 28 ºC, 160 rpm, por cerca de 24 h. Após esse período, foi retirada uma alíquota do cultivo, que foi centrifugada a 1.258 *g* por 5 minutos e ressuspensa em água destilada estéril. A absorvância (570 nm) da suspensão foi determinada e diluída em meio de cultivo para obtenção de uma concentração de 5 x 10^3 células/mL. Foram adicionados então, 100 µL da suspensão em cada poço, resultando em um volume final de 200 µL, e concentração final de cerca de 2,5 x 10^3 células/mL (Figura 4.1). A referência para este valor é o método padrão internacional M27-A do CLSI/NCCLS (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) aplicado em teste de microdiluição para determinação de suscetibilidade de leveduras a antifúngicos.

Tabela 4.1 Concentração das soluções estoque utilizadas na determinação da concentração máxima não tóxica (CMNT).

Componente	Concentração da solução estoque % (p/v)
$CaCl_2 . 2H_20$	40,0
KCl	26,0
NaCl	26,0
NH_4Cl	28,0
K_3PO_4	72,0
K_2HPO_4	70,0
KH_2PO_4	20,0
$NaH_2PO_4 .H_20$	67,0
Na_2HPO_4	10,0
K_2CO_3	74,0
Na_2CO_3	27,0
$NaHCO_3$	10,0
Na_2SO_4	15,0
K_2SO_4	10,0
$(NH_4)_2SO_4$	52,0
PEG 2000	40,0
PEG 4000	40,0
PEG 6000	35,0

Tabela 4.2 Concentrações das soluções estoque de líquidos iônicos utilizadas para determinação da concentração máxima não tóxica (CMNT).

Líquido iônico	**Concentração Solução estoque % (m/v)**
[Ch][DHP] Dihidrogenofosfato de colina	90
[Ch][Ac] Acetato de colina	90
[Ch][But] Butanoato de colina	80
[Ch][Hex] Hexanoato de colina	90
[Ch][Sal] Salicilato de colina	90
[Ch][Bz] Benzoato de colina	90
[Ch][Lac] Lactato de colina	90
[Ch][Gly] Glicinato de colina	80
[Ch][His] Histidinato de colina	60
[Ch][Ala] Alaninato de colina	80
[Ch][Asn] Asparaginato de colina	80
[Ch][Asp] Aspartato de colina	80
[Ch][Pro] Prolinato de colina	80
[Ch][Gln] Colina glutamina	60
[Ch][Glu] Glutamato de colina	80
[Ch][Ser] Serinato de colina	80

Após o período de incubação de 48 horas, a CMNT foi determinada visualmente pela turvação do meio de cultivo. O valor da CMNT foi estabelecido como a maior concentração onde foi possível visualizar turbidez após reprodução do ensaio por pelo menos dois experimentos independentes, realizados em triplicatas.

4.4.1 Preparo dos líquidos iônicos

Os líquidos iônicos foram preparados através da adição lenta de um ácido orgânico ou aminoácido sobre bicarbonato de colina ($ChHCO_3$ 76%) sob agitação durante 12h, e depois mantida agitação para finalizar a reação por mais 48h. Como a reação é estequiométrica, foi calculada a proporção de água presente nos LI, a qual foi determinada por titulação em Karl–Fisher (Metrohm 831 Karl Fischer coulometer).

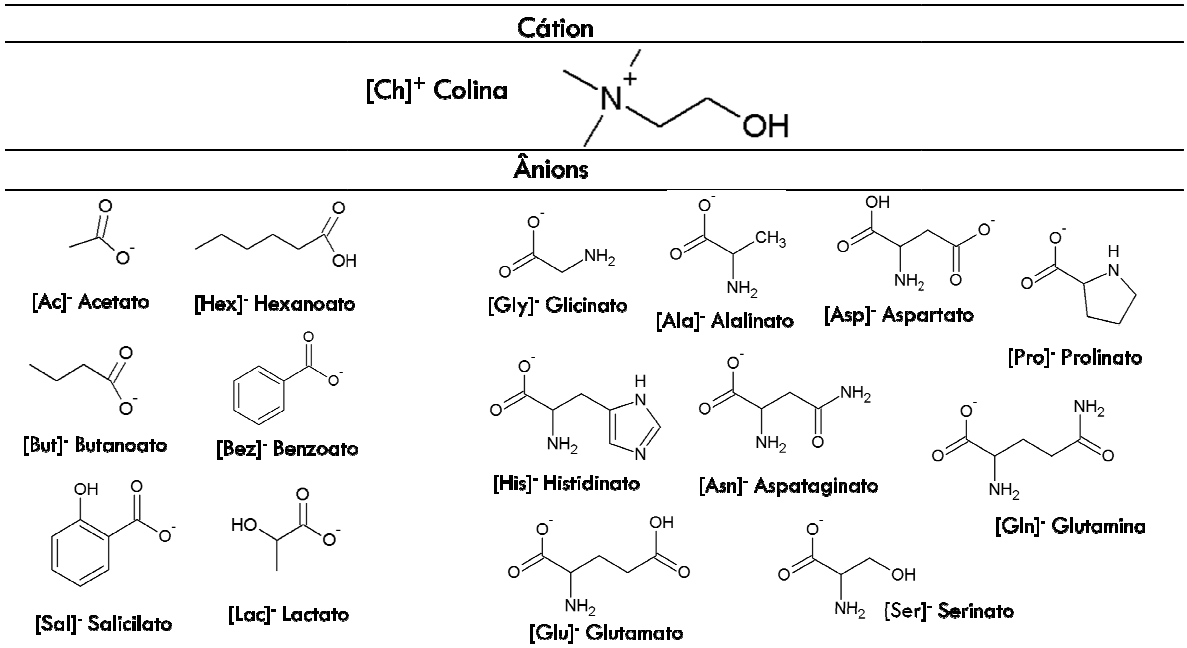


Figura 4.2 Estrutura dos ânions e do cátion utilizados para síntese dos líquidos iônicos.

4.5. CULTIVOS

Assim como descrito no item 4.4, inoculou-se, de forma estéril, células de *Y. lipolytica* em 200 mL de YPD contidos em frascos erlenmeyers de 500 mL, os quais foram submetidos a agitação de 160 rpm por cerca de 72h. Após esse período, a absorvância (570 nm) de uma amostra do cultivo foi determinada e, em seguida, relacionada a curva de peso seco. Uma alíquota do cultivo, contendo a biomassa necessária para uma concentração inicial de células no meio de produção de 1 mg p.s. cél/mL, foi então centrifugada de forma estéril a 1,258 *g* por 5 minutos e ressuspensas, servindo de inóculo para os experimentos descritos a seguir.

4.5.1. Composição do meio para produção de lipase

O meio de cultura para produção de lipase foi YPD* constituído por glicose (20 g/L), extrato de lêvedo (10 g/L) e peptona (6,4 g/L).

4.5.2. Composição do meio para produção de ácido cítrico

Para o meio de produção de ácido cítrico foi utilizado meio mineral tamponado constituído por: KH_2PO_4 (12 g/L), Na_2HPO_4 (11,78 g/L), $MgSO_4.H_2O$ (1,5 g/L), $CaCl_2.2H_2O$

(0,2 g/L), $FeCl_3.6H_2O$ (0,15 g/L), $ZnSO_4.7H_2O$ (0,02 g/L), $MnSO_4.H_2O$ (0,06 g/L), glicerol (30 g/L)e extrato de levedura (0,1705 g/L) (SILVA et al., 2012).

4.5.3. Experimentos preliminares

4.5.3.1 Cultivo em sistemas miniaturizados

Experimentos preliminares para a *produção de lipase* foram realizados em três sistemas miniaturizados diferentes Erlenmeyer de 10 mL (10EF) com 4 mL de meio líquido, microplaca 24 poços de 25mL (24MTP/25mL) contendo 4 mL de meio; e microplaca 24 poços de 11mL (24MTP/11mL) contendo 2,5 mL de meio (Figura 4.2). Ambas as placas do sistema Duetz foram adquiridas através de Enzyscreen B.V (Holanda). Os ensaios foram conduzidos em incubador rotatório (*shaker*) a 28ºC, 250 rpm e 28 mm de diâmetro de agitação. Estes experimentos foram realizados por 48 horas. Neste modelo, cada frasco ou poço equivaleu a uma amostragem.

O cultivo miniaturizado para *produção de ácido cítrico* só foi realizado em Erlenmeyer de 10 mL, nas mesmas condições operacionais, por 96 horas. Como discutido na seção 3.5, que trata das miniaturizações, este estudo preliminar foi necessário para avaliar a possibilidade de realização dos experimentos em menor escala, de forma a realizar o *screening* das diversas condições para fermentação extrativa.

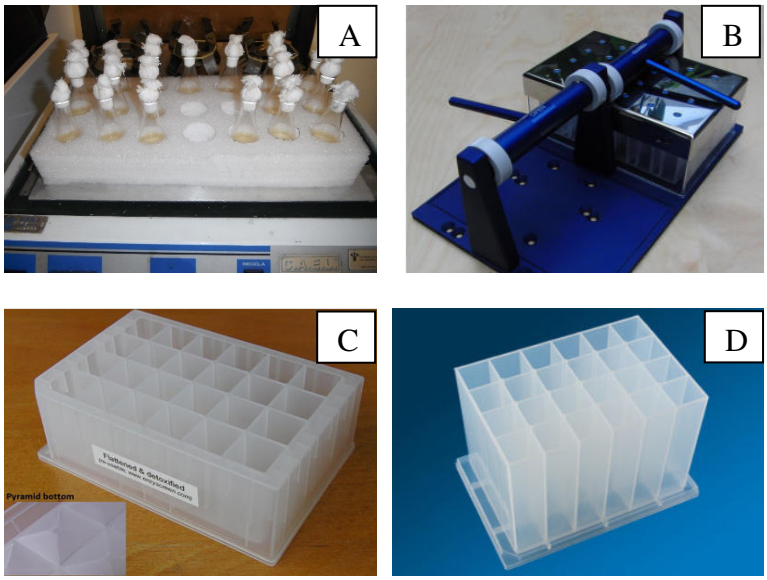


Figura 4.3 Sistemas miniaturizados utilizados. Erlenemeyer de 10 mL (A); Base das microplacas do sistema Duetz (B); microplaca 24 poços de 11mL (24MTP/11mL) (C); microplaca 24 poços de 25mL (24MTP/25mL) (D).

4.5.3.3 Cultivo em biorreator

Os cultivos em biorreator foram realizados em Biorreator de 1,5L Tecnal modelo Tec-bio-1,5 com volume nominal de 1,5 L, equipado com dois impelidores, um superior do tipo Rushton com seis pás verticais e um inferior do tipo Smith-CD6 com seis pás côncavas. A distância entre os impedidores foi de 4,8 cm e de 3 cm entre o impelidor e a saída de aeração. Para este cultivo foram utilizados 750 mL de volume de meio YPD*, mantidos sob agitação de 550 rpm e 1 vvm de vazão de ar, a 28ºC (BRÍGIDA et al., 2014a).

4.5.4. Experimentos em sistemas bifásicos

4.5.4.1 Fermentação em sistemas de duas fases aquosas

Fermentações extrativas foram conduzidas nas mesmas condições operacionais descritas no item 4.5.3.1, o que diferiu foi a adição dos componentes do SAB (Tabela 4.2). Devido ao pequeno volume do experimento, foram feitas soluções mãe dos componentes do meio, as quais foram esterilizadas separadamente e, posteriormente, adicionadas aos frascos de fermentação em condições estéreis.

Para o meio de produção de lipase, foi feita uma solução contendo extrato de lêvedo, peptona e PEG; e uma outra solução contendo glicose e o sal componente do SAB. Para o meio de produção de ácido cítrico, foi realizada uma solução contendo os sais do meio tamponado e o sal componente do SAB, e uma outra solução contendo glicerol e PEG. Ambas as soluções eram 2 vezes mais concentradas do que o desejado no meio de cultivo, logo, foram adicionadas iguais proporções de cada solução (2mL) no Erlenmeyer de 10 mL, resultando em um volume final de 4mL com a concentração desejada.

Após 26 horas de cultivo para lipase e 96 horas para ácido cítrico, todo o conteúdo do meio fermentativo foi transferido para um tubo de centrífuga, caracterizando sacrifício de amostra. Sob agitação em vórtex por 10 segundos, para alcançar a maior homogeneização possível, amostras foram rapidamente retiradas para quantificação da concentração celular. Após isso, os tubos foram centrifugados a 1.258 *g* por 5 minutos para acelerar a separação das fases. Foram retiradas alíquotas da fase do topo e da fase de fundo, para análises posteriores. Devido ao pequeno volume disponível para amostragem, era necessário, em alguns casos, filtrar a amostra com filtro Millipore (0,45 µm) acoplado à seringa para garantir que esta estivesse livre de células.

Para o ensaio de fermentação extrativa em biorreator foram utilizadas as mesmas condições descritas no item 4.5.3.3. com a diferença da presença dos componentes do SAB (PEG 2000 30% / KH_2PO_4-K_2HPO_4 7% pH 7,0).

4.5.4.2 Diagrama de fase

As curvas de solubilidade dos sistemas compostos por a) colina dihidrogenofosfato [Ch][DHP], água, polietilenoglicol 2000; b) polietilenoglicol 2000, água e sulfato de sódio foram determinadas utilizando o método de titulação do ponto de névoa a 25º C. Para o sistema formado por PEG 2000 e [Ch][DHP], foram preparadas soluções aquosas contendo 40% (m/m) de [Ch][DHP] e uma solução contendo 60% (m/m) de PEG 2000. Para o sistema formado por PEG 2000 e Na_2SO_4, foram preparadas soluções de 50% (m/m) de PEG 2000 e 20% (m/m) do sal inorgânico (Na_2SO_4). Uma das soluções foi mantida sob agitação constante e controle de temperatura, no caso do sistema PEG 2000/[Ch][DHP] foi a solução do líquido iônico; e para o sistema PEG 2000/Na_2SO_4 foi a solução de PEG. A essa solução em agitação foram adicionadas gotas da outra solução até a detecção de uma turbidez (ponto de névoa), seguida da adição de água MiliQ até detecção de uma solução límpida e sistema monofásico.

No caso dos diagramas de fase contendo componentes do meio de cultivo, todas as soluções utilizadas no método de titulação do ponto de névoa continham a mesma quantidade dos componentes majoritários de meio de cultivo (KH_2PO_4, $Na_2HPO_4.7H_2O$ e glicerol) conforme item 4.5.2, inclusive a água MiliQ utilizada para desturvar o sistema.

4.5.5. Autoclavação

Todos os componentes do meio de cultivo foram esterilizados em autoclave a 0,5 atm por 15 minutos. Os materiais, tais como, vidrarias, tubos de centrífuga, ponteiras para pipetas, utilizados nos experimentos foram autoclavados a 1 atm por 25 minutos.

4.6. MÉTODOS ANALÍTICOS

4.6.1. Quantificação da concentração celular

A concentração celular foi determinada por medidas de densidade ótica no espectrofotômetro a 570 nm e esses valores convertidos para mg p.s. cél/mL usando-se um fator de conversão determinado em curva de peso seco. Para obtenção da curva de peso seco foi realizada uma suspensão de células em solução salina (0,9 % (m/v) de NaCl e água

destilada), a partir da qual foi feita uma série de diluições. As soluções em diferentes concentrações celulares foram filtradas em papel de filtro Millipore (0,45 µm), secas em luz infravermelho até peso constante. Com os valores de absorvância medida em espectrofotômetro para cada diluição, e os seus respectivos valores de peso seco foi construída uma curva de peso seco. No caso das medidas realizadas nos cultivos em sistemas bifásicos, para garantir aliquotagem homogênea do meio de cultivo, fez-se uso do de agitação em vórtex por 5 segundos. Para promover a leitura da absorvância de uma suspensão sem a presença das duas fases, a alíquota retirada era diluída de forma a garantir que os componentes do sistema aquoso bifásico também o fossem; permitindo, dessa forma, que a suspensão estivesse fora da região bifásica.

4.6.2. Determinação da atividade lipolítica

A atividade da lipase foi estimada através da variação de absorvância a 410 nm em leitor de microplacas (*Molecular Devices, SpectraMax M2e*) devido à oxidação do *p*-nitrofenil laurato (*p*-NFL) com uma concentração de 0,162 $mg.mL^{-1}$ em tampão fosfato de potássio (0,05 M), pH 7,0 (PEREIRA-MEIRELLES; ROCHA-LEÃO; SANŤANNA, 1997).

O substrato (*p*-NFL) é preparado solubilizando 0,018 g deste em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida, uma alíquota é diluída 100 vezes em tampão fosfato de potássio (0,05 M). Uma microplaca de 96 poços contendo 180 µL do substrato é aclimatada a 37 ºC por, aproximadamente, 15 minutos. Após esse período, é adicionado 20 µL do meio de cultivo e a absorvância acompanhada a 410 nm contra o branco da reação (20 µL do tampão fosfato de potássio adicionados a 180 µL do substrato).

O cálculo da atividade é realizado utilizando a Eq. (4.1):

$$A = \frac{(\Delta Abs)*D*f*V_r}{(\Delta t)*V_s} \tag{4.1}$$

Onde:

A = atividade da enzima ($U.L^{-1}$), onde 1 Unidade enzimática (1U) corresponde a quantidade de enzima capaz de produzir 1 µmol de p-nitrofenol por minuto nas condições de ensaio;

ΔAbs = variação de absorvância no intervalo de tempo Δt (em minutos) transcorrido durante a fase de aumento linear da absorvância;

D = diluição da solução enzimática;

V_r = volume reacional, que é o volume da solução de *p*-NPL em tampão e o volume da amostra, em litros;

V_s = volume da solução enzimática utilizada no ensaio, em litros;

f = fator de conversão (338 µmol/L), obtido através da construção de uma curva padrão de *p*-NFL em concentração variando entre 0,01 e 0,2 µmol.mL-1.

4.6.3. Determinação da atividade proteolítica

A medida de atividade proteolítica foi realizada segundo Charney e Tomarelli (1947). A técnica consiste na adição do extrato enzimático em uma solução de azocaseína 0,5 % em tampão acetato 50 mM, pH 5,0 em iguais proporções (0,5 mL) e a mistura incubada por 40 minutos a 32 ºC. Decorrido esse tempo, adicionou-se 0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 15 % (p/v), objetivando a precipitação de proteínas não hidrolisadas pela protease. Em seguida, centrifugou-se a amostra (3.000 g, 10 minutos), e então, 100 µL do sobrenadante foram transferidos para uma placa de 96 poços a qual se adicionou 100 µL de KOH 5 N, resultando em uma coloração laranja característica dos grupamentos azo em pH alcalino. A leitura de absorvância da amostra foi realizada em leitor de microplacas (*Molecular Devices, SpectraMax M2e*) a 428nm, contra um branco da reação no qual o ácido tricloroacético era adicionado antes da adição do extrato enzimático. O cálculo da atividade foi realizado utilizando a Eq. (4.2):

$$Atividade = \frac{(Abs\ amostra - Abs\ branco)}{(0{,}01)\ x\ (\Delta t) x\ (Va)} \tag{4.2}$$

Onde:

Abs amostra = o valor de absorbância lido para a amostra de extrato enzimático;

Abs branco = o valor de absorbância lido para o branco da análise;

Δt = o tempo decorrido de análise em minutos;

Va = volume de amostra usado em mL.

Neste caso, uma unidade (U) de atividade enzimática proteolítica foi definida como o aumento de 0,01 de absorvância que a amostra apresentou em relação ao branco por minuto nas condições de reação.

4.6.4. Quantificação de glicerol, glicose e ácido cítrico

Para quantificar o glicerol, a glicose e a mistura de ácido cítrico e isocítrico foram realizadas análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High Pressure Liquid Chromatography,* HPLC, Shimadzu). Para tal análise utilizaram-se os seguintes itens: coluna *Aminex*® HPX-87H, acoplada a uma pré-coluna trocadora de cátions, dimensões 300 nm x 7,8 nm (*Bio-Rad Laboratories Ltd*), detector de índice de refração RID-10A (Shimadzu), bomba LC-20ADSP (Shimadzu) e software cromatográfico *LabSolutions* (Shimadzu). A fase móvel utilizada foi H_2SO_4 5 mM com vazão de 0,8 mL/min, o volume de injeção foi 20 µL e a temperatura da coluna mantida a 60°C. As amostras foram filtradas em membrana (CHROMAFIL®) com diâmetro de 0,45 µm e injetadas em duplicata para a quantificação através do uso da curva padrão.

4.6.5 Determinação do teor de proteína

Para determinação do teor de proteína presente nas soluções enzimáticas, utilizou-se o método desenvolvido por Bradford (1976). O reagente de Bradford foi preparado a partir da dissolução de 10 mg de azul de Comassie em 50 mL de etanol 95% e posterior adição de 100 mL de ácido orto-fosfórico 85 % (m/v). A solução final foi diluída com água destilada para um volume final de 1 L.

Em microplaca de 96 poços, adicionou-se 160 µL do reagente de Bradford em 40 µL da amostra, agitou-se a placa, uma função do próprio equipamento de leitura, e após 2 minutos de repouso realizou-se a leitura de absorbância (λ = 595 nm) em espectrofotômetro. Para obtenção da curva de calibração de proteína, correlacionaram-se os valores de absorbância obtidos a partir da leitura de soluções de albumina de soro bovino com concentrações conhecidas de proteína, variando-se a concentração entre 0 e 50 µg de proteína/mL.

4.6.6 Determinação de pH

O pH das amostras foi determinado utilizando-se um pHmetro da marca Digimed, modelo DM-22, previamente calibrado com tampões padrão 6,86 e 4,01 a temperatura ambiente (25 ºC). No caso dos ensaios de tolerância em microplaca, o pH foi estimado através do uso de tiras indicadoras de pH (0-14) (Merck).

4.6.7 Determinação do $k_L a$

Para determinação do $k_L a$, foi utilizado o método de oxidação do sulfito pelo oxigênio dissolvido no meio (COOPER; FERNSTROM; MILLER, 1944). Para tal, uma solução de sulfito de sódio (0,075 M) e Cu^{2+} (10^{-4} M) como catalisador, foi incubada em frascos e microplacas (MTPs) agitados a 250 rpm, 28ºC. Foram retiradas amostras em intervalos periódicos para determinação da quantidade de sulfito remanescente. Trata-se de um sistema de modelo químico clássico, adequado ao sistema miniaturizado proposto. O ensaio é baseado na seguinte reação química:

$$2Na_2SO_3 + O_2 \xrightarrow{Cu^{2+}} 2Na_2SO_4 \tag{4.3}$$

A amostragem foi realizada a intervalos regulares e as amostras imediatamente adicionadas a uma solução contendo 12 ml de água, 5 ml da solução de iodo (0.1 M) e 1 ml de HCl (2 M). A dosagem do sulfito é feita através de iodometria. O teor de iodo em excesso foi analisado por titulação com solução padrão de tiossulfato de sódio (0,05 M) e uma suspensão de amido como indicador.

O $k_L a$ foi calculado a partir da taxa de absorção de oxigênio *versus* tempo pela concentração restante de sulfito, usando a equação (4.4).

$$K_L a = \frac{\Delta SO_3^2}{\Delta t \times C_s} \times f_{st} \tag{4.4}$$

Em que, C_s é a concentração de saturação de oxigênio a determinada temperatura (GOLTERMAN; CLYMO; OHNSTAD, 1978) e f_{st} é o fator estequiométrico da reação (16/126).

4.7 Determinação dos parâmetros de separação da fermentação extrativa

A razão do volume das fases (Rv) refere-se a razão entre o volume da fase de topo (V_T) e o volume da fase de fundo (V_F) (Eq. 4.5):

$$R_V = \frac{V_T}{V_F} \tag{4.5}$$

A atividade específica de lipase (U/mg) foi calculada de acordo com a equação (4.6):

$$AEL = \frac{AL}{C_P} \tag{4.6}$$

em que AL é a atividade lipolítica (U/mL) e C_P é a concentração de proteína (mg/mL). Esse parâmetro foi calculado para lipase na fase de topo (AEL_T), lipase na fase de fundo (AEL_F) e lipase total (AEL).

O coeficiente de partição da lipase (K_L), do ácido cítrico (K_{AC}) e da proteína (K_P) foram calculados como a razão da atividade de lipase, concentração de ácido cítrico ou de proteínas na fase de topo (C_T) e fase de fundo (C_F) (Eq. 4.7):

$$K = \frac{C_T}{C_F} \tag{4.7}$$

O coeficiente de partição da atividade específica de lipase (K_{AE}) foi dado pela equação 4.8:

$$K_{AE} = \frac{AEL_T}{AEL_F} \tag{4.8}$$

O percentual de recuperação dos componentes na fase de topo (η_T) foi calculado utilizando a equação 4.9:

$$\eta_T\ (\%) = \frac{100}{1+(1/R_V \times K)} \tag{4.9}$$

Para a determinação do percentual de recuperação do ácido cítrico na fase de fundo η_F foi calculada a diferença (Eq. 4.10):

$$\eta_F = 100 - \eta_T \tag{4.10}$$

As concentrações totais de ácido cítrico, lipase e proteína doram calculados levando em consideração a concetração destes na fase de topo (C_T), na fase de fundo (C_F) e o volume correspondente a cada uma das fases (V_T e V_F) (Eq. 4.11):

$$Concentração\ total = \frac{(C_T \times V_T) + (C_F \times V_F)}{V_T + V_F}$$

Capítulo 5

CULTIVO DE *Yarrowia lipolytica* EM SISTEMAS MINIATURIZADOS

5.1. PRODUÇÃO DE LIPASE EM SISTEMA MINIATURIZADO

5.1.1 Cinética de crescimento

O efeito de diferentes sistemas miniaturizados no perfil de crescimento de *Yarrowia lipolytica* foram avaliados e comparados com o cultivo em biorreatores e os resultados são apresentados na Figura 5.1.

O perfil de crescimento cinético de ambos os sistemas miniaturizados mostrou a mesma tendência, com a fase exponencial seguindo até 8 h; depois a fase de desaceleração até 24 h, quando, então, a fase estacionária começa. O acúmulo de biomassa atingiu uma concentração de 18 g p.s./L em frasco Erlenmeyer de 10 mL (10EF) e 17 g p.s/L em microplacas (MTP) após 24 h de cultivo. Perfil similar foi também obtido em biorreator de bancada de 1,5 L.

A Tabela 5.1 mostra os valores de taxa específica de crescimento e do consumo de glicose, que foram obtidos nas mesmas condições de agitação (250 rpm) e temperatura (28 ° C). A Tabela 5.1 também inclui resultados de cultivo realizados em biorreator de 1,5 L, além de dados publicados previamente obtidos pelo nosso grupo, em relação ao cultivo de *Y. lipolytica* em escala de laboratório (AMARAL et al., 2006a; BRÍGIDA et al., 2014a). Para todos os sistemas miniaturizados, obtiveram-se valores similares de taxa específica de crescimento, em torno de 0,27 h^{-1}. Menor valor da taxa específica de crescimento (0,17 h^{-1}) foi relatado por AMARAL et al. (2006) para o cultivo de *Y. lipolytica* realizado em frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio YPD, nas mesmas condições de agitação e temperatura aqui utilizadas. Comparando apenas o cultivo realizado nos frascos de Erlenmeyer, os quais têm semelhança geométrica, pode-se observar que a mesma razão volume de meio (Vm) e volume do frasco (V_f) (V_m / V_f = 0,4) foram mantidos e um aumento de 1,6 vezes na taxa específica de crescimento foi observada no frasco menor (10EF).

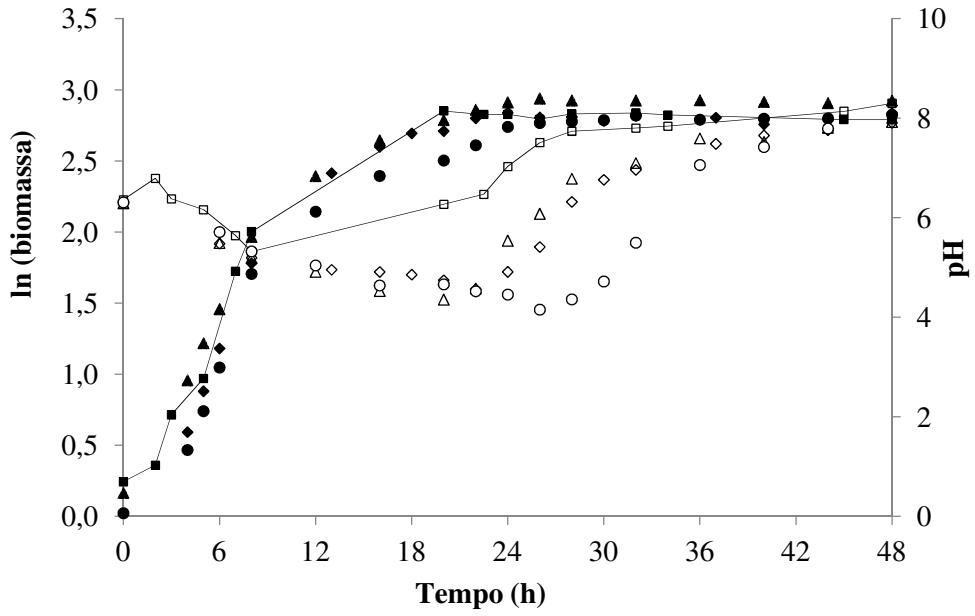


Figura 5.1 Perfil de crescimento de *Yarrowia lipolytica* em diferentes sistemas miniaturizados. Valores de biomassa: (▲) Erlenmeyer de 10 mL (10EF); (♦) microplaca de 24 poços de 11 mL (24MTP/11mL); (●) microplaca de 24 poços de 25 mL (24MTP/25mL); (■) Biorreator 1,5 L. Valores de pH: (Δ)10EF; (◊) 24MTP/11mL; (○) 24MTP/25mL; (□) Biorreator 1,5 L.

Esta mesma tendência pode ser observada para a taxa de consumo de glicose (-dS/dt), que apresentaram valores maiores (0,81 – 0,74 mg/mL.h) para todos os sistemas de cultivo miniaturizados, quando comparados aos frascos Erlenmeyer de 500 mL (0,31 mg/mL.h).

Nos estudos em escala laboratorial, é comum manter a mesma geometria e a relação V_m/V_f para garantir uma similaridade proporcional de *headpace* e semelhança fisiológica do cultivo microbiano. Os resultados acima mencionados para o frasco Erlenmeyer mostraram que a manutenção da similaridade não resultou em resultados semelhantes.

Taxa específica de crescimento (μ) semelhante ao valores aqui alcançados foi obtida no cultivo de *Y. lipolytica* realizado em frascos Erlenmeyer de 500 mL com 10% de perfluorocarboneto (PFC) como um transportador de oxigênio (0,25 h^{-1}), responsável pelo incremento no coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) (AMARAL et al., 2006) e em um biorreator de 2 L com velocidade de agitação superior a 450 rpm (0,23 h^{-1}) (BRÍGIDA et al., 2014). A taxa específica de crescimento obtida em biorreator de 1,5 L também foi igual ao alcançado em sistemas miniaturizados, como foi demonstrado na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 Parâmetros do cultivo de *Yarrowia lipolytica* em diferentes sistemas miniaturizados e em biorreator de bancada 1,5 L, incluindo dados da literatura para outros cultivos em escala laboratorial.

Sistema	μ (h^{-1})	-dS/dt [β] (g/L.h)	Produtividade de lipase (U/L.h)	Atividade lipolytica máxima (U/L)	k_La (h^{-1})	TTO_{max} (mmol/L.h)	V_m/V_f
10EF	0,27 ± 0,015	0,80 ± 0,02	181,54 ± 3,61	3776,96 ± 62,98	129,4 ± 1,3	31,8	0,4
24MTP/11 mL	0,29 ± 0,020	0.81 ± 0,08	32,03 ± 0,09	645,36 ± 89,5	122,9 ± 5,7	29,9	0,23
24MTP/25 mL	0,27 ± 0,005	0,74 ± 0,02	14,04 ± 0,16	505,29 ± 5,81	47,3 ± 1,8	11,7	0,16
Bench Fermenter (1,5 L) (550 rpm)	0,27	0,36	1380,95	35904,74	165,42 ± 15,90	40,49	0,5
Erlenmeyer flask (500 mL)	0,17 ± 0,01[a]	0,31 ± 0,01[a]	4,4 ± 0,1[a]	100[a]	33,7 ± 0,4	8,2	0,4
Erlenmeyer flask (1000 mL)	-	-	8.2 ± 0,7[a]	180 [a]	-	-	0,2
Bench Fermenter (2L) (550 rpm)	0,30 ± 0,01[b]	0,48 ± 0,01[b]	288 ± 21[b]	6797 ± 884[b]	67,5 ± 7,4[b]		0,75

Os valores são dados como a média de três experimentos ± desvios-padrão. Vm/Vf: relação volume de meio (Vm) e do volume do frasco (Vf).
10EF: frasco Erlenmeyer de 10 mL; 24MTP/11mL: microplaca de 24 poços de 11 mL; 24MTP/25 mL: microplaca de 24 poços de 25 mL.
[a] *valores obtidos por Amaral et al. (2006).*
[b] *valores obtidos por Brígida et al. (2014) usando o método de gaseificação dinâmico com um eletrodo de oxigênio.*
[β] Taxa de consumo de glicose medida em fase de crescimento exponencial.

Y. lipolytica é uma levedura estritamente aeróbia, portanto, o oxigênio dissolvido é um fator limitante para seu crescimento e é um parâmetro crucial para ser correlacionado com seu crescimento e com a cinética de consumo de substrato. O método clássico do sulfito foi utilizado para medir o coeficiente volumétrico de transferência de massa de oxigênio (k_La) em todos os tipos de frascos aqui estudados, bem como no frasco Erlenmeyer com maior volume (500 mL), para fins comparativos. De acordo com os valores da Tabela 5.1, o cultivo em menor escala parece promover um incremento na taxa de transferência de oxigênio, que pode ser observado a partir de valores de k_La, quando comparados com os outros frascos de maior volume. Apesar de ser um método baseado em reação química e não ser um método dinâmico, parece verdade que as células foram capazes de usar esse suprimento extra de oxigênio, o qual se tornou menos limitante no meio cultivo, permitindo que a levedura consumisse glicose e crescesse mais rapidamente.

Em relação ao sistema de microplacas de 24 poços de 25 mL (24MTP/25mL) com 4 mL de meio de cultivo, houve uma redução de quase 3 vezes no valor k_La quando comparado com outros sistemas de cultivo miniaturizados. O reflexo desta redução pode ser observado no valor de -dS/dt (0,74 ± 0,02 mg/mL.h), o qual foi menor que o alcançado em 10EF, por exemplo. No entanto, mesmo com este menor valor de k_La, que estava mais próximo do frasco de Erlenmeyer (500 mL), a levedura apresentou consumo de glicose e cinética de crescimento mais rápidos. Neste caso, pode-se sugerir que, em contraste com a geometria cônica do frasco Erlenmeyer, a geometria quadrada dos poços 24MTP/25mL, cujos cantos atuam como defletores (HERMANN; LEHMANN; BÜCHS, 2003), promoveram uma dinâmica de agitação do líquido diferente e possivelmente uma melhor mistura.

5.1.2 Produção enzimática

O perfil de produção de lipase em diferentes sistemas de cultivo miniaturizado é apresentado na Figura 5.2 e o perfil do biorreator na Figura 5.4. Entre os sistemas miniaturizados, o cultivo em 10EF apresentou a melhor produtividade enzimática, conforme relatado na Tabela 5.1, e a maior produção durante todo o tempo de fermentação, conforme descrito na Figura 5.2. Além disso, a produção enzimática em 10EF começou mais cedo e apenas diminuiu após 36 h. No cultivo em microplacas, a produção só iniciou após 22 h para 24MTP/11mL e após 36h para 24MTP/25mL. 10EF e 24MTP/11 mL apresentaram atividade lipase máxima em 26 h (considerando o desvio padrão) e 32 h, respectivamente; já no cultivo em 24MTP/25mL o pico aconteceu em 36 h.

De acordo com o perfil de crescimento (Figura 5.1), a produção máxima de lipase por *Y. lipolytica* ocorre na fase estacionária (Figura 5.2 e 5.3), corroborando com trabalhos anteriores (ALONSO et al., 2005b; AMARAL et al., 2007; FICKERS; DESTAIN; THONART, 2009; PEREIRA-MEIRELLES et al., 2000). O pico de produção parece estar relacionado à concentração de glicose no meio de cultivo, que foi esgotado cerca de 6 h antes da produção máxima de lipase (20 h para 10EF e 1,5 L Biorreator, 24 h e 28 h para 24MTP / 11mL e 24MTP / 25mL, respectivamente) (dados não apresentados). Trabalhos anteriores mostraram um perfil típico da produção de lipase para *Y. lipolytica*, que sofre repressão na presença de glicose (PEREIRA-MEIRELLES; ROCHA-LEÃO; SANT'ANNA, 2000). De acordo com esse estudo, no início do crescimento celular, quando a concentração de glicose é alta, um nível basal de lipase é mantido e a lipase ligada às células é preponderante, apenas quando os níveis de glicose diminuem, a liberação de lipase aumenta (PEREIRA-MEIRELLES et al., 2000). Apesar disso observa-se no presente trabalho que há produção de lipase desde o início do cultivo, comportamento similar foi observado para esta cepa cultivada em biorreator (BRÍGIDA et al., 2014). Amaral et al. (2006) também detectaram atividade de lipase extracelular equivalentes, tanto em meio contendo glicose, quanto em meio contendo azeite de oliva como fonte de carbono.

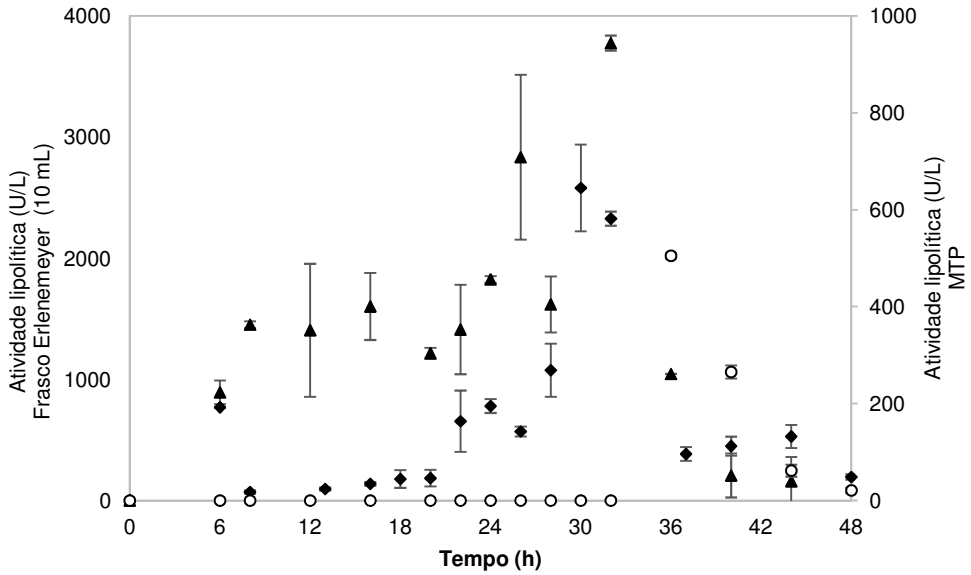


Figura 5.2 Perfil da produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* em diferentes sistemas miniaturizados. Os valores são dados como a média de três experimentos ± desvios-padrão. (▲) Erlenmeyer de 10 mL (10EF); (♦) microplaca de 24 poços de 11 mL (24MTP/11mL); (○) microplaca de 24 poços de 25 mL 24MTP/25mL.

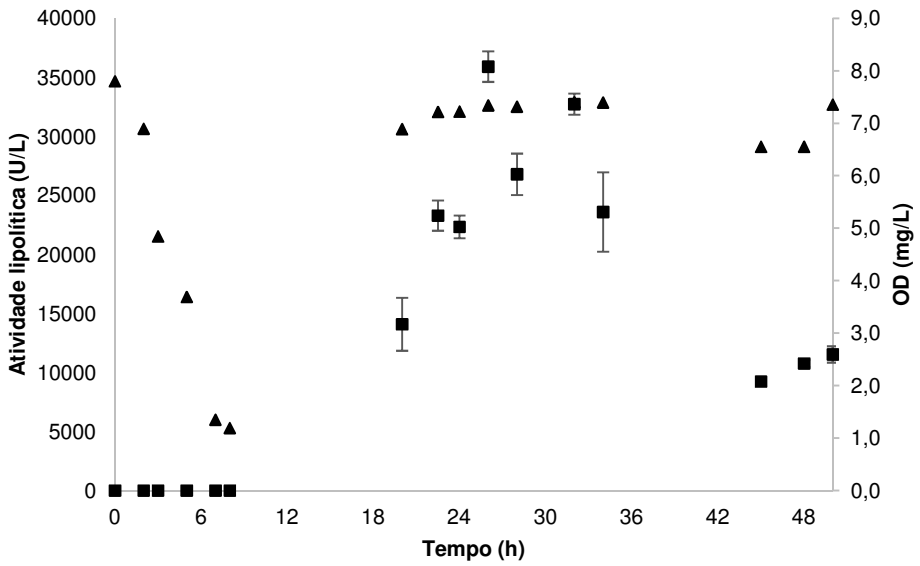


Figura 5.3 Perfil cinético da produção de lipase (■) e concentração de oxigênio dissolvido (OD) (▲) para o cultivo de *Yarrowia lipolytica* em 0,75 L de meio YPD em Biorreator de 1,5 L a 550 rpm e 1vvm.

Os níveis de lipase durante o cultivo também podem estar relacionados ao perfil de atividade proteolítica, que é apresentado na Figura 5.4. Segundo esses dados, os níveis crescentes de atividade proteolítica ocorrem até 20 h, provavelmente devido à fonte de nitrogênio (peptona bacteriológica e extrato de levedura). A redução dos níveis de protease coincide com a fase final da desaceleração e, provavelmente, com baixos níveis de nitrogênio no caldo. Após a redução da atividade proteolítica, é possível observar um novo aumento, coincidindo com a redução da atividade lipolítica. Isso indica que a lipase está sendo usada como fonte de carbono, uma vez que a glicose se encontra esgotada no meio de cultivo. Essas observações concordam com os resultados obtidos por Brígida et al. (2014) em cultivo em biorreator de 2 L.

O pH médio foi reduzido de 6 para 4, conforme a glicose foi consumida (Figura 5.1), e depois seguiu para valores próximos de 8. Este mesmo padrão também foi observado no cultivo em biorreatores de 1,5 L de *Y. lipolytica* para produção de lipase realizada no presente trabalho e em estudo anterior (CORZO; REVAH, 1999).

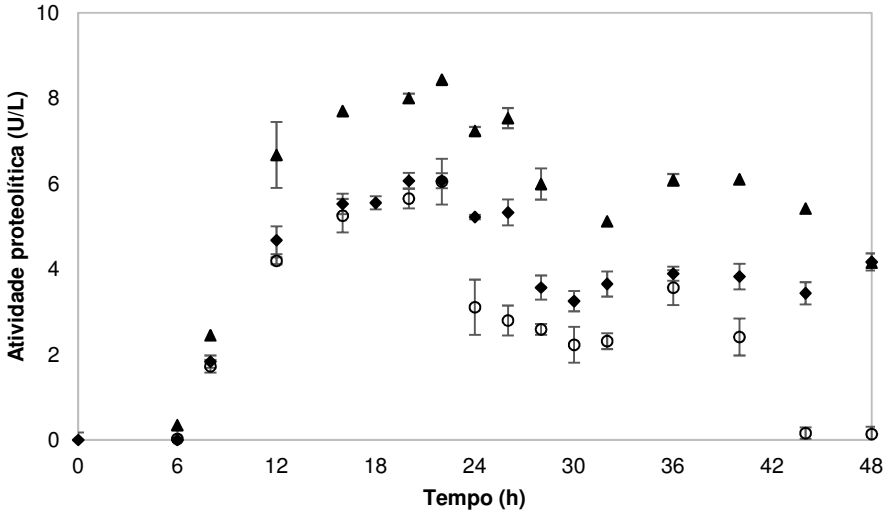


Figura 5.4 Efeito de diferentes sistemas miniaturizados sobre a atividade proteolítica de *Yarrowia lipolytica*. Os valores são dados como a média de três experimentos ± desvios-padrão**:** (▲) Erlenmeyer de 10 mL (10EF); (♦) microplaca de 24 poços de 11 mL (24MTP/11mL); (○) microplaca de 24 poços de 25 mL (24MTP/25mL).

A Tabela 5.1 também apresenta parâmetros de produção de lipase para os cultivos miniaturizadas, dos quais se pode verificar que, tanto a produtividade de lipase, como a produção máxima de lipase foram muito maiores em 10EF quando comparados aos resultados das microplacas. Valores semelhantes da atividade máxima de lipase foram obtidos para ambos os MTPs; no entanto, obteve-se maior produtividade volumétrica no cultivo de 24MTP/11 mL, uma vez que a exaustão de glicose e a atividade de lipase máxima ocorreram antes. Observando a Figura 5.2, apesar da diferença de magnitude dos valores, pode-se notar uma semelhança entre o perfil de produção de lipase de 10EF e 24MTP/11mL, em que um pico inicial de lipase foi detectado seguido por uma produção quase constante, até a atividade máxima de lipase. Quanto ao cultivo em 24MTP/25mL, a atividade da lipase foi detectada apenas na fase estacionária.

De acordo com os valores de k_La, 24MTP/25mL mostrou o menor coeficiente (47,3 h^{-1}), quase 2,5 vezes inferior ao determinado para os outros sistemas miniaturizados. Algumas explicações possíveis poderiam ser que, durante o consumo mais rápido de glicose, os níveis de oxigênio dissolvido (OD) eram limitantes para este cultivo, e logo após a exaustão de glicose, quando os níveis de OD foram restabelecidos, foi estabelecida uma condição favorável à produção de lipase. O k_La superior determinado para 10EF e 24MTP/11mL (129,4

e 122,9 h^{-1}, respectivamente), não permitiu que a OD atingisse os níveis limitantes durante a fase crítica do consumo de glicose e permitiu uma produção, mesmo nos níveis basais, da lipase durante todo o período cultivo. Esta hipótese pode ser suportada pelos resultados do consumo de glicose e dos níveis de OD obtidos por Brígida et al. (2014), que verificaram que os níveis de OD foram muito baixos durante a fase de consumo de glicose, e observaram ainda que quanto maior o k_La, menor a redução nos níveis de OD durante esta fase crítica. É importante enfatizar que o k_La aqui determinado para o MTP está de acordo com os resultados alcançados em estudos realizados pelo fabricante (DUETZ; WITHOLT, 2004).

Os resultados relatados na Tabela 5.1 também mostram que a produção máxima de lipase em 10EF foi cerca de 5,8 vezes maior que a obtida em 24MTP/11 mL, além da produtividade ter sido maior no frasco Erlenmeyer (Figura 5.2). Alguns estudos comprovam que uma maior concentração de oxigênio dissolvido em meio de cultura pode aumentar a produção de lipase por *Y. lipolytica* (ALONSO et al., 2005b; AMARAL et al., 2007). No entanto, é interessante observar que, de acordo com os dados derivados do método do sulfito, estes dois sistemas miniaturizados apresentaram valores de k_La muito parecidos nas condições estudadas, o que, de acordo com o mencionado acima, deveria garantir uma produção similar. Neste contexto, existem alguns pressupostos que podem ser levantados:

(i) o k_La é um parâmetro importante, no entanto, não parece ser o único fator limitante nesse caso, pode haver outros fatores físicos ou metabólicos que atuem.

(ii) a geometria do frasco e das microplacas são diferentes: o frasco Erlenmeyer tem um fundo redondo e dimensões do fundo superiores às microplacas, que por sua vez têm fundo quadrado, cujos vértices atuam como defletores, alterando a hidrodinâmica em relação ao frasco Erlenmeyer, podendo ser um elemento importante para explicar essa diferença.

Como o presente trabalho não objetivou descrever tais fenômenos de transporte, não é possível evidenciar diferenças nas características físico-químicas desses sistemas, como o regime de fluxo ou outros processos hidrodinâmicos.

Quando a produção de lipase foi realizada no frasco Erlenmeyer de 500 mL e 1000 mL (Amaral et al., 2007) nas mesmas condições de agitação e temperatura, obtiveram-se valores de produtividade reduzidos (Tabela 5.1). Com base nisso, é possível concluir que o cultivo miniaturizado melhorou a produtividade enzimática quando comparado à escala convencional do frasco agitado. O incremento mais pronunciado (41 vezes) ocorreu no cultivo 10EF, em que se obteve uma produtividade de 181,54 U/L.h. A atividade lipolítica máxima

alcançada neste trabalho foi de 3700 U/L, cerca de trinta vezes superior ao valor obtido em frasco Erlenmeyer de 500 mL e 1000 mL (100 e 180 U/L, respectivamente) (Amaral et al., 2006; Amaral et al., 2007). Observando o k_La na Tabela 5.1, pode-se dizer que a miniaturização do processo promoveu aumento na transferência de oxigênio (DUETZ; WITHOLT, 2000, 2001, 2004), com consequente melhora na produção enzimática.

O cultivo em um biorreator de 1,5 L mostrou a mesma taxa específica de crescimento (μ) para àquela alcançada em sistemas miniaturizados e um perfil similar de produção de lipase, principalmente quando comparado ao cultivo 10EF (Figura 5.2 e 5.3). No entanto, observou-se uma produção de lipase muito maior no cultivo em biorreatores (35904,74 U/L).

A cinética de crescimento e a produtividade de lipase em 10EF foi mais próxima da obtida em biorreator de 2 L a 550 rpm e vazão específica de ar de 1 vvm (μ = 0,30 h^{-1} e produtividade de lipase de 288 ± 21 U/L.h) (BRÍGIDA, et al., 2014). Esses resultados indicam que um aumento de escala diretamente de sistemas miniaturizados para biorreatores de escala de laboratório parece ser mais interessante do que aumentar progressivamente, uma vez que houve uma redução significativa desses parâmetros de cinética no cultivo de frascos agitados convencionais (Tabela 5.1), incluindo o k_La. Esta abordagem foi realizada com sucesso na produção de proteínas por outros autores, que partiram do cultivo em microplacas de 96 poços e extrapolaram para biorreatores (ISETT et al., 2007; KENSY; ENGELBRECHT; BÜCHS, 2009).

O k_La é um parâmetro importante em estudos de escala e foi aplicado como critério para escalonar um processo de fermentação otimizado em escala miniaturizada para reatores agitados mecanicamente (STR) de escala laboratorial e piloto (ISLAM et al., 2008). É interessante notar que o valor do k_La para o biorreator foi ligeiramente diferente do determinado para 10EF e 24MTP/11mL. Conforme mencionado acima, a produção de lipase por *Y. lipolytica* pode ser correlacionada com o k_La, portanto, esperava-se que essa similaridade pudesse garantir valores compatíveis de produção de lipase. Esta correlação, não necessariamente direta, entre os valores de k_La e a produção de lipase foi discutida por Alonso et al. (2005), que avaliaram a influência dos níveis de oxigênio, variando a frequência de agitação e a taxa de fluxo de aeração, na secreção de lipase. Os autores observaram que pode existir uma faixa de k_La ótimo para a produção de lipase, pois obteve-se uma produção máxima em valores de aeração e agitação intermediários.

A medida dos níveis de OD foi apenas possível para a fermentação em biorreator e os valores de k_La foram obtidos por um modelo químico; portanto, não há dados sobre a dinâmica da transferência e consumo de oxigênio durante o cultivo miniaturizado. Provavelmente isso poderia ajudar a explicar as diferenças na produção de lipase. Apesar disso, pode-se sugerir que os diferentes tipos de mecanismos de aeração e agitação desempenham um papel importante para assegurar um melhor fornecimento de oxigênio e uma condição de mistura mais adequada no cultivo em biorreatores, levando a maiores níveis de secreção de lipase por *Y. lipolytica*. Os cultivos realizados no frasco Erlenmeyer e nas MTP apresentam aeração superficial, enquanto que o biorreator possui aeração e agitação mecânicas.

Foram encontrados parâmetros de cultivo semelhantes, principalmente em relação a taxa específica de crescimento e produtividade de lipase, com os resultados de cultivo em biorreatores, obtidos por trabalhos anteriores para essa mesma linhagem de *Y. lipolytica*, mostrando que a realização de estudos de ampliação de escala diretamente da cultura miniaturizada parece ser uma proposta interessante. Em bioprocessos como este, para os quais o fornecimento de oxigênio é uma questão importante para melhorar a produtividade do processo, o uso do cultivo miniaturizado, que demonstrou melhores condições de transferência de oxigênio do que os frascos agitados em escala convencional, parece ser interessante em etapas exploratórias, dadas as vantagens de custo e tempo reduzidos.

5.2. PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO EM SISTEMA MINIATURIZADO

Para produção de ácido cítrico, os resultados obtidos neste presente trabalho foram comparados com aqueles obtidos por Da Silva *et al.* (2013), cujas condições de meio de cultivo e agitação foram as mesmas. *Yarrowia lipolytica* produz ácido cítrico e isocítrico simultaneamente; estes podem ser avaliados separadamente, porém com o objetivo de realizar um estudo preliminar, a quantificação destes ácidos separadamente não foi realizada neste trabalho. Sendo assim, os resultados aqui apresentados referem-se a mistura destes dois ácidos. Na produção de ácido cítrico e isocítrico (Figura 5.5), a concentração final de produto obtida foi de 19,98 g/L, a qual foi ligeiramente maior em relação à obtida por Da Silva *et al.* (2013) (17,86 g/L) em frascos agitados de 1 L com 400 mL de meio de cultivo (V_m/V_f = 0,4) e mesmas condições de agitação (250 rpm) utilizando glicerol puro como fonte de carbono. No presente trabalho foi obtida uma concentração de biomassa de 5,65 g/L ao final da

fermentação, a qual foi maior que a obtida por Da Silva *et al.* (2013) (aproximadamente 2 g/L). Somente na presença de glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel, concentração similar de biomassa (6,3 g/L) foi atingida, fato que foi atribuído à presença de impurezas presentes no glicerol bruto que podem ter desviado a via metabólica para o crescimento celular (DA SILVA et al., 2013). No presente estudo, o valor de pH final foi mais baixo (3,6) do que no trabalho de referência (4,06) (DA SILVA et al., 2013) uma vez que a produção de ácido foi maior.

É importante salientar que devido ao longo período de fermentação (96 horas), a perda de volume de meio por evaporação pode ter sido significativa, levando a superestimação os parâmetros avaliados. Apesar disso, foi novamente comprovada a possibilidade da redução de volume na produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica*.

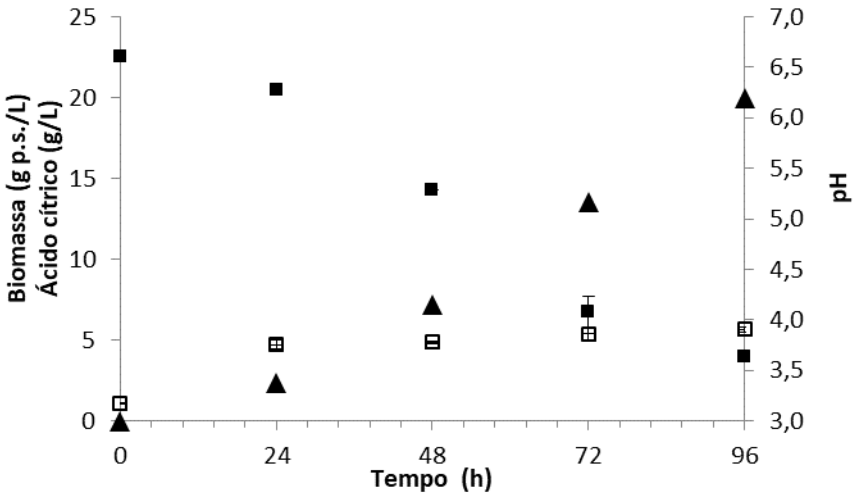


Figura 5.5. Cinética da produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* em frasco Erlenmeyer de 10 mL: (□) biomassa; (▲) ácido cítrico; (■) pH.

A miniaturização de ambos os sistemas de produção, lipase e ácido cítrico, mostrou-se efetiva para a realização dos estudos de fermentação extrativa subsequentes, representando redução de custos e tempo de trabalho na execução dos ensaios. As etapas subsequentes foram dedicadas a explorar a geração destes produtos e comportamento da levedura em sistemas aquosos bifásicos.

Capítulo 6

DETERMINAÇÃO DA TOLERÂNCIA DE *Yarrowia lipolytica* A COMPONENTES DOS SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS

6.1. POLIETILENOGLICOL E SAIS

O efeito de 15 sais e de polietilenoglicol (PEG) com diferentes massas molares (2000, 4000 e 6000) no crescimento de *Y. lipolytica* foi avaliado. A tolerância desta levedura a esses componentes é um importante requisito para a aplicação destes na formação de sistemas de duas fases aquosas a serem utilizados em processos de fermentação extrativa. Para tanto, foi realizado o teste de microdiluição em microplacas de 96 poços com volume final de 200 µL. Por ser realizado em pequeno volume, este teste possibilita a varredura de uma ampla faixa de concentração dos compostos de interesse, além da condução de vários ensaios simultaneamente. Através deste teste foi possível estabelecer a concentração máxima não tóxica (CMNT), sendo esta, a maior concentração onde foi observado crescimento ao longo de um gradiente de concentração. Analisando a Figura 6.1 é possível observar que, para os

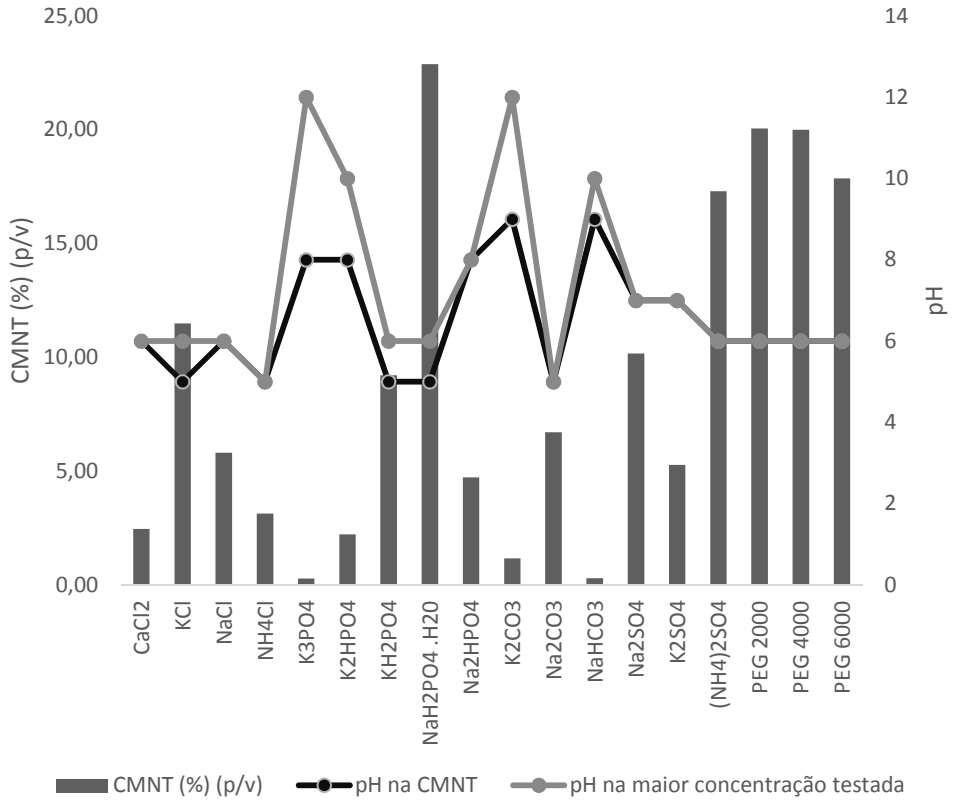


Figura 6.1 Valores de concentrações máximas não tóxicas (CMNT) de vários sais inorgânicos e PEG determinados para *Yarrowia lipolytica*, e variação de pH.

sais KCl, $NaH_2PO_4.H_2O$, Na_2SO_4 e $(NH_4)_2SO_4$, a levedura foi tolerante a concentrações maiores que 10 % (m/v), e para KH_2PO_4 a CMNT foi próxima a 10%. Em relação aos polímeros, a levedura foi tolerante a maior concentração testada 18 % para PEG 6000 e 20 % para PEG 2000 e 4000, ou seja, é possível que maiores concentrações não inibam seu crescimento.

Em geral os sais, cujo pH atingiu valores maiores que 8,0 na maior concentração testada, apresentaram valores de CMNT significativamente baixos. *Y. lipolytica* parece ser bastante suscetível a estes sais, e além do estresse osmótico causado por altas concentrações de sais, é possível que os valores altos de pH desempenhem um papel importante na inibição do crescimento desta levedura. Praphailong e Fleet (1997) avaliaram o efeito do pH, concentração de NaCl, entre outros componentes, no crescimento de 30 linhagens de leveduras deteriorantes de alimentos, dentre elas cinco cepas de *Y. lipolytica.* Na faixa de pH de 4,0-7,0, as cinco cepas de *Y. lipolytica* apresentaram crescimento expressivo, em pH 8,0 também foi verificado crescimento destas leveduras. Já em valores de pH iguais ou superiores a 9,0 não foi detectado crescimento. Confirmando assim, a hipótese de que para os casos onde o sal elevou o pH, este provavelmente foi um fator decisivo para a inibição do crescimento de *Y. lipolytica* no presente trabalho.

Na Tabela 6.1 encontram-se os componentes com maiores valores de CMNT, e nos quais a levedura cresceu na maior concentração testada, indicando, portanto, que são potencias componentes para a formação de SAB's.

Tabela 6.1. Componentes cuja concentração máxima testada não inibiu o crescimento de *Y. lipolytica.*

Composto	**CMNT (% m/v)**
KCl	>11,49
KH_2PO_4	>9,21
$NaH_2PO_4 .H_20$	>22,88
Na_2SO_4	>10,17
$(NH_4)_2SO_4$	>17,30
PEG 2000	>20,06
PEG 4000	>20,00
PEG 6000	>17,86

6.2. LÍQUIDOS IÔNICOS

Líquidos iônicos baseados no cátion colina foram testados quanto ao seu efeito inibitório do crescimento de *Y. lipolytica.* Esta família de líquidos iônicos, em especial os combinados com ânions aminoácidos, vêm sendo reconhecida e aceita como "praticamente inofensivos" ("*practically harmless"*) para uma série de micro-organismos e outros organismos aquáticos, além de apresentar eficiente biodegradabilidade (FOULET et al., 2016; GHANEMA et al., 2015; YAZDANI et al., 2016).

A biocompatibilidade do cátion colina representa o critério utilizado para a escolha desse grupo de líquidos iônicos como possíveis componentes de sistemas aquosos bifásicos, o mesmo se aplica aos ânions. Foram então sintetizados líquidos iônicos baseados em ânions alcanoatos de cadeia linear (acetato, butirato, hexanoato), benzoato, salicilato, aminoácidos, e o ânion inorgânico, dihidrogenofosfato. Este último vem sendo apontado na literatura como um líquido iônico promissor na estabilização de proteínas e outras biomoléculas (CONSTATINESCU; HERRMANN; WEINGÄRTNER, 2010; VRIKKIS et al., 2009).

Normalmente a literatura relacionada à toxicidade de líquidos iônicos tem como objetivo principal a investigação do potencial ecotoxicológico destes compostos, por isso os estudos trabalham com concentrações bem menores, de até 1000 mg/L, ou próximo disso. Isso porque pretendem atender aos limites de órgãos de referência ou estabelecidos na literatura sobre o tema (PASSINO; SMITH, 1987). As concentrações de teste foram determinadas com base na possível aplicação dos LI como componentes de sistemas aquosos bifásicos, para tal, é desejado que não haja efeito inibitório em altas concentrações, logo, as soluções de partida foram tão concentradas quanto foi possível solubilizar o LI. Em SAB, a concentração utilizada pode estar em torno de 10^5 mg/L.

Na Tabela 6.2 são apresentados os valores da concentração máxima não tóxica (CMNT) para 7 líquidos iônicos baseados em colina, dentre eles os compostos por ânions alcanoatos, salicilato, benzoato e dihidrogenofosfato. Dentre o grupo dos alcanoatos, pode-se estabelecer a seguinte ordem de toxicidade para os LIs estudados:

[Ch][Hex] > [Ch][But] > [Ch][Ac]

Estes resultados indicam que com o aumento da cadeia linear da porção aniônica, há um aumento no efeito tóxico destes compostos. Esta tendência já foi observada para outras

espécies de fungos do gênero *Penicillium* (PETKOVIC et al., 2010). Efeito similar já é bem reportado para a porção catiônica, em que foi observada alta correlação entre a toxicidade do líquido iônico frente a vários micro-organismos e o tamanho da cadeia lateral do cátion (CARSON et al., 2009; MEGAW; BUSETTI; GILMORE, 2013). Este fenômeno parece estar relacionado à hidrofobicidade/lipofilicidade do líquido iônico, como sugerido previamente por estudos que utilizaram o coeficiente de partição 1-ocatnol-água (log K_{ow}) para correlacionar com os dados de toxicidade. Este parâmetro funciona como uma simulação da partição dos compostos entre a água e as matrizes biológicas, sugerido que a possibilidade de permeabilidade pela membrana celular pode desempenhar um papel importante no mecanismo de toxicidade destes compostos (PETKOVIC et al., 2010; VENTURA et al., 2014).

Tabela 6.2 Valores de concentrações máximas não tóxicas (CMNT) para líquidos iônicos baseados em colina.

Componente	CMNT % (m/v)	CMNT (mg/L)	Limite superior (mg/L)	Limite inferior (mg/L)	pH na CMNT
[Ch][Ac]	5,62	56200	450000	439	7,64
[Ch][But]	2,5	25000	400000	390	6,25
[Ch][Hex]	0,175	1750	450000	439	5,86
[Ch][Sal]	5,62	56200	450000	439	6,22
[Ch][Bz]	5,62	56200	450000	439	6,71
[Ch][Lac]	2,81	28100	450000	439	8,22
[Ch][DHP]	22,5	225000	450000	439	5,04

Os limites superior e inferior referem-se a maior e a menor concentração testada no ensaio, respectivamente.

Os ânions salicilato ([Ch][Sal]) e benzoato ([Ch][Bz]) apresentaram o mesmo valor de CMNT. Esses dois ânions ocorrem naturalmente em certas plantas e apresentam estrutura química muito semelhante, diferindo apenas pela presença de uma hidroxila, sendo o ácido salicílico um produto derivado do ácido benzoico (LEE; LEON; RASKIN, 1995). Tal semelhança pode ser a razão do equivalente efeito inibitório.

A CMNT para o ânion lactato ([Ch][Lac]) foi um pouco menor do que a obtida para os dois ácidos citados anteriormente. Como pode ser observado na Tabela 6.2, o pH na CMNT foi bastante elevado, o que pode explicar parte do seu efeito tóxico, inviabilizando o crescimento da levedura em concentrações maiores do que a CMNT, como por exemplo em 5,62 % (m/v), cujo pH ficou em torno de 8,7 (dados não apresentados).

O líquido iônico colínico com menor toxicidade foi o [Ch][DHP] com CMNT igual a 22,5 % (p/v). Este foi o único líquido iônico composto por uma porção aniônica inorgânica, cuja estrutura química é relativamente simples. Alguns estudos que avaliaram o efeito tóxico de diversos ânions combinados com colina, também observaram que líquidos iônicos combinados com íons inorgânicos, como [Cl^-], por exemplo, apresentaram valores de concentração inibitória mais altos (PETKOVIC et al., 2010). Já o próprio [Ch][DHP] foi um dos compostos menos inibitórios do crescimento da bactéria marinha *Vibrio fischeri*, em um estudo de cunho ecotoxicológico (VENTURA et al., 2014).

Os aminoácidos compõem uma classe de substâncias orgânicas bastante abundante na natureza, possuem uma diversidade estrutural interessante e vêm sendo explorados como componentes aniônicos de líquidos iônicos. Na Tabela 6.3 são apresentados os valores da CMNT de 9 líquidos iônicos com cátion colina e aminoácidos como ânions. Os valores de CMNT para a maioria dos líquidos iônicos foi semelhante, com exceção de 3 líquidos iônicos em ordem crescente de toxicidade: [Ch][His] > [Ch][Gly] > [Ch][Gln]. Resultados tão semelhantes dificultam o estabelecimento de alguma resposta padrão em relação a estrutura destes compostos.

Tabela 6.3 Valores de concentrações máximas não tóxicas (CMNT) para líquidos iônicos baseados em colina e aminoácidos.

Componente	CMNT % (m/v)	CMNT mg/L	Limite superior (mg/L)	Limite inferior (mg/L)	pH na CMNT
[Ch][His]	0,625	6250	300000	195	7,50
[Ch][Gly]	0,81	8100	400000	253	7,89
[Ch][Gln]	0,94	9400	150000	146	8,62
[Ch][Ala]	1,25	12500	200000	195	8,81
[Ch][Asn]	1,25	12500	400000	390	8,57
[Ch][Asp]	1,25	12500	400000	390	8,36
[Ch][Pro]	1,25	12500	400000	390	8,51
[Ch][Glu]	1,25	12500	200000	195	6,96
[Ch][Ser]	1,25	12500	200000	195	8,99

Os limites superior e inferior referem-se a maior e a menor concentração testada no ensaio, respectivamente.

Estudos anteriores demonstraram que, de 18 líquidos iônicos colínicos compostos por ânions aminoácidos, o [Ch][Asp] e o [Ch][Glu] apresentaram menor efeito tóxico contra bactérias gram positivas e gram negativas (HOU et al., 2013). Neste estudo foi observada uma leve redução na atividade inibitória com a inclusão de um grupo hidroxila na cadeia lateral do aminoácido, o que pode ter ocorrido no caso do [Ch][Gln] e seu análogo com grupo amida [Ch][Glu]; porém, este mesmo comportamento poderia ser esperado entre [Ch][Asp] e seu análogo com grupo amida [Ch][Asn], os quais não apresentaram diferença na CMNT. Também tem sido observado que a presença de anel aromático no aminoácido pode aumentar a toxicidade do líquido iônico, como é o caso do [Ch][His], o qual se mostrou o mais tóxico dentre os avaliados para *Y. lipolytica*. A presença de um grupo imidazol na molécula de histidina, pode, de fato representar esse aumento na toxicidade, como demostrado em estudo prévio comparando líquidos iônicos com cátion imidazólio e colina (SANTOS et al., 2014). Valores de pH aferidos nas CMNT indicam que estes líquidos iônicos em maiores concentrações podem aumentar significativamente o pH do meio, o que pode resultar em um maior efeito tóxico para a levedura. Este fenômeno também foi discutido para bactérias quando na presença de líquidos iônicos baseados em [Ch][aminoácidos] (HOU et al., 2013).

Estudos recentes trabalharam com um faixa de concentração bem mais restrita do que a utilizada aqui, como, por exemplo: 130 – 1300 mg/L (YAZDANI et al., 2016) ou 1 – 2000 mg/L (RADOŠEVIĆ et al., 2016) para avaliação da ecotoxicidade destes compostos frente a bactérias e linhagens de células de peixe, respectivamente. Em vista disso, é possível perceber que, a princípio, *Y. lipolytica* apresenta uma tolerância significativa a esses líquidos iônicos, uma vez que os valores de CMNT são bem maiores do que a faixa de concentração citada. Essa alta tolerância da levedura *Y. lipolytica* à líquidos iônicos colínicos quando comparada com bactérias, foi constatada em um estudo anterior realizado pelo grupo (SANTOS et al., 2014).

Levando em consideração a magnitude dos valores normalmente estudados, a diferença de concentração entre o poço contendo a solução de 1,25 % (m/v) e o seguinte contendo 2,5 % (m/v), é bastante grande, talvez um estudo que explorasse essa faixa de concentração, pudesse demonstrar diferenças entre os valores de CMNT para estes líquidos iônicos.

Em vista da maior tolerância da levedura ao líquido iônico [Ch][DHP], este foi selecionado como possível componente dos SAB a serem estudados nas próximas etapas.

Capítulo 7

PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO E LIPASE POR FERMENTAÇÃO EXTRATIVA

7.1 ENSAIOS PRELIMINARES

Os ensaios de tolerância (Capítulo 6) permitiram a seleção dos sais e líquido iônico mais promissores para a composição dos sistemas aquosos bifásicos (SAB). Para os cultivos preliminares de ácido cítrico e lipase foram utilizados sistemas formados por PEG 2000 e os seguintes sais: $(NH_4)_2SO_4$, Na_2SO_4, KH_2PO_4, NaH_2PO_4; e o líquido iônico [Ch][DHP].

As condições inicialmente testadas foram 25 % (m/v) de PEG 2000 e 15 % (m/v) de sais. Tais concentrações foram escolhidas a partir da sobreposição de diagramas de fase reportados na literatura (GAO et al., 1991; GLYK; SCHEPER; BEUTEL, 2014; ZAFARANI-MOATTAR; SADEGHI, 2001), selecionando-se um ponto que contemplasse diversos sistemas aquosos bifásicos formados por PEG's de diferentes massas molares. Os SAB cujas curvas não foram encontradas na literatura serão apresentados no próximo tópico (7.2).

Na Figura 7.1 estão apresentados os dados de crescimento do cultivo de *Y. lipolytica* em sistema aquoso bifásico contendo meio para produção de lipase e meio de produção de ácido cítrico. O SAB formado por KH_2PO_4 e [Ch][DHP] não formou duas fases em meio de produção de lipase (YPD), por isso não há dados para tais sistemas. É possível observar que nas concentrações de 25% de PEG e 15% dos sais houve redução da biomassa em relação à concentração inoculada (1 g p.s./L). Além disso, não houve atividade de lipase em nenhum dos sistemas. Já no cultivo para produção de ácido cítrico houve produção deste, e os dados estão apresentados na Tabela 7.1.

É possível que o estresse osmótico provocado pelos componentes do SAB tenha inibido o crescimento de *Y. lipolytica,* alterando seu metabolismo e produção de lipase. Apesar da tolerância ter sido avaliada anteriormente, sabe-se que nos sistemas de duas fases aquosas existe um equilíbrio e distribuição dos componentes entre as duas fases, sendo a fase inferior rica em sal e a superior rica em PEG. Como a concentração de sal na fase inferior é maior do que 15% isso pode ter acentuado o estresse osmótico. Outro fator importante a ser considerado, é a diferença de condição do cultivo, já que nos ensaios de tolerância a cultura era estática e, no caso da fermentação, a agitação promove melhor homogeneização e contato com as células.

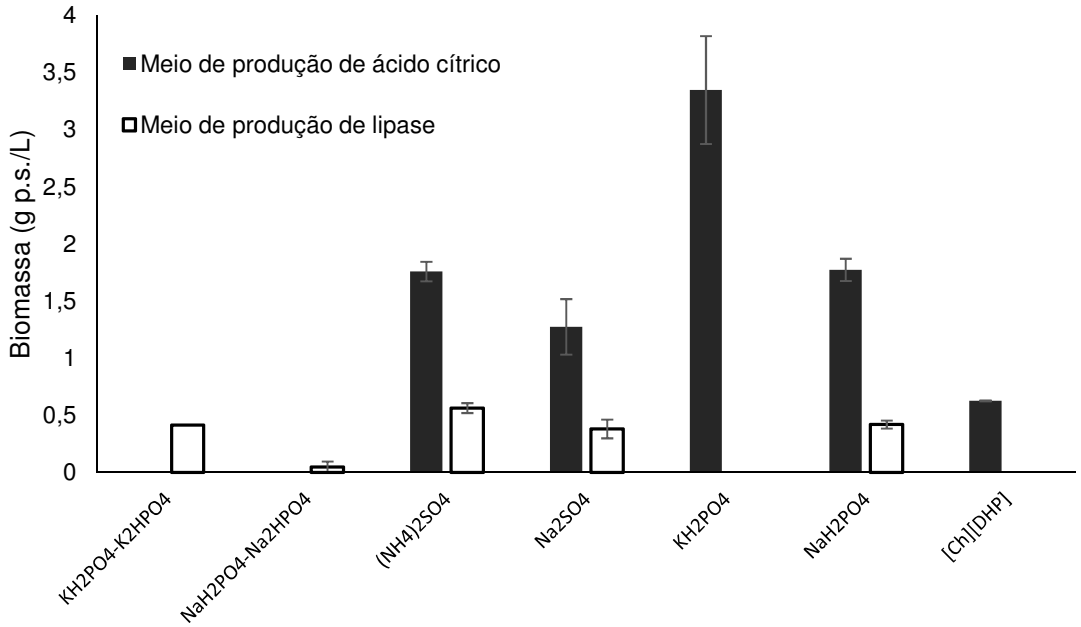


Figura 7.1 Dados de crescimento celular na fermentação extrativa contendo PEG 2000 25%/sal 15% (m/v) após 96h em meio de produção de ácido cítrico e após 26 h em meio de produção de lipase. A biomassa final no cultivo controle de lipase foi 20 ± 0,25 g p.s./L e no cultivo de ácido cítrico foi 4,03 ± 0,35 g p.s./L.

Tabela 7.1 Efeito de diferentes sais na produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* na presença de sistema aquoso bifásico formado por PEG 2000 (25 % m/v) e Sais (15% m/v), após 96 horas de cultivo.

Sal	**Biomassa (g p.s./L)**	**[Ácido cítrico]$_T$ (g/L)**		**[Ácido cítrico]$_F$ (g/L)**		**V_T/V_F**	**K_{AC}**	**η_F (%)**	**Ácido cítrico total (g/L)**	**$Y_{P/X}$**
		Média	**DP ±**	**Média**	**DP ±**					
$(NH_4)_2SO_4$	1,76	-	-	-	-	1,00	-	-	-	
Na_2SO_4	1,27	0,12	0,00	3,26	0,93	1,00	0,04	96,33	1,69	6,15
KH_2PO_4	3,35	1,66	-	6,22	-	1,80	0,27	67,49	3,29	1,40
NaH_2PO_4	1,77	-	-	1,99	0,02	1,50		100	0,79	1,03
[Ch][DHP]	0,63	0,01	0,01	0,27	0,08	9,00	0,05	70,29	0,04	0,06
Controle	4,03								19,98	6,60

K_{AC}: coeficiente de partição da lipase; V_T/V_F: razão volume de topo/volume de fundo; η_F: percentual de recuperação na fase de fundo; $Y_{P/X}$: rendimento de células em produto.

O efeito da presença adicional do PEG também não pode ser descartado. O PEG além de diminuir atividade de água, pode também atuar como surfactante, aumentando a permeabilidade celular (SHOW et al., 2012; SILVA et al., 2005) e entrada de íons no interior da célula, contribuindo para a acentuação do estresse osmótico. Em contrapartida, o aumento da permeabilidade celular também pode aumentar a excreção de produto para o meio de cultivo, o que seria vantajoso numa condição estável de crescimento e produção.

Menor efeito inibitório sobre o crescimento celular, na presença de 15% de sal, foi observado na produção de ácido cítrico, em que a biomassa variou de 1,27-3,35 g/L (Figura 7.1). O acúmulo intracelular de polióis (solutos compatíveis) tais como glicerol e arabitol é um dos mecanismos utilizados por leveduras em situações de alta pressão osmótica (TOKUOKA, 1993). Andreishcheva et al. (1999) estudaram alguns mecanismos de adaptação da cepa selvagem *Y. lipolytica* (Wick.) Van der Walt and Arx quando submetida a estresse salino (0,01-9% NaCl). Neste estudo foi observado que o aumento da concentração salina induziu o aumento do acúmulo intracelular de glicerol. Além disso, estudos vêm demonstrando a produção simultânea de eritritol, um poliol que também atua como soluto compatível, e ácido cítrico a partir de glicerol por cepas de *Y. lipolytica* (RYMOWICZ; RYWIŃSKA; GŁADKOWSKI, 2008; TOMASZEWSKA et al., 2014). Levando em consideração tais informações, sugere-se que nos experimentos de fermentação extrativa para produção de ácido cítrico, nos quais a concentração de sais foi de 15 %, a presença de glicerol no meio de cultivo e a possível produção de eritritol tenha favorecido a tolerância de *Y. lipolytica* em tais condições, e permitido seu maior crescimento e produção de ácido cítrico. Apesar do menor efeito inibitório de *Y. lipolytica* no cultivo de ácido cítrico, a produção foi bastante baixa em relação ao controle.

Em um sistema de fermentação extrativa ideal, busca-se a partição das células em uma fase e o produto em outra, para que assim haja redução do efeito inibitório do produto, otimização das etapas seguintes de purificação e fácil reciclo da fase de extração. Nos ensaios de fermentação extrativa com *Y. lipolytica,* tanto para a produção de lipase quanto para a produção de ácido cítrico, as células ficaram concentradas na interface do sistema, como observado na Figura 7.2. Não fica claro se a presença dessas células na interface, após sedimentação das fases, representa que elas, de fato, interagem com a interface do sistema bifásico; ou se seriam células que particionaram para a fase de topo e ao sedimentarem, ficam retidas entre as fases. Questionamento similar já foi levantado em trabalho anterior (DISSING; MATTIASSON, 1994). Independente da causa, o fato das células se acumularem

na interface pode significar uma vantagem, pois facilitaria a remoção tanto da fase de topo, quanto da fase de fundo, já que as células sedimentam entre as duas fases.

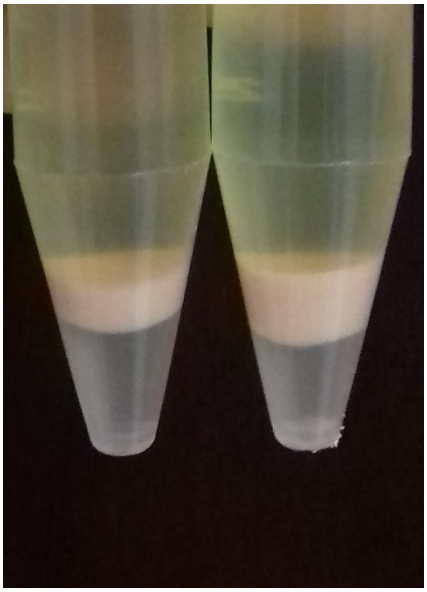


Figura 7.2 Células de *Y. lipolytica* localizadas na interface de sistemas aquosos bifásico após centrifugação.

Em vista do pronunciado efeito inibitório do crescimento da levedura em cultivo de lipase e baixa produçãfgho de ácido cítrico em concentração de sal de 15 %, foi necessário determinar uma nova composição para o SAB em que fosse possível a máxima redução da concentração de sal. Sendo assim, foram feitas algumas combinações entre os sais e PEG 2000 na ausência de células e decidiu-se partir da combinação de PEG 2000 (30 % m/v) e Sal (7% m/v). Os resultados estão apresentados nas Tabelas 7.2 e 7.3.

Analisando os resultados das Tabelas 7.2 e 7.3 fica evidente que o crescimento celular foi maior com a redução da concentração dos sais. O aumento da biomassa e produção de ácido cítrico e lipase com redução da concentração do sal e aumento da concentração de PEG deixa evidente que o fator toxicidade é muito mais determinado pelo componente salino. A redução na concentração de sal também proporcionou uma maior produção de ácido cítrico (Tabela 7.2). Kuboi et al. (1994) aplicaram PEG/fosfato de potássio na produção de subtilina por *Bacillus subtilis e* reportaram forte inibição do crescimento de *Bacillus subtilis* na presença de 15 % de fosfato, já o PEG 6000 não influenciou de maneira significativa o seu crescimento.

O meio contendo $(NH_4)_2SO_4$ para a produção de ácido cítrico foi o único no qual não houve produção do ácido. Neste sistema houve um crescimento expressivo de células,

resultado da alta disponibilidade de nitrogênio no meio. Segundo Papanikolaou *et al.* (2009), a produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica* ocorre quando a concentração de nitrogênio no meio de cultura é limitada.

Nas Tabelas 7.1 e 7.2 observa-se maior partição do ácido cítrico para a fase de fundo com $K_{AC} < 1$, porém seu rendimento de recuperação variou bastante de acordo com o tipo de sal e razão V_T/V_F. Na tabela 7.2 nota-se um leve aumento no coeficiente de partição do ácido cítrico para todos os sistemas, além de uma redução no rendimento de recuperação, principalmente para KH_2PO_4 e [Ch][DHP] ($\eta_F < 20\%$). Essas alterações podem ser resultado do aumento significativo do volume da fase de topo, como expresso pela razão V_T/V_F, uma vez que se aumentou a concentração de PEG e a de sal foi reduzida.

Nas duas condições avaliadas, o sistema com maior produção total de ácido cítrico foi o KH_2PO_4, o que pode ter ocorrido devido à maior densidade de células obtida. Esse sistema também apresentou alta concentração na fase de fundo com a redução da concentração de sal para 7%; porém devido ao pequeno volume de fundo, a recuperação (rendimento) foi baixa (Tabela 7.3). Já o sistema com melhor rendimento de recuperação, foi o que apresentou a segunda maior produção entre os SAB (Na_2SO_4), incluindo melhor $Y_{P/X}$.

Avaliando o comportamento da partição de ácido cítrico em relação aos íons, pode-se observar que os sais de sódio apresentaram maior prevalência do ácido na fase de fundo, seja pelo valor de K_{AC}, seja pelo rendimento de recuperação.

No geral, essa maior afinidade do ácido pela fase rica em sal pode ser devido a preferência do ácido pelo ambiente com mais carga. A fase de topo, rica em PEG possui caráter mais hidrofóbico, dificultando a migração das moléculas de ácido para essa fase. Esse mesmo comportamento já foi observado na extração de ácido lático em um sistema composto por um polímero neutro, como PEG ou hidroxietilcelulose (HEC) e polietilenimina (PEI), polímero catiônico (DISSING; MATTIASSON, 1994; KWON; KAUL; MATTIASSON, 1996). Há também na literatura alguns trabalhos que utilizam sais de citrato, tais como o citrato de sódio, como agentes "*salting out*" em sistemas aquosos bifásicos formados por polietilenoglicol (PERUMALSAMY; MURUGESAN, 2006; ZAFARANI-MOATTAR; SADEGHI; HAMIDI, 2004), demonstrando assim a razão da sua prevalência na fase pobre em PEG.

Tabela 7.2 Efeito de diferentes sais na produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* na presença de sistema aquoso bifásico formado por PEG 2000 (30 % m/v) e Sais (7 % m/v) após 96 horas de cultivo.

Sal	Biomassa (g p.s./L)		$[\text{Ácido cítrico}]_T$ (g/L)		$[\text{Ácido cítrico}]_F$ (g/L)		V_T/V_F	K_{AC}	$\eta_{F\,(\%)}$	Ácido cítrico total (g/L)	$Y_{P/X}$
	Média	DP ±	Média	DP ±	Média	DP ±					
$(NH_4)_2SO_4$	12,81	0,43	-	-	-	-	2,90	-	-	-	
Na_2SO_4	2,20	0,04	2,00	0,74	15,39	0,67	1,95	0,13	79,75	6,54	5,45
KH_2PO_4	5,85	0,65	10,38	0,54	25,60	0,33	10,60	0,41	18,88	11,69	2,41
NaH_2PO_4	4,63	0,05	2,19	-	17,87	-	4,40	0,12	64,93	5,10	1,41
[Ch][DHP]	1,74	0,39	0,46	0,10	3,32	0,49	39,00	0,14	15,58	0,53	0,72
Controle (sem duas fases)	4,03	0,35								19,98	6,60

K_{AC}: coeficiente de partição do ácido; V_T/V_F : razão volume de topo/volume de fundo; η_F: percentual de recuperação na fase de fundo; $Y_{P/X}$: fator de rendimento de ácido cítrico em relação a biomassa formada.

Tabela 7.3 Efeito de diferentes sais na produção de lipase por *Yarrowia lipolytica* na presença de sistema aquoso bifásico formado por PEG 2000 (30 % m/v) e Sais (7 % m/v) após 26 horas de cultivo.

Sal	Biomassa (g p.s./L)		$[\text{Lipase}]_T$ (U/L)		$[\text{Lipase}]_F$ (U/L)		V_T/V_F	K_L	$\eta_{T\,(\%)}$	Lipase total (U/L)
	Média	DP ±	Média	DP ±	Média	DP ±				
KH_2PO_4-K_2HPO_4 (pH 7,0)	6,55	0,18	698,16	88,86	315,09	1,06	5,0	2,22	91,7	634,32
NaH_2PO_4-Na_2HPO_4 (pH 7,0)	4,67	0,24	97,22	21,99	0,00		2,6	-	100,0	70,48
$(NH_4)_2SO_4$	2,53	0,18	157,18	34,34	82,22	12,96	6,3	1,91	92,3	146,84
Na_2SO_4	3,58	0,20	71,50	0,50	0,00		2,3	-	100,0	49,83
NaH_2PO_4	4,52	0,29	58,47	7,19	0,00		30,9	-	100,0	56,63
Controle (sem duas fases)	20,00	0,25								1231,06

K_L: coeficiente de partição da lipase; V_T/V_F : razão volume de topo/volume de fundo; η_T: percentual de recuperação na fase de topo.

Para produção de lipase (Tabela 7.3) foi observado um aumento considerável do crescimento celular em comparação a condição anterior (Figura 7.1), variando de 2,53 – 6,55 g p.s./L. Apesar do aumento, o crescimento foi bem menor quando comparado ao controle (ausência de duas fases). Em estudo realizado por Pandey e Banik (2011) utilizando PEG e dextrana em sistemas de duas fases aquosas para produção de fosfatase alcalina por *Bacillus licheniformis*, foi observado que a presença dos polímeros retardou a taxa de crescimento das células e deslocou a fase estacionária para um período mais tardio. Isso pode estar acontecendo no presente estudo; para confirmar tal observação será necessária a realização de um estudo cinético. Caso esteja acontecendo, esse retardo pode também afetar a produção de lipase, que foi bem menor do que no controle em todos os sistemas.

No que diz respeito ao coeficiente de partição da lipase (K_L), foi na presença de sais de fosfato de sódio e sulfato de sódio que se observou partição total da lipase para a fase superior (Tabela 7.3). Já as maiores concentrações de lipase foram obtidas na fase de topo dos sistemas compostos por tampão fosfato de potássio e sulfato de amônio. Observa-se pelos resultados expostos que apesar de ainda não alcançarem valores de crescimento e atividade de lipase equivalentes ao controle, os SAB aplicados à produção de lipase parecem mais promissores, vide a possibilidade de aumentar a produção em sistemas com partição total da lipase para a fase de topo e os bons rendimentos de recuperação para todos os sistemas. Optou-se por prosseguir os estudos de fermentação extrativa para a produção de lipase considerando também seu maior valor agregado. Os resultados de produção de lipase serão mais detalhadamente discutidos na seção 7.3 para melhor comparação com os dados obtidos para PEG de diferentes massas molares.

7.2 INFLUÊNCIA DOS COMPONENTES DO MEIO DE CULTIVO NO DIAGRAMA DE FASE

Nos ensaios de fermentação extrativa de ácido cítrico e lipase, foi observada uma diferença significativa na formação de sistemas bifásicos compostos pelas mesmas concentrações de PEG e Sal. Essa diferença está evidenciada nos valores de razão V_T/V_F expressos nas Tabelas 7.2 e 7.3. Além disso, os sistemas formados por PEG/[Ch][DHP] não formaram duas fases em meio YPD, nas concentrações avaliadas. Uma diferença importante na composição dos meios de cultivo YPD e de produção de ácido cítrico é que esse último é

um meio salino, cujos componentes majoritários são (em % (m/v): KH_2PO_4 (1,2 %); Na_2HPO_4 (1,18%); e glicerol (3%).

Diagramas de fase para a determinação do equilíbrio líquido-líquido de sistemas aquosos bifásicos são construídos utilizando água. Supondo que a presença de outros eletrólitos e do glicerol pudesse estar alterando o equilíbrio dessas fases, alguns pontos da curva foram determinados não só em água, mas também na presença desses 3 componentes majoritários. Para tanto, as concentrações desses 3 componentes foram mantidas como no meio de cultivo.

Na Figura 7.3 encontram-se os diagramas de fase dos sais utilizados na fermentação extrativa de ácido cítrico com PEG 2000, em água e com os componentes do meio de cultivo citados acima. Foram construídos também dois diagramas ainda não encontrados na literatura: PEG 2000/Na_2SO_4 e PEG 2000/[Ch][DHP].

É possível observar um deslocamento das curvas em direção à origem quando na presença dos componentes do meio de cultivo, resultado numa expansão da região bifásica. Isso explicaria porque alguns sistemas não formaram duas fases com o meio YPD e também porque há uma diferença entre as razões V_T/V_F dos dois meios de cultivo. Fenômeno similar já foi reportando por Merchuk et al. (1998) ao determinar os diagramas de fase dos sistema PEG4000/fosfato com a adição de diferentes concentrações de NaCl, cujo deslocamento em direção a origem foi maior, quanto maior a concentração de NaCl.

Essas observações ressaltam que a influência adicional da presença de um outro sal não deve ser ignorada, uma vez que em certas concentrações pode produzir um deslocamento na posição da curva binodal e alterar o equilíbrio entre as fases. Isto deve ser levado em consideração, principalmente quando se trabalha com SAB em meios de cultivo salinos.

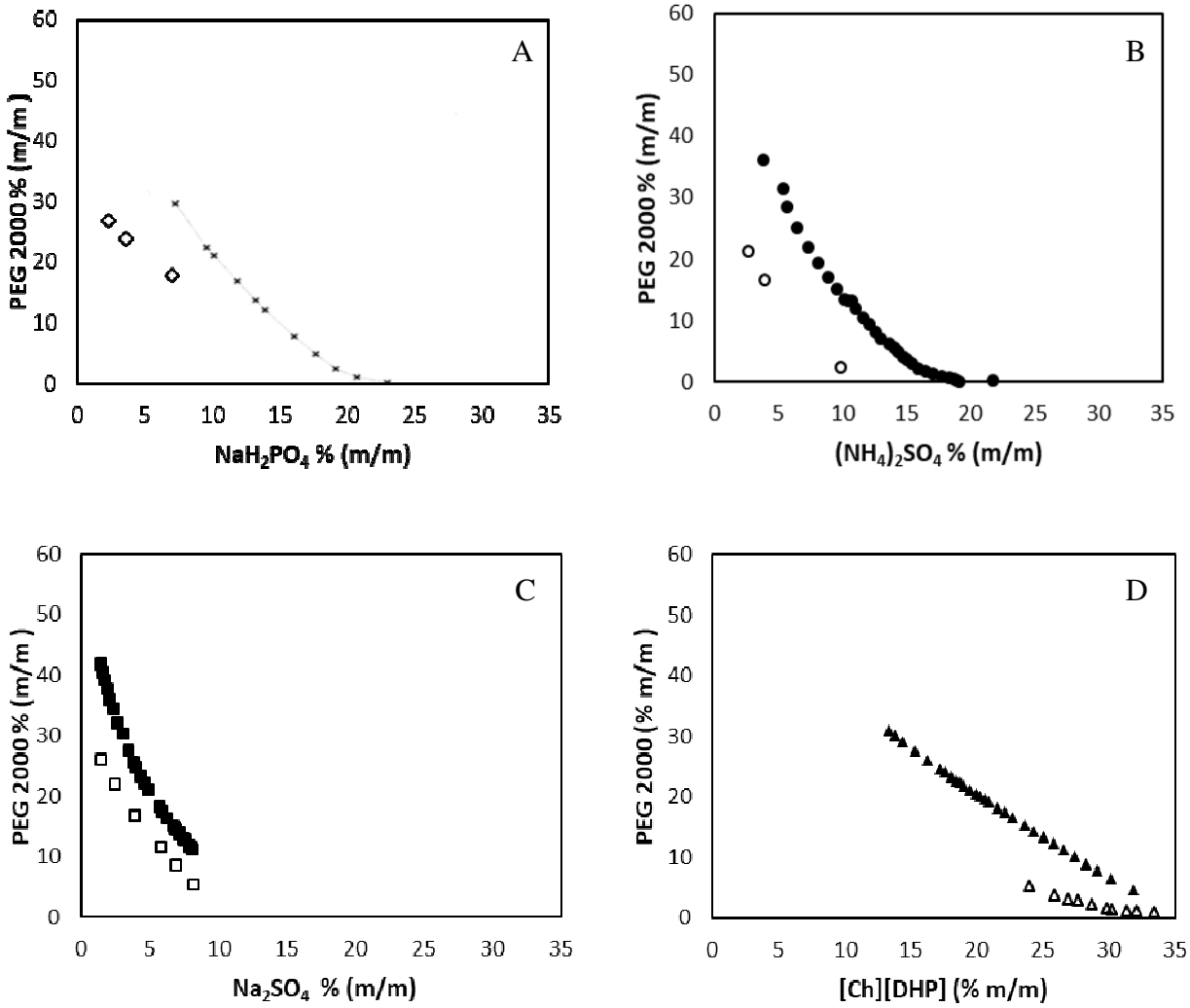


Figura 7.3 Diagramas de fase para os sistemas formados por (A) (B) (C) PEG 2000 e sais, (D) PEG 2000 e [Ch][DHP], todos a 25°C. (A) diagrama de fase para PEG 2000/NaH_2PO_4 (-x-) em água (ZAFARANI-MOATTAR; SADEGHI, 2001); (◊) com componentes majoritários do meio de cultivo. (B) diagrama de fase para PEG 2000/$(NH_4)_2SO_4$ (●) em água (PENG; LI; LI, 1994); (○) com componentes majoritários do meio de cultivo. (C) diagrama de fase para PEG 2000/Na_2SO_4 (■) em água; (□) com componentes majoritários do meio de cultivo. (D) diagrama de fase para PEG 2000/[Ch][DHP] (▲) em água; (Δ) com componentes majoritários do meio de cultivo.

7.3 INFLUÊNCIA DA MASSA MOLAR DO POLIETILENOGLICOL NA PRODUÇÃO DE LIPASE POR FERMENTAÇÃO EXTRATIVA

Foram conduzidos ensaios de fermentação extrativa na presença de diferentes massas molares de PEG (2000, 4000, 6000) afim de avaliar seu efeito no crescimento celular, produção e partição da lipase produzida por *Y. lipolytica.* Os dados de biomassa encontram-se na Tabela 7.4.

Através dos resultados de crescimento celular nota-se que de uma maneira geral não houve mudança significativa entre os diferentes PEGs, demonstrando que o aumento na massa molar do polímero não influenciou o crescimento de *Y. lipolytica*. Corroborando com os dados obtidos no ensaio de tolerância, previamente realizados. Somente no sistema PEG 6000/ KH_2PO_4-K_2HPO_4 (pH 7,0) houve uma redução na biomassa após 26 horas de cultivo em relação aos outros PEG (2000 e 4000). Não foi possível determinar a causa desse fenômeno, já que os outros sistemas não seguiram esse mesmo comportamento.

Um fator crucial para a homeostase celular envolve a manutenção da concentração ótima de íons no ambiente intracelular. É sabido que a concentração de K^+ no interior das células é maior do que no ambiente natural, ao contrário do cátion Na^+, que é tóxico para as células e quando em contato com ambientes ricos em sódio as leveduras despendem bastante energia para manter a baixa concentração de sódio no citoplasma. A concentração ideal é mantida através de proteínas presentes na membrana plasmática que promovem o efluxo de cátions em excesso, principalmente o sódio. Normalmente as leveduras apresentam dois tipos principais de antiportadores na membrana plasmática Na^+/ATPases e Na^+/H^+ (KINCLOVÁ; POTIER; SYCHROVÁ, 2002).

Tabela 7.4 Influência da massa molar do PEG (30 % m/v) combinado com diferentes sais (7 % m/v) no crescimento de *Y. lipolytica* em meio de cultivo para produção de lipase por fermentação extrativa.

PEG	Sal	Biomassa (g p.s./L)	
		Média	**DP ±**
2000	KH_2PO_4-K_2HPO_4 (pH 7,0)	6,55	0,18
	NaH_2PO_4-Na_2HPO_4 (pH 7,0)	4,67	0,24
	$(NH_4)_2SO_4$	2,53	0,18
	Na2SO4	3,58	0,20
	NaH_2PO_4	4,52	0,29
Controle (sem duas fases)		20,00	0,25
4000	KH_2PO_4-K_2HPO_4 (pH 7,0)	6,89	0,34
	NaH_2PO_4-Na_2HPO_4 (pH 7,0)	4,46	0,24
	$(NH_4)_2SO_4$	4,11	0,21
	Na2SO4	4,26	0,34
	NaH_2PO_4	5,57	0,19
Controle (sem duas fases)		15,20	1,00
6000	KH_2PO_4-K_2HPO_4 (pH 7,0)	3,62	0,19
	NaH_2PO_4-Na_2HPO_4 (pH 7,0)	4,72	0,20
	$(NH_4)_2SO_4$	3,63	0,28
	Na2SO4	3,82	0,53
	NaH_2PO_4	5,51	0,29
Controle (sem duas fases)		16,01	0,30

Ensaios realizados por 26 horas.

Um estudo revelou que *Y. lipolytica* foi o primeiro exemplo de levedura a expressar e possuir na membrana plasmática dois antiportadores de cátion metal alcalino/H^+ diferentes, sendo um deles responsável pela extrusão de cátions tóxicos de sódio, e o outro por manter a homeostase celular graças a sua habilidade de exportar especificamente K^+ das células e assim regular o conteúdo de potássio, pH intracelular e volume celular (PAPOUSKOVA; SYCHROVA, 2006). Talvez isso possa ser a explicação para a maior tolerância da levedura ao SAB contendo potássio. Papouskova e Sychrova (2006) também observaram que *Y. lipolytica* W29 tolerou maiores concentrações de sais contendo potássio, no caso o KCl (2,5M), do que o sal equivalente contendo sódio, NaCl (1,75 M).

As Tabelas 7.5 e 7.6 apresentam os resultados referentes a produção de lipase nos SAB estudados. É importante salientar que a Tabela 7.6 complementa os resultados obtidos, apresentado o valor de produção volumétrica global, ou seja, o que foi produzido no sistema

como um todo, considerando o que se encontra concentrado na fase de topo e na fase de fundo, em relação ao volume total do cultivo. Em alguns casos o coeficiente de partição não foi quantificado, uma vez que não foi detectada atividade de lipase na fase de fundo. Esse fenômeno ocorreu na maioria dos casos, com exceção dos SAB formados por PEG/KH_2PO_4-K_2HPO_4 (pH 7,0), PEG 2000/$(NH_4)_2SO_4$, PEG 4000/NaH_2PO_4-Na_2HPO_4 (pH 7,0). Dos sistemas em que a atividade de lipase foi quantificada na fase de fundo e na fase de topo simultaneamente, o que apresentou maior coeficiente de partição, assim como, maior atividade da lipase na fase de topo, foi o sistema formado por PEG 2000/KH_2PO_4-K_2HPO_4 (pH 7,0), com 698,16 U/L na fase de topo. Este SAB também apresentou maior produção total de lipase (Tabela 7.6) e essa tendência se manteve também com o aumento da massa molar do PEG, quando comparado com os outros sais. Talvez o favorecimento na produção de biomassa observada para esse sistema (Tabela 7.4) possa ter resultado em uma maior produção da enzima.

É importante salientar que a literatura disponível sobre estudos de fermentação extrativa utilizando SAB ainda é muito reduzida, e mais ainda quando se trata especificamente da produção de lipase. Maior acervo pode ser encontrado quando o assunto é extração de lipase do meio de cultivo utilizando SAB. Diferente de um estudo de extração, em que todos os sistemas estudados contêm a mesma concentração inicial de enzima, a fermentação extrativa é um processo extremamente dinâmico, em que a concentração de lipase vai variar entre os sistemas, assim como a concentração de células e contaminantes. Isso implica na necessidade de uma comparação cuidadosa entre os dados disponíveis na literatura, principalmente em relação aos dados de extração, que se torna inevitável, dada sua maior disponibilidade e aprofundamento.

Ao analisar a influência da massa molar dos PEG's em relação à produção de lipase, tem-se que, de uma forma geral, há uma redução na produção de lipase conforme há o aumento da massa molar do PEG. Estudos prévios reportaram comportamento parecido na produção de uma enzima hidrolisadora de gelana e protease alcalina por *Bacillus thuringiensis* em SAB compostos por PEG/fosfato de potássio (BANIK; SANTHIAGU, 2002; HOTHA; BANIK, 1997). O aumento na massa molar do polímero aumenta a viscosidade do meio de cultivo (KIRINCIC; CVETO, 1998), este aumento pode limitar a transferência de oxigênio afetando o metabolismo celular e reduzindo a produção de lipase.

Tabela 7.5 Efeito de diferentes sais e massa molar de PEG na partição da lipase produzida por *Yarrowia lipolytica* na presença de sistema aquoso bifásico formado por PEG (30 % m/v) e Sais (7 % m/v) após 26 horas de cultivo.

PEG	Sal	Fase de Topo					Fase de fundo					K_L	K_P	K_{AE}	V_T/V_F	η_T
		$Lipase_T$ (U/L)		$Proteína_T$ (mg/mL)		AEL_T	$Lipase_F$ (U/L)		$Proteína_F$ (mg/mL)		AEL_F					
		Média	DP ±	Média	DP ±	(U/mg)	Média	DP ±	Média	DP ±	(U/mg)					
2000	KH_2PO_4-K_2HPO_4 (pH 7,0)	698,16	88,86	0,077	0,004	9,05	315,09	1,06	0,365	0,002	0,86	2,22	0,21	10,47	5,00	91,7
	NaH_2PO_4-Na_2HPO_4 (pH 7,0)	97,22	21,99	0,053	0,006	1,84	0	-	0,272	0,022	-	-	0,19	-	2,64	100
	$(NH_4)_2SO_4$	157,18	34,34	0,054	0,001	2,90	82,22	12,96	0,101	0,002	0,81	1,91	0,53	3,58	6,25	92,3
	Na_2SO_4	71,50	0,50	0,052	0,001	1,36	0	-	0,130	0,010	-	-	0,40	-	2,30	100
	NaH_2PO_4	58,47	7,19	0,054	0,005	1,09	0	-	0,237	0,010	-	-	0,23	-	30,85	100
4000	KH_2PO_4-K_2HPO_4 (pH 7,0)	158,37	12,48	0,077	0,000	2,07	101,57	15,66	0,417	0,000	0,24	1,56	0,18	8,47	2,80	81,4
	NaH_2PO_4-Na_2HPO_4 (pH 7,0)	23,45	8,95	0,068	0,002	0,34	14,01	2,39	0,348	0,000	0,04	1,67	0,20	8,53	2,45	80,4
	$(NH_4)_2SO_4$	53,34	13,24	0,065	0,000	0,82	0	-	0,188	0,008	-	-	0,35	-	1,79	100
	Na_2SO_4	28,88	2,90	0,063	0,003	0,46	0	-	0,175	0,002	-	-	0,36	-	2,12	100
	NaH_2PO_4	0	-	0,059	0,001	-	0	-	0,391	0,007	-	-	0,15	-	5,33	-
6000	KH_2PO_4-K_2HPO_4 (pH 7,0)	189,84	12,07	0,072	0,001	2,65	471,58	3,57	0,347	0,005	1,36	0,40	0,21	1,95	2,90	53,9
	NaH_2PO_4-Na_2HPO_4 (pH 7,0)	29,65	0,77	0,054	0,004	0,55	0	-	0,303	0,006	-	-	0,18	-	2,25	100
	$(NH_4)_2SO_4$	70,25	12,00	0,060	0,006	1,18	0	-	0,146	0,017	-	-	0,41	-	1,92	100
	Na_2SO_4	80,66	2,10	0,074	0,002	1,09	0	-	0,152	0,006	-	-	0,49	-	2,08	100
	NaH_2PO_4	0	-	0,061	0,001	-	0	-	0,355	0,015	-	-	0,17	-	5,33	-

AEL: atividade específica de lipase; K_L: coeficiente de partição da lipase; K_P: coeficiente de partição das proteínas; K_{AE}: coeficiente de partição da atividade específica de lipase; V_T/V_F : razão volume de topo/volume de fundo; η_T: percentual de recuperação na fase de topo. As letras T e F subscritas referem-se a fase de topo e fase de fundo, respectivamente.

Tabela 7.6 Efeito de diferentes sais e massa molar de PEG na produção de lipase total por produzida por *Yarrowia lipolytica* na presença de sistema aquoso bifásico formado por PEG (30 % m/v) e Sais (7 % m/v) após 26 horas de cultivo.

PEG	Sal	Lipase total (U/L)	Proteína total (mg/mL)	AEL (U/mg)
	KH_2PO_4-K_2HPO_4 (pH 7,0)	634,32	0,125	5,07
	NaH_2PO_4-Na_2HPO_4 (pH 7,0)	70,48	0,113	0,62
2000	$(NH_4)_2SO_4$	146,84	0,061	2,42
	Na_2SO_4	49,83	0,076	0,66
	NaH_2PO_4	56,63	0,060	0,95
Controle (sem duas fases)		1231,06	0,091	13,57
	KH_2PO_4-K_2HPO_4 (pH 7,0)	143,42	0,166	0,86
	NaH_2PO_4-Na_2HPO_4 (pH 7,0)	20,71	0,149	0,14
4000	$(NH_4)_2SO_4$	34,19	0,109	0,31
	Na_2SO_4	19,63	0,099	0,20
	NaH_2PO_4		0,111	-
Controle (sem duas fases)		1352,74	0,074	18,16
	KH_2PO_4-K_2HPO_4 (pH 7,0)	262,08	0,142	1,84
	NaH_2PO_4-Na_2HPO_4 (pH 7,0)	20,53	0,131	0,16
6000	$(NH_4)_2SO_4$	46,22	0,089	0,52
	Na_2SO_4	54,50	0,099	0,55
	NaH_2PO_4		0,108	0,00
Controle (sem duas fases)		1005,10	0,062	16,31

No que diz respeito à influência da massa molar do PEG no coeficiente de partição, pode-se notar que para o SAB formado por PEG/KH_2PO_4-K_2HPO_4 (pH 7,0) ocorreu uma inversão do $K_{L,}$ à medida que a massa molar do polímero aumentou, com valores de $K_L < 1$ no sistema formado por PEG 6000 (Tabela 7.5). A redução do coeficiente de partição com o aumento da massa molar do PEG também foi observada por Ooi et al. (2011) ao investigar a produção de lipase por *Burkholderia pseudomallei* em sistemas aquosos bifásicos compostos por PEG e dextrana. Esta tendência também foi observada em estudos de fermentação em SAB para produção de outras enzimas, tais como enzima hidrolisadora de gelana (BANIK; SANTHIAGU, 2002) e protease alcalina (HOTHA; BANIK, 1997). Na literatura têm se

verificado que uma das forças que atuam na partição de enzimas é a exclusão por volume, em que a proteína é, de fato, expulsa do meio rico em PEG, dado o espaço disponível em solução para a proteína (MARINI et al., 2011). Dessa maneira, há uma tendência de diminuição do K_L em função do aumento da massa molar do PEG, em concordância com o aumento do efeito de exclusão por volume, resultando na transferência da enzima para a fase rica em sal. Este fenômeno não foi observado para todos os sais estudados. A literatura, de fato, dispõe de muito mais estudos com SAB de fosfatos. Neste caso, pode-se sugerir que a intensidade desse efeito pode ter sido reduzida para os outros sais, devido à reduzida concentração de enzima nos sistemas com PEG 4000 e 6000.

Os valores de K_L evidenciam a enzima tende a particionar para a fase rica em PEG. No presente estudo não foram realizadas determinações de parâmetros termodinâmicos, porém através de estudos prévios pode-se sugerir o tipo de interação que ocorre entre a lipase e a fase do PEG. Na literatura, tem sido reportado que de acordo com o aspecto termodinâmico do processo de partição pode-se sugerir se a interação entre as moléculas de PEG e proteína são governadas por interações hidrofóbicas ou por interações eletrostáticas. Alguns trabalhos com uma abordagem mais termodinâmica determinaram a mudança de entalpia e entropia associadas ao processo de partição de lipases em sistemas formados por PEG/fosfato pH 7,0 variando-se a massa molar do polímero. Os resultados indicam que para sistemas com PEG entre 2000 e 8000, a partição da lipase é governada pelo fator entálpico e apresenta mudança de entropia negativa, sugerindo a predominância de interações eletrostáticas e a formação de um complexo polímero-proteína (BASSANI et al., 2007; MARINI et al., 2011). Independe do tipo de interação que governe a partição da proteína para a fase do PEG, seja ela predominantemente hidrofóbica ou eletrostática, há a redução do coeficiente de partição da proteína com o aumento da massa molar do PEG como um resultado do efeito estérico dos PEGs de maior massa molar (NERLI; ESPARIZ; PICÓ, 2001).

Apesar de vários sistemas apresentarem maior eficiência na partição da lipase, com partição total e rendimento de 100% na recuperação da lipase para a fase de topo, a fermentação extrativa, diferente de uma simples extração, trata-se de um processo que depende do bom funcionamento metabólico da levedura, não só da eficiente extração da molécula. De alguma forma esses sais não permitiram a produção de lipase, como em outros sistemas, a exemplo do PEG 2000/KH_2PO_4-K_2HPO_4 (pH 7,0). A razão disso é desconhecida, e não existem trabalhos que avaliem de que forma a presença de sais inorgânicos podem influenciar na síntese de lipase, pelo menos não em concentrações altas, como as utilizadas

em SAB. Alguns trabalhos ainda avaliam este efeito, mas no que diz respeito à presença desses sais como micronutrientes do meio de cultivo (TAN et al., 2003). Poderia ser levantada a hipótese dos sais de sódio afetarem a atividade da lipase que estivesse particionada na fase de fundo, porém estudos prévios reportaram atividade de lipase preferencialmente na fase de fundo em sistemas com esses sais e PEG 6000 (NANDINI; RASTOGI, 2011).

Um dos requerimentos para uma purificação efetiva em sistemas aquosos bifásicos é que as proteínas contaminantes não sejam extraídas na mesma fase da proteína alvo. Em vista disso, a proteína total particionada em cada fase foi quantificada e os resultados estão apresentados nas Tabelas 7.5 e 7.6. Para evitar interferência dos componentes do SAB na técnica de quantificação das proteínas (Bradford), as recomendações do fabricante foram seguidas em relação à concentração de sais permitida, realizando-se a diluição necessária. Para o PEG, as diluições foram baseadas em um estudo prévio, que investigou a influência desse componente na quantificação de proteínas pela técnica de Bradford (BARBOSA et al., 2011). Em todos os casos obteve-se $K_p < 1$, demonstrando que a maior parte das proteínas presente no meio foram distribuídas para a fase de fundo. Observa-se uma tendência de aumento do K_p para os sais SO_4^{-2}, o que significa maior efeito "*salting-out*" desses ânions. Esta observação pode ser atribuída a localização desse ânion no ranking da série Hofmeister. A série Hofmeister estabelece uma ordem qualitativa do efeito de diferentes sais na solubilidade de proteínas e foi primeiramente reportada de uma forma sistemática por Franz Hofmeister em 1888 (HOFMEISTER, 1888 apud YANG, 2009). Para proteínas, a eficiência na precipitação ("*salting-out*")/solubilização ("*salting-in*") dos ânions, diminui/aumenta de acordo com a seguinte ordem:

$$SO_4^{2-} > HPO_4^{2-} > F^- > Cl^- > Br^- > I^- > No^{3-} > ClO^{4-} > SCN^- .$$

O ânion sulfato apresenta efeito "*salting-out*" mais forte do que o ânion HPO_4^{2-}. Este comportamento também pode ser constatado através da diferença entre as razões V_T/V_F dos sistemas formados por Na_2SO_4 e NaH_2PO_4, que, em geral, foi bem maior para o fosfato do que para o sulfato. Sendo assim, os sistemas com sais fosfato se mostraram mais promissores quanto a seletividade na recuperação da lipase para a fase de topo.

Dessa maneira, o sistema cuja massa molar do PEG gerou melhores resultados tanto de produção total de lipase, quanto de partição da lipase para a fase de topo, foram os sistemas com PEG 2000, com destaque para o sistema PEG 2000/KH_2PO_4-K_2HPO_4 (pH 7,0). A Tabela 7.6 mostra, inclusive, que esse foi o sistema com melhores resultados em relação à atividade

específica de lipase. Outros estudos com PEG/fosfato de potássio também obtiveram melhores resultados de separação de lipase com PEG 2000 ou de massa molar próxima, como PEG 1500 (ANVARI, 2015; BASSANI et al., 2010; PADILHA et al., 2012; ZHOU et al., 2013).

7.4 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO TAMPÃO FOSFATO DE POTÁSSIO NA PRODUÇÃO DE LIPASE POR FERMENTAÇÃO EXTRATIVA

A partir da escolha dos sistemas PEG/KH_2PO_4-K_2HPO_4 (pH 7,0) foram feitos ensaios para avaliar a influência da concentração do tampão respeitando os limites de tolerância estabelecidos anteriormente. Os resultados obtidos estão apresentados nas Tabelas 7.7 e 7.8, sendo a última referente à produção global, considerando o que se encontra concentrado na fase de topo e na fase de fundo, em relação ao volume total do cultivo.

O crescimento da levedura foi afetado pela presença de 9% de tampão fosfato, já na concentração de 5% foi obtida até 11,08 g p.s/L, porém as análises da fase de fundo desses sistemas foram dificultadas devido ao seu reduzido volume. No caso do PEG 2000/tampão fosfato 5% não foi possível realizar todas as análises desejadas. Para os sistemas com 5% de tampão fosfato o crescimento celular foi maior conforme o aumento da massa molecular do PEG, talvez isso esteja relacionado à distribuição dos componentes entre as fases. Como pode ser observado pela alteração nas razões V_T/V_F, há uma redução significativa da diferença entre o volume das fases com o aumento da massa molar do PEG. A fase de fundo do PEG 2000 e PEG 4000/tampão fosfato (5%), por exemplo, tem apenas 0,210 mL e 0,360 mL, respectivamente, isso significa que os componentes PEG e sal estarão mais particionados na fase de topo. Como citado anteriormente, as células da levedura se concentram na fase de topo/interface, pode ser que o efeito causado pelo estresse osmótico desses componentes seja mais acentuado nesses casos.

Assim como o crescimento celular o sistema com 9% de tampão fosfato apresentou baixa produção total de lipase, com valores menores que 100 U/L. Nos sistemas PEG/tampão fosfato 5% e 7%, a quantidade de lipase total produzida reduziu em função do aumento da massa molecular de PEG, como discutido no item anterior, assim como o K_L. Para o sistema PEG/tampão fosfato 9% somente o PEG 2000 não atendeu ao padrão, com K_L menor do que o obtido no outros PEGs. Pode ser que devido à baixa concentração de lipase (19,89 U/L), a distribuição entre as fases não tenha seguido a tendência esperada pela redução do efeito "*salting out*".

Tabela 7.7 Efeito de diferentes concentrações de tampão fosfato de potássio e massa molar de PEG no crescimento celular e na partição da lipase produzida por *Yarrowia lipolytica* na presença de sistema aquoso bifásico utilizando PEG (30 % m/v) e KH_2PO_4-K_2HPO_4 (pH 7,0) (7 % m/v) após 26 horas de cultivo.

PEG	Tampão pH 7,0 (% m/v)	Biomassa (g p.s./L)		Fase de Topo					Fase de fundo					K_L	K_P	K_{AE}	V_T/V_F	η_T
				$Lipase_T$ (U/L)		$Proteína_T$ (mg/mL)		AEL_T (U/mg)	$Lipase_F$ (U/L)		$Proteína_F$ (mg/mL)		AEL_F (U/mg)					
		Média	DP ±	Média	DP ±	Média	DP ±		Média	DP ±	Média	DP ±						
2000	5	7,07	0,22	486,03	47,16	0,098	0,020	4,964	63,55	-	-	-	-	7,65	-	-	19,0	99,3
	9	1,79	0,13	19,50	2,52	0,074	0,003	0,263	20,82	4,80	0,337	0,013	0,06	0,94	0,22	4,26	2,3	68,6
4000	5	10,42	0,96	258,13	4,04	0,085	0,002	3,030	41,64	12,74	0,698	-	0,06	6,20	0,12	50,83	11,7	98,6
	9	2,87	0,16	83,03	6,84	0,075	0,005	1,102	16,75	4,85	0,379	0,032	0,04	4,96	0,20	24,91	2,3	92,0
6000	5	11,08	0,28	174,28	2,78	0,080	0,004	2,182	39,41	9,13	0,675	-	0,06	4,42	0,12	37,37	6,8	96,8
	9	2,82	0,35	97,48	3,92	0,072	0,003	1,359	107,22	2,50	0,349	0,006	0,31	0,91	0,21	4,42	2,5	69,8

AEL: atividade específica de lipase; K_L: coeficiente de partição da lipase; K_P: coeficiente de partição das proteínas; K_{AE}: coeficiente de partição da atividade específica de lipase; V_T/V_F : razão volume de topo/volume de fundo; η_T: percentual de recuperação na fase de topo. As letras T e F subscritas referem-se a fase de topo e fase de fundo, respectivamente.

Tabela 7.8 Efeito de diferentes concentrações de tampão fosfato de potássio e massa molar de PEG na produção de lipase total por *Yarrowia lipolytica* na presença de sistema aquoso bifásico utilizando PEG (30 % m/v) e KH_2PO_4-K_2HPO_4 (pH 7,0) (7 % m/v) após 26 horas de cultivo.

PEG	Tampão pH 7,0 (% m/v)	Lipase total (U/L)	Proteína total (mg/mL)	AEL (U/mg)
2000	5	464,90	0,093	5,00
	9	19,90	0,153	0,13
4000	5	241,03	0,134	1,80
	9	63,06	0,167	0,38
6000	5	156,99	0,156	1,01
	9	100,23	0,150	0,67

7.5 INFLUÊNCIA DO PH DO TAMPÃO FOSFATO DE POTÁSSIO NA PRODUÇÃO DE LIPASE POR FERMENTAÇÃO EXTRATIVA

Baseado nos resultados anteriores, a concentração de tampão fosfato de 7% foi escolhida para os ensaios de avaliação da produção e extração de lipase em sistemas com PEG (30%)/tampão fosfato (7%) com diferentes pH. Os resultados estão apresentados nas tabelas 7.9 e 7.10, sendo a última referente à produção global.

Os valores de biomassa indicam que, em pH 6,0, *Y. lipolytica* apresentou valores de crescimento similares ao pH 7,0, porém teve seu crescimento bastante inibido em pH 8,0, com valores de biomassa entre 0,87 e 1,7 g p.s./L. Como citado anteriormente, estudos mostraram que cepas de *Y. lipolytica* cresceram em pH 8,0 (PRAPHAILONG; FLEET, 1997); além disso, na cinética de produção de lipase em sistemas miniaturizados (Capítulo 5), foi possível observar que o pH do meio de cultivo atinge valores próximos a 8,0 no fim do cultivo. Neste caso, sugere-se que o efeito sinérgico do estresse osmótico e do pH inicial alcalino foram desfavoráveis para o crescimento da levedura, ou induziram a uma fase lag prolongada. Apesar disso, a levedura parece ter permanecido viável, produzindo lipase, ainda que em quantidades ínfimas.

A produção de lipase em função do pH do meio de cultivo pode variar de acordo com a cepa utilizada. Deive et al. (2010) reportaram a produção de lipase por *Y. lipolytica* ATCC 18942 em pH 4,6 estável durante cultivo contínuo. Destain et al. (1997) demonstraram que maior produção de lipase foi obtida em pH 6,0 por uma cepa mutante de *Y. lipolytica* LG 6481. Um estudo recente avaliou a influência do pH inicial na produção de lipase por *Y. lipolytica* Wt-11 e observou que a condição ótima foi obtida iniciando-se a fermentação em pH 6,0 e que em pH 8,0 a produção diminuiu significativamente, já a atividade catalítica da enzima foi melhor entre pH 7,0 e 8,5 (PING et al., 2018).

A produção máxima de lipase por *Y. lipolytica* UFRJ 50682 em meio homogêneo, ou pelo menos sua liberação para o meio extracelular, se deu quando o pH do meio atingiu valores entre 6,5 e 7,5, seguida de uma queda em pH 8,0, como observado nos resultados apresentados no Capítulo 5. O pH inicial do cultivo em YPD sem o SAB é 6,36, porém a ausência de um sistema tampão permite a variação do pH ao longo da fermentação até atingir a faixa que parece mais favorável a sua secreção, o que não ocorre no caso do SAB com tampão fosfato. Portanto, pode-se inferir que a razão pela qual o SAB com pH 7,0 apresentou maior produção de lipase, foi que o pH se manteve na faixa favorável a produção e secreção de lipase.

Tabela 7.9 Efeito do pH do tampão fosfato de potássio e massa molar de PEG na partição da lipase produzida por *Yarrowia lipolytica* na presença de sistema aquoso bifásico formado por PEG (30 % m/v) e KH_2PO_4-K_2HPO_4 (7 % m/v), após 26 horas de cultivo.

PEG	pH do tampão fosfato (7%)	Biomassa (g p.s./L)		Fase de Topo					Fase de fundo					K_P	K_{AE}	V_T/V_F
				$Lipase_T$ (U/L)		$Proteína_T$ (mg/mL)		AEL_T (U/mg)	$Lipase_F$ (U/L)		$Proteína_F$ (mg/mL)		AEL_F (U/mg)			
		Média	DP ±	Média	DP ±	Média	DP ±		Média	DP ±	Média	DP ±				
2000	6	5,30	0,17	0	-	0,077	0,006	-	0	-	0,000	0,000	-		-	-
	8	0,86	0,05	0	-	0,083	0,009	-	0	-	0,294	0,011	-	0,28	-	3,0
4000	6	5,99	0,19	0	-	0,071	0,001	-	9,62	2,36	0,436	0,017	0,02	0,16	-	6,6
	8	1,70	0,13	0	-	0,080	0,003	-	60,20	7,03	0,328	0,005	0,18	0,24	-	3,2
6000	6	6,21	0,19	0	-	0,071	0,007	-	0	-	0,436	0,010	-	0,16	-	6,8
	8	1,27	0,06	0	-	0,077	0,010	-	27,98	3,48	0,304	0,012	0,09	0,25	-	2,9

AEL*: atividade específica de lipase;* K_L*: coeficiente de partição da lipase;* K_P*: coeficiente de partição das proteínas;* K_{AE}*: coeficiente de partição da atividade específica de lipase;* V_T/V_F *: razão volume de topo/volume de fundo;* η_T*: percentual de recuperação na fase de topo. As letras* T *e* F *subscritas referem-se a fase de topo e fase de fundo, respectivamente.*

Tabela 7.10 Efeito do pH do tampão fosfato de potássio e massa molar de PEG na produção de lipase total por *Yarrowia lipolytica* na presença de sistema aquoso bifásico formado por PEG (30 % m/v) e KH_2PO_4-K_2HPO_4 (7 % m/v) após 26 horas de cultivo.

PEG	pH do tampão fosfato (7% m/v)	Lipase total (U/L)	Proteína total (mg/mL)	AEL (U/mg)
2000	6	-		-
	8	-	0,136	-
4000	6	1,27	0,119	0,01
	8	14,26	0,139	0,10
6000	6	-	0,118	-
	8	7,17	0,135	0,05

Considerando a influência do pH na extração de lipase em SAB, sabe-se que este altera a distribuição de cargas na superfície da proteína, alterando sua partição entre as fases. Como regra geral, as proteínas carregadas negativamente preferem a fase de topo em sistemas com PEG, enquanto as carregadas positivamente preferem a fase de fundo, devido a atração eletrostática como resultado da distribuição de cargas entre as fases (ANVARI, 2015). Quando o pH do sistema está acima do ponto isoelétrico (pI), a superfície da lipase se torna mais negativa. O ponto isoelétrico da lipase produzida por *Y. lipolytica* UFRJ 50682 não foi determinado até o momento, mas dados da literatura referentes a outra linhagem indicam que o ponto isoelétrico da lipase de *Y. lipolytica* está na faixa entre 5,0 – 5,4 (ALOULOU et al., 2007).

Nos resultados apresentados na Tabela 7.9 observa-se que quando houve produção de lipase, a mesma se manteve particionada na fase de fundo, tanto em pH 6,0, cujo valor está mais próximo do pI, quanto em pH 8,0. Neste caso, esperava-se que por estar muito acima do pI, a lipase negativamente carregada migrasse para a fase do PEG. Os resultados indicam que tanto a produção quanto a partição da lipase para a fase de topo passam por uma faixa ótima em pH 7,0 (Tabela 7.5). Este comportamento corrobora com um estudo prévio de partição da lipase de *Y. lipolytica* UFRJ 50682 em sistemas PEG 4000/fosfato de potássio variando-se o pH, em que foi observado que a partição é baixa em pH 6,0, passa por um ponto máximo em torno de pH 7,5 e reduz em pH 8 (BRÍGIDA, 2010).

7.6. CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE LIPASE POR FERMENTAÇÃO EXTRATIVA EM SISTEMA MINIATURIZADO

Os ensaios de fermentação extrativa realizados até o momento permitiram avaliar a influência de algumas variáveis na produção e extração de lipase, e dentre as condições testadas, selecionou-se a que apresentou os melhores resultados para dar prosseguimento ao estudo da cinética do processo. O sistema PEG 2000 (30%)/ KH_2PO_4-K_2HPO_4 (pH 7,0) (7%) foi então aplicado para a determinação da cinética de crescimento e produção de lipase em sistema miniaturizado (Erlenmeyer 10 mL).

Os dados referentes à produção de biomassa podem ser verificados na Figura 7.4. Os resultados indicam que a levedura apresenta uma fase lag (0-8h), seguida da fase de crescimento exponencial (10-32h), desaceleração (32-45h) e estacionária. Este perfil indica que a presença dos componentes do SAB retardou o crescimento de *Y. lipolytica*, cuja fase de

desaceleração inicia em 8h no sistema homogêneo (Capítulo 5). O valor da taxa específica de crescimento (μ) reduziu de 0,27 h^{-1} em cultivo homogêneo, para 0,10 h^{-1} em PEG 2000/fosfato de potássio (pH 7.0). Outros autores vêm relatando a mesma tendência de deslocamento da fase estacionária para um período mais tardio nos cultivos em SAB (BANIK; SANTHIAGU, 2002; HOTHA; BANIK, 1997; PANDEY; BANIK, 2011). Provavelmente a fase lag reflete a viscosidade aumentada no meio de cultivo e a adaptação da levedura à pressão osmótica provocada pelos componentes do SAB. Apesar do estresse osmótico provocado pelos componentes do SAB, *Y. lipolytica* atingiu valores de biomassa equivalentes ao cultivo homogêneo, chegando a 12 g/L após 45 horas de cultivo.

A produção de lipase em SAB parece ter iniciado por volta de 20 h, atingindo o pico de produção em 50 horas, intervalo no qual o cultivo entra na fase estacionária (Figura 7.5), corroborando com o perfil de produção no meio homogêneo, que também ocorre na fase estacionária. O consumo de glicose foi acompanhado através da quantificação em cromatografia líquida de alta eficiência, porém a metodologia aplicada não foi adequada e a glicose co-eluiu com o fosfato. Como a fase de topo é pobre em sal, foi possível a visualização do pico de glicose, ainda que a quantificação não tenha sido confiável. Desta maneira foi realizado um acompanhamento qualitativo do consumo de glicose, a qual, possivelmente, esgotou entre 24 e 32 horas. Os cromatogramas dos pontos 0h, 24 h e 32 h encontram-se no anexo I. Estas observações estão de acordo com o perfil de crescimento da zevedura, que iniciou a desaceleração em 32 horas.

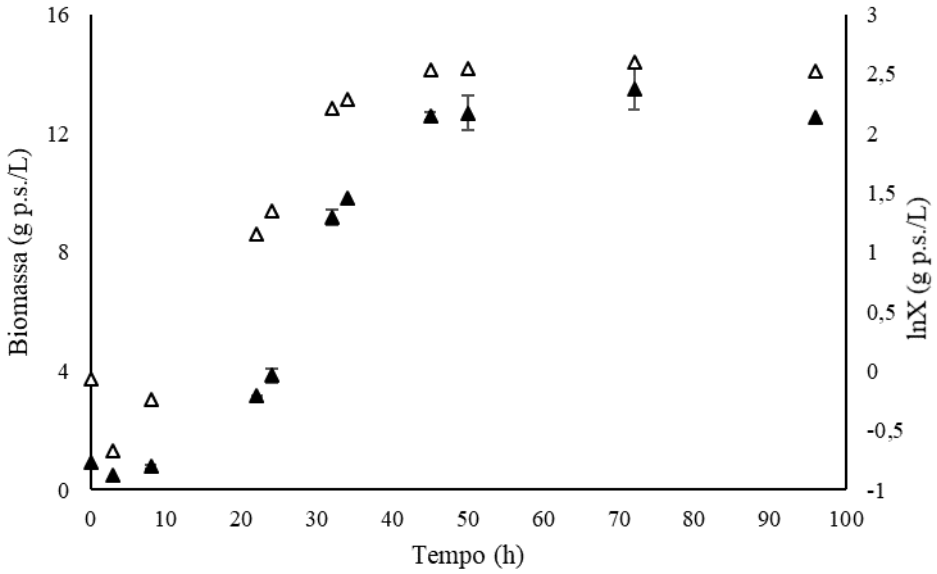


Figura 7.4 Cinética de crescimento de *Yarrowia lipolytica* cultivada em Erlenmeyer de 10 mL (4 mL volume útil) na presença de sistema aquoso bifásico formado por PEG 2000 (30%)/ KH_2PO_4-K_2HPO_4 (pH 7,0) (7%): (▲) Biomassa (g p.s/L); (Δ) ln X (g p.s/L).

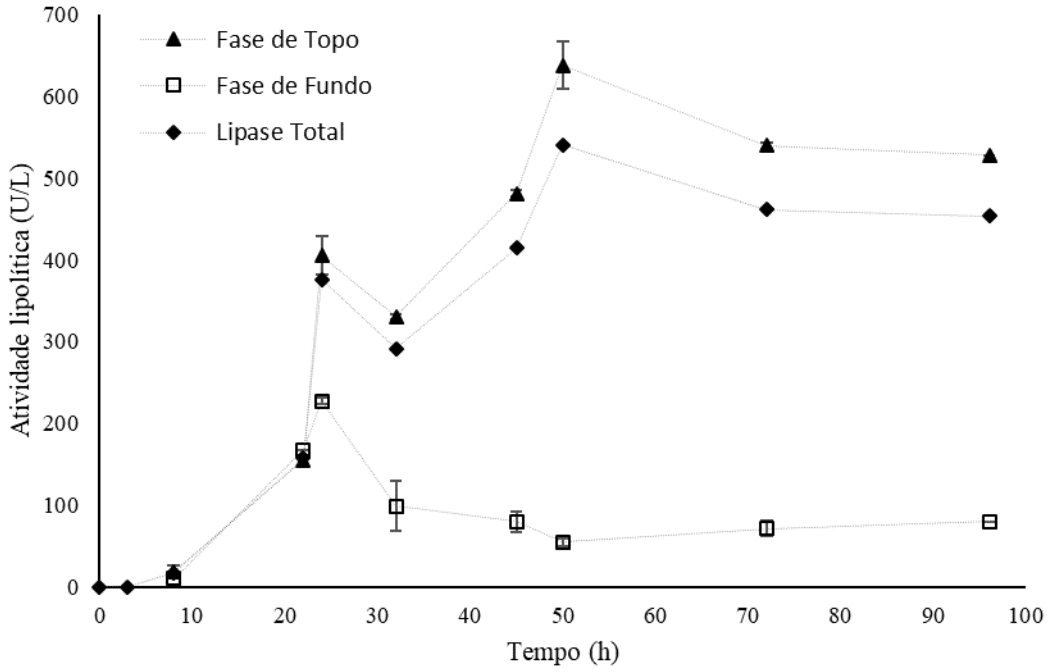


Figura 7.5 Cinética de produção de lipase por *Yarrowia lipolytica* cultivada em Erlenmeyer de 10 mL (4 mL volume útil) na presença de sistema aquoso bifásico formado por PEG 2000 (30%)/ KH_2PO_4-K_2HPO_4 (pH 7,0) (7%): (▲) fase de topo; (□) fase de fundo ;(♦) lipase total.

Diferente do que ocorre na fermentação em meio de cultivo homogêneo, em que a produção de lipase reduz bruscamente após 36 horas, no cultivo em SAB a produção de lipase se estendeu e permaneceu relativamente estável até o fim da fermentação, após 96 horas. Uma possibilidade para explicar esse comportamento seria a partição de protease, preferencialmente para a fase de fundo, evitando assim o contato com a lipase e a sua degradação. Estudos de partição da protease durante a fermentação extrativa são necessários para esclarecer esse efeito. Em um estudo de purificação de lipase com PEG 4000/fosfato de potássio, Brígida (2010) não observou um padrão na partição da lipase e protease em diversas linhas de amarração diferentes. Porém a protease apresentou um coeficiente de partição ligeiramente menor do que a lipase em sistemas cujas concentrações foram parecidas com as utilizadas no presente trabalho (PEG 4000 20,21%/fosfato de potássio (7,5%) (BRÍGIDA, 2010). Em estudo recente, Carvalho et al. (2017) avaliou a partição de lipase e protease de *Y. lipolytica* utilizando PEG 1500/fosfato de potássio em pH 6, 7 e 8. Foi observado que em pH 7,0, equivalente ao aplicado no presente estudo, não houve resultados significativos. Já em pH

6 e 8 a protease se concentrou mais na fase de de topo, já a lipase apresentou-se particionada na fase de fundo em pH 6,0 e na fase de topo em pH 8,0 (CARVALHO et al., 2017)

Na Tabela 7.11 estão apresentados os parâmetros de produção global de lipase e proteína, além dos parâmetros relacionados à partição entre as fases. O K_L indica que ao longo de todo o cultivo a lipase encontrou-se particionada preferencialmente na fase rica em PEG, ou seja, fase de topo, com aumento do K_L de acordo com o aumento da produção total de lipase. Em contrapartida o K_P indicou que a maior parte das proteínas ficaram concentradas na fase de fundo, o que é interessante considerando este processo como uma etapa de pré-purificação.

Tabela 7.11 Cinética de produção de lipase por *Yarrowia lipolytica* cultivada em Erlenmeyer de 10 mL (4 mL volume útil) na presença de sistema aquoso bifásico formado por PEG 2000 (30%)/ KH_2PO_4-K_2HPO_4 (pH 7,0) (7%).

Tempo (h)	K_L	K_P	K_{AE}	V_T/V_F	η_T	Lipase total (U/L)	Proteína total (mg/mL)	AEL (U/mg)
0	-	0,20	-	5	-	-	0,103	-
3	-	0,23	-	5	-	-	0,103	-
8	1,83	0,21	8,68	5	90,16	17,15	0,099	0,17
22	0,93	0,18	5,14	5	82,24	157,13	0,112	1,40
24	1,78	0,18	9,92	5	89,91	375,73	0,108	3,47
32	3,34	0,18	18,44	5	94,35	291,69	0,148	1,98
45	6,02	0,27	22,69	5	96,79	414,03	0,190	2,18
50	11,67	0,28	41,98	5	98,31	540,61	0,200	2,70
72	7,56	0,30	25,07	5	97,42	461,50	0,192	2,41
96	6,61	0,31	21,66	5	97,06	453,24	0,204	2,22

AEL*: atividade específica de lipase;* K_L*: coeficiente de partição da lipase;* K_P*: coeficiente de partição das proteínas;* K_{AE}*: coeficiente de partição da atividade específica de lipase;* V_T/V_F *: razão volume de topo/volume de fundo;* η_T*: percentual de recuperação na fase de topo. As letras* T *e* F *subscritas referem-se a fase de topo e fase de fundo, respectivamente.*

Quanto ao rendimento da separação, no geral foram próximos a 90%, aumentando ao longo da fermentação com ponto máximo em 50 horas (98,31%), em concordância com a maior produção total de lipase. Ooi et al. (2011) obtiveram um rendimento máximo de 92,1 % utilizando PEG 8000 (9,8%) e 1,0% de dextrana T500 na fermentação extrativa de lipase produzida por *Burkholderia pseudomallei*. Show et al. (2012) avaliaram a produção e

separação de lipase em SAB formado por EOPO 3900 (10% m/m), um polímero termossensível e obtiveram rendimento de 99,3%. Rendimento de recuperação máximo de 66,58% na produção de endoglucanase por *Trichoderma reesei* em PEG 6000 (6%)/Dextrana T500 (6,5%) foi reportado por SINHA; DEY; PANDA (2000b).

Apesar da boa tolerância e adaptação da *Y. lipolytica* ao cultivo em SAB, vide a cinética de crescimento, esperava-se melhores resultados para a produção de lipase. A produção máxima de lipase no SAB foi de 540 U/L em 50 horas, cerca de 7 vezes mais baixa do que a produzida em cultivo homogêneo. Considerando a possibilidade de retardo da produção de lipase, assim como foi observado no caso do crescimento, esperava-se que o mesmo ocorresse com a enzima. Sinha et al. (2000b) também não alcançaram valores de produção total de endoglucanase por *Trichoderma reesei* em SAB com PEG/dextrana maiores do que o cultivo homogêneo, assim como Kuboi et al. (1994) no cultivo de *Bacillus subitlis* para produção de endoglucanase em PEG/fosfato de potássio. Já para a produção de lipase, somente dois trabalhos, que tratam do uso de sistema aquoso bifásico com polímeros em fermentação extrativa, foram encontrados na literatura. Ooi et al. (2011) reportaram a produção de 16,5 U/mL de lipase na fase de topo para o cultivo de *Burkholderia pseudomallei* em 9,6 % (m/m) de PEG 8000/1,0 % (m/m) de Dextrana T500, porém dados referentes à lipase produzida em sistema homogêneo não foram disponibilizados para comparação. Já para o outro trabalho a lipase total produzida em SAB com polímero termossensível foi semelhante ao sistema homogêneo (SHOW et al., 2012).

A maioria dos estudos com fermentação extrativa utilizam, ao invés dos sais, dextrana. Dextrana é um polímero biocompatível, permite que as concentrações tanto deste componente quanto do PEG na composição dos SAB não passem da casa das dezenas, contribuindo para amenizar os eventuais problemas com a viscosidade do meio. Porém, dextrana é um componente bastante oneroso e por razões técnico-econômicas não é atrativo para produção em larga-escala, ao contrário do sistema fosfato que é um material mais barato. Além disso a contribuição do uso da dextrana para a viscosidade do meio pode ser ainda mais acentuada do que o PEG. Para se ter uma ideia, ao avaliar um sistema formado por PEG 6000 (9%)/dextrana T500 (8%), Sinha et al. (2000b) determinaram que a viscosidade da fase rica em PEG e da fase rica em dextrana foram 10,5 cP e 342,0 cP, respectivamente. Por isso, o presente trabalho pretendeu avaliar a possibilidade do uso de sais. Porém, para esse tipo de sistema, o maior desafio é alinhar a combinação entre a concentração de sal tolerável pela célula e suficiente para formar um SAB com volume de fundo viável para se trabalhar, e

também uma concentração do polímero cujo impacto na viscosidade não seja limitante para garantir a transferência de massa necessária ao bom desempenho da levedura.

7.7. CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE LIPASE POR FERMENTAÇÃO EXTRATIVA EM BIORREATOR

Alguns trabalhos reportaram um incremento tanto na produção, quanto na partição de enzimas quando o cultivo foi realizado em biorreator, em comparação a frascos agitados. Isso por que o biorreator permite melhor agitação e consequentemente melhor taxa de transferência de oxigênio (SHOW et al., 2012; SINHA; DEY; PANDA, 2000b). Sem a pretensão de executar um estudo de ampliação de escala, foi realizado um cultivo em biorreator com caráter exploratório. Assim sendo, os experimentos para produção de lipase por fermentação extrativa foram realizados em biorreator de 1,5 L com 0,75 L de volume útil de meio. Nessas condições foram investigados o crescimento celular, a produção e separação da lipase na presença do SAB formado por PEG 2000 (30%)/ KH_2PO_4-K_2HPO_4 (pH 7,0) (7%). As condições de agitação (550 rpm) e aeração (1 vvm) foram baseadas no cultivo homogêneo descrito no Capítulo 5, que por sua vez, foi baseado em condições ótimas previamente avaliadas pelo presente grupo de pesquisa (BRÍGIDA et al., 2014). A Figura 7.6 mostra a curva de crescimento de *Y. lipolytica* na condição citada.

É possível notar que ocorreu novamente uma fase lag, que durou até cerca de 20 horas, quase o dobro da fase lag em sistema miniaturizado (Figura 7.2). Os resultados indicam que a levedura apresenta uma fase lag (0-20h), seguida da fase de crescimento exponencial (20-50h) e desaceleração (50-70h) e estacionária. O valor da taxa específica de crescimento (μ) reduziu de 0,27 h^{-1} em cultivo homogêneo, para 0,04 h^{-1} em PEG 2000/fosfato de potássio (pH 7.0).

Os cromatogramas da fase de topo, como discutido anteriormente, permitiram uma análise qualitativa do consumo de glicose (ANEXO I). Ao final da fermentação ainda foi possível observar a presença do pico de glicose, indicando que a levedura não consumiu toda a glicose do meio de cultivo mesmo na fase estacionária.

A Figura 7.7 apresenta o perfil de produção de lipase por *Y. lipolytica* cultivada em biorreator na presença de sistema aquoso bifásico. A produção de lipase em SAB iniciou em 40 horas, atingiu o pico de produção entre 50 - 72 horas e permaneceu até o fim do cultivo. Observa-se que diferente do que ocorreu em todos os outros cultivos a lipase particionou preferencialmente na fase de fundo. É razoável afirmar que parece haver uma influência da quantidade de lipase no meio no coeficiente de partição da mesma entre as fases do SAB. De

acordo com a Tabela 7.12 observa-se que a maior concentração total de lipase obtida foi 113 U/L. Comparando esse valor com os valores obtidos no cultivo em sistema miniaturizado, nota-se que conforme a produção de lipase total passa de 150 U/L, a partição desta para a fase de topo aumenta também.

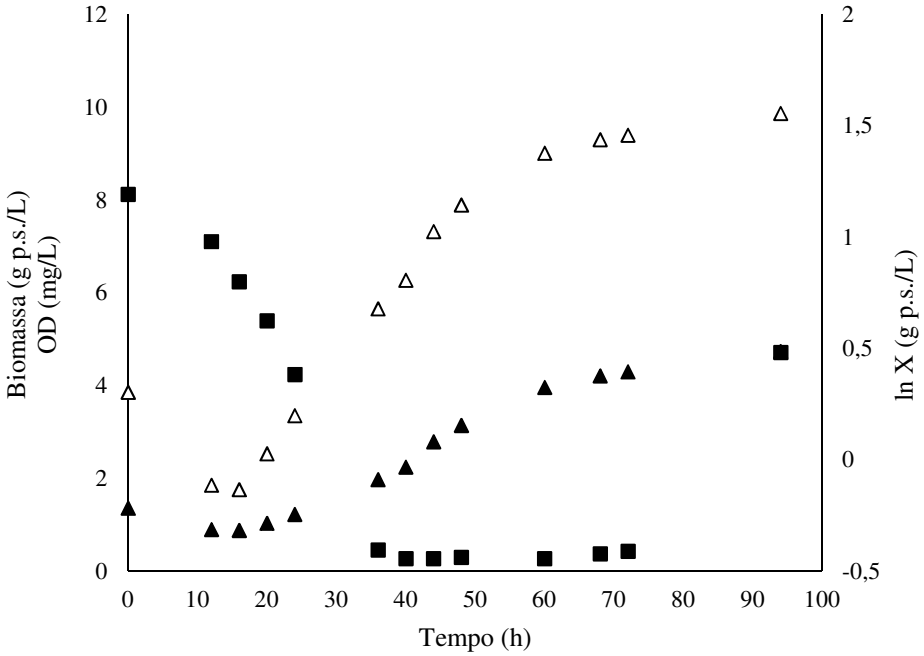


Figura 7.6 Cinética de crescimento de *Yarrowia lipolytica* cultivada em biorreator 1,5L (0,75 L volume útil) na presença de sistema aquoso bifásico formado por PEG 2000 (30%)/ KH_2PO_4-K_2HPO_4 (pH 7,0) (7%): (▲) Biomassa (g p.s/L); (■) Oxigênio dissolvido (OD) (mg/L); (Δ) ln X (g p.s/L).

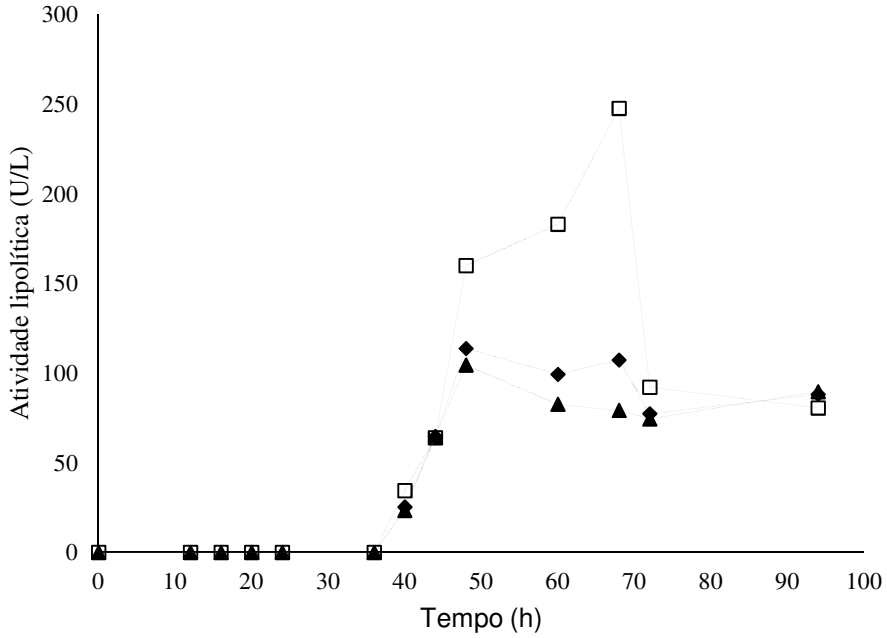


Figura 7.7 Cinética de produção de lipase por *Yarrowia lipolytica* cultivada em biorreator de 1,5 L (0,75 L de volume útil) na presença de sistema aquoso bifásico formado por PEG 2000 (30%)/ KH_2PO_4-K_2HPO_4 (pH 7,0) (7%): (▲) fase de topo; (□) fase de fundo ;(♦) lipase total.

Tabela 7.12 Cinética de produção de lipase por *Yarrowia lipolytica* cultivada em biorreator 1,5L (0,75 L volume útil) na presença de sistema aquoso bifásico formado por PEG 2000 (30%)/ KH_2PO_4-K_2HPO_4 (pH 7,0) (7%).

Tempo (h)	K_L	K_P	K_{AE}	V_T/V_F	η_T	Lipase total (U/L)	Proteína total (mg/mL)	AEL (U/mg)
40	0,68	0,14	4,74	5	77,27	25,24	0,107	0,24
44	1,01	0,15	6,74	5	83,49	64,48	0,103	0,62
48	0,65	0,17	3,83	5	76,56	113,69	0,103	1,11
60	0,45	0,16	2,77	5	69,28	99,27	0,103	0,97
68	0,32	0,19	1,70	5	61,52	107,23	0,110	0,98
72	0,81	0,18	4,55	5	80,15	77,30	0,114	0,68
94	1,11	0,21	5,27	5	84,76	88,06	0,123	0,71

AEL*: atividade específica de lipase;* K_L*: coeficiente de partição da lipase;* K_P*: coeficiente de partição das proteínas;* K_{AE}*: coeficiente de partição da atividade específica de lipase;* V_T/V_F *: razão volume de topo/volume de fundo;* η_T*: percentual de recuperação na fase de topo. As letras* T *e* F *subscritas referem-se a fase de topo e fase de fundo, respectivamente.*

O cultivo em biorreator reduziu tanto o crescimento, quanto a produção de lipase e a razão disso não é evidente, porém sugere-se que a viscosidade do meio de cultivo, devido à presença do polímero, tenha tornado extremamente limitante a transferência de massa no sistema. A presença desses componentes podem afetar a taxa de transferência de oxigênio e consequentemente o k_La, assim como a presença do PEG pode reduzir a difusão e a solubilidade do oxigênio no meio (MARQUES et al., 2009). Na Figura 7.6 nota-se uma longa fase com baixíssima concentração de oxigênio dissolvido, que só começa a se reestabelecer ao final da fermentação. Como demonstrado no Capítulo 5, no cultivo em biorreator com meio YPD sem o SAB, somente após os níveis de oxigênio começarem a se reestabelecer ocorre a maior produção de lipase por *Y. lipolytica*. Marques et al. (2009) investigaram a influência de componentes de SAB no k_La em biorreator de 3L, e constataram que o k_La para meio simples foi 3 vezes maior do que o obtido em meio de cultivo para fermentação extrativa PEG 8000 (25%)/sais fosfato (25%). Além disso, houve uma redução na concentração de oxigênio dissolvido (OD) no equilíbrio de 9,15 mgO_2/L em meio simples, para 5,99 mgO_2/L em meio de fermentação extrativa. Alguns trabalhos mostram que mesmo em SAB com altos níveis de PEG (25 -20%), foi possível manter os perfis de crescimento celular e produção de α-amilase (ANDERSSON; JOHANSSON; HAHN-HÄIGERDAL, 1985) e subtilina por *Bacillus subtilis* (KUBOI et al., 1994), protease alcalina por *Bacillus thuringiensis* (HOTHA; BANIK, 1997) e ácico clavulânico por *Streptomyces* sp. (MARQUES et al., 2011), sugerindo que o impacto da redução da difusão de oxigênio na produção da molécula de interesse em sistemas de fermentação extrativa é particular do processo em questão. Talvez a agitação utilizada no experimento em questão tenha sido muito baixa, a exemplo do estudo realizado por Viana Marques et al. (2011), que ao ampliar a produção de ácido clavulânico por *Streptomyces* passou de 240 rpm em frascos agitados (250 mL), para 800 rpm e 1 vvm em biorreator de 3L (volume útil de 1L),

Para o cultivo de *Y. lipolytica* em SAB, seria interessante o estudo de diferentes condições de agitação e aeração para avaliar se há condições em que a produção de lipase em SAB seja comparável ao sistema homogêneo.

Capítulo 8

Conclusões

- O cultivo miniaturizado permitiu um incremento do KLa, assim como no crescimento e produção de lipase e ácido cítrico por *Y. lipolytica* quando comparados com frascos agitados de escala convencional;
- *Yarrowia lipolytica* se mostrou tolerante, principalmente, a sais fosfatos monobásico e sais sulfato, além de alta tolerância ao PEG (CMNT > 20 %);
- Dentre os líquidos iônicos, somente na presença de [Ch][DHP] *Y. lipolytica* mostrou tolerá-lo em concentrações promissoras para a aplicação deste em sistemas aquosos bifásicos;
- O sistema aquoso bifásico composto por fosfato de potássio e PEG 2000 apresentou maior produção de ácido cítrico e maior coeficiente de partição;
- Para a produção de lipase foi observado que, em geral, a lipase prefere a fase rica em PEG. Além disso, quando distribuída entre as duas fases, o aumento da massa molar do PEG promove a inversão do K_L;
- O sistema formado por PEG 2000 (30 % m/v) e KH_2PO_4-K_2HPO_4 (pH 7,0) (7% m/v) apresentou os parâmetros de produção e separação mais promissores, dentre os sistemas testados;
- A cinética da fermentação extrativa em sistema miniaturizado e em biorreator demonstrou uma extensa fase lag, retardando também a produção de lipase;
- A alta viscosidade do SAB parece limitar a transferência de oxigênio para o meio de cultivo, em especial nas condições estudadas em biorreator, resultando em baixa biomassa e atividade de lipase.

.

Capítulo 9
SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Estudar os fenômenos hidrodinâmicos associados ao cultivo em sistemas miniaturizados e suas implicações na transferência de oxigênio.
- ✓ Avaliar a produção de lipase em microplacas em condições de agitação mais intensas (aumentado diâmetro orbital e velocidade).
- ✓ Investigar a produção de eritritol associada à de ácido cítrico quando na presença dos componentes do SAB.
- ✓ Investigar a separação seletiva de lipase e protease entre as duas fases do sistema aquoso bifásico durante a fermentação extrativa.
- ✓ Avaliar outras condições de agitação e aeração para a produção de lipase por fermentação extrativa em biorreator 1,5 L.
- ✓ Aplicar outros polímeros (dextrana) na composição do SAB para produção de lipase por fermentação extrativa na tentativa de reduzir os efeitos causados pelos sais.
- ✓ Determinar, por eletroforese, a pureza da lipase particionada e recuperada na fase de topo do SAB.

REFERÊNCIAS

AGUEDO, M. et al. Surface properties of *Yarrowia lipolytica* and their relevance to gamma-decalactone formation from methyl ricinoleate. **Biotechnology letters**, v. 27, n. 6, p. 417–22, mar. 2005.

ALONSO, F. O. M. et al. Improvement of lipase production at different stirring speeds and oxygen levels. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 22, n. 1, p. 9–18, mar. 2005.

ALOULOU, A. et al. Purification and biochemical characterization of the LIP2 lipase from *Yarrowia lipolytica*. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1771, n. 2, p. 228–37, fev. 2007.

AMARAL, P. F. F. et al. Improving lipase production using a perfluorocarbon as oxygen carrier. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 81, n. 8, p. 1368–1374, 2006a.

AMARAL, P. F. F. et al. Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 8, p. 1894–1898, ago. 2006b.

AMARAL, P. F. F. et al. Beneficial effects of enhanced aeration using perfluorodecalin in *Yarrowia lipolytica* cultures for lipase production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 339–344, 2007.

AMARAL, P. F. F. et al. Glycerol valorization: New biotechnological routes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 87, n. 3, p. 179–186, set. 2009.

ANDERLEI, T. et al. Online respiration activity measurement (OTR, CTR, RQ) in shake flasks. **Biochemical Engineering Journal**, v. 17, n. 3, p. 187–194, mar. 2004.

ANDERSSON, E.; JOHANSSON, A.-C.; HAHN-HÄIGERDAL, B. α-Amylase production in aqueous two-phase systems with *Bacillus subtilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 7, p. 333–338, 1985.

ANDREISHCHEVA, E. N. et al. Adaptation to salt stress in a salt-tolerant strain of the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Biochemistry (Moscow)**, v. 64, n. 9, p. 1061–1067, 1999.

ANTONUCCI, S. et al. Selectivity in citric acid production by *Yarrowia lipolytica*. **Enzyme and Microbial Technologyechnology**, v. 28, p. 189–195, 2001.

ANVARI, M. Extraction of lipase from *Rhizopus microsporus* fermentation culture by aqueous two-phase partitioning. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 4, p. 723–731, 2015.

ARZUMANOV, T. E.; SHISHKANOVA, N. V. Biosynthesis of citric acid by *Yarrowia lipolytica* repeat-batch culture on ethanol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 525–530, 2000.

BABU, I. S.; RAO, G. H. Optimization of process parameters for the production of lipase in submerged fermentation by *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. **Research Journal of Microbiology**, v. 2, p. 88–93, 2007.

BAKER, G. A. et al. An analytical view of ionic liquids. **The Analyst**, v. 130, n. 6, p. 800–808, jun. 2005.

BANIK, R. M. et al. Technological aspects of extractive fermentation using aqueous two-phase systems. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 19, n. 4, p. 337–348, 2003.

BANIK, R. M.; SANTHIAGU, A. Extractive fermentation for enhanced gellan-hydrolysing enzyme production by *Bacillus thuringiensis* H14. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 8, p. 715–720, 2002.

BANKAR, A. V; KUMAR, A. R.; ZINJARDE, S. S. Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 5, p. 847–65, out. 2009.

BARBOSA, J. M. P. et al. Purification of lipase produced by a new source of *Bacillus* in submerged fermentation using an aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 32, p. 3853–3858, 2011.

BARRERA-RIVERA, K. A.; FLORES-CARREÓN, A.; MARTÍNEZ-RICHA, A. Enzymatic ring-opening polymerization of ε-caprolactone by a new lipase from *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 109, n. 2, p. 708–719, 2008.

BARRERA-RIVERA, K.; FLORES-CARREÓN, A.; MARTÍNEZ-RICHA, A. Synthesis of Biodegradable Polymers Using Biocatalysis with *Yarrowia lipolytica* Lipase. In: SANDOVAL, G. (Ed.). . **Lipases and Phospholipases**. [s.l.] Humana Press, 2012. v. 861p. 485–493.

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

BASSANI, G. et al. Porcine pancreatic lipase partition in potassium phosphate-polyethylene glycol aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 859, n. 2, p. 222–228, 2007.

BASSANI, G. et al. *Candida rugosa* lipase Lip1-polyethyleneglycol interaction and the relation with its partition in aqueous two-phase systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 2, p. 532–537, 2010.

BELLOU, S. et al. Morphological and metabolic shifts of *Yarrowia lipolytica* induced by alteration of the dissolved oxygen concentration in the growth environment. **Microbiology**, v. 160, p. 807–17, abr. 2014.

BEOPOULOS, A. et al. The Hydrocarbon-Degrading Oleaginous Yeast *Yarrowia lipolytica*. In: TIMMIS, K. N. (Ed.). . **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**. 1. ed. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010. p. 2111–2121.

BETTS, J. I.; BAGANZ, F. Miniature bioreactors: current practices and future opportunities. **Microbial cell factories**, v. 5, n. 21, p. 1–14, jan. 2006.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BRÄUTIGAM, S. et al. Whole-cell biocatalysis: Evaluation of new hydrophobic ionic liquids for efficient asymmetric reduction of prochiral ketones. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, n. 4, p. 310, 2009.

BRÄUTIGAM, S.; BRINGER-MEYER, S.; WEUSTER-BOTZ, D. Asymmetric whole cell biotransformations in biphasic ionic liquid/water-systems by use of recombinant *Escherichia coli* with intracellular cofactor regenereation. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 18, p. 1883–1887, 2007.

BRÍGIDA, A. I. S. **Imobilizaçao de lipases utilizando fibra da casca de Coco Verde Como Suporte Para Aplicações Industriais**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

BRÍGIDA, A. I. S. et al. *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682: Lipase Production in a Multiphase Bioreactor. **Current Biochemical Engineering**, v. 1, p. 65–74, 2014a.

BRÍGIDA, A. I. S. et al. Lipase from *Yarrowia lipolytica*: Production, characterization and application as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 101, p. 148–158, mar. 2014b.

BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. **Trends in Microbiology**, v. 7, n. 8, p. 333–338, 1999.

BRUCE, L. J.; DAUGULIS, A J. Solvent selection strategies for extractive biocatalysis. **Biotechnology progress**, v. 7, n. 2, p. 116–24, 1991.

CAMBON, E. et al. Rationally engineered double substituted variants of *Yarrowia lipolytica* lipase with enhanced activity coupled with highly inverted enantioselectivity towards 2-bromo phenyl acetic acid esters. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 106, n. 6, p. 852–859, 2010.

CANCINO, M. et al. A variant of *Yarrowia lipolytica* lipase with improved activity and enantioselectivity for resolution of 2-bromo-arylacetic acid esters. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 19, n. 13, p. 1608–1612, jul. 2008.

CARSON, L. et al. Antibiofilm activities of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 11, n. 4, p. 492, 2009.

CARSTENSEN, F.; APEL, A.; WESSLING, M. In situ product recovery: Submerged membranes vs. external loop membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 394–395, p. 1–36, mar. 2012.

CARVALHO, T. et al. Evaluating aqueous two-phase systems for *Yarrowia lipolytica* extracellular lipase purification. **Process Biochemistry**, v. 53, p. 259-266, 2017.

CASAS-GODOY, L. et al. Lipases: An Overview. In: SANDOVAL, G. (Ed.). . **Lipases and Phospholipases**. 1. ed. [s.l.] Humana Press, 2012. p. 3–30.

CASTIGLIONE, K. et al. Asymmetric whole-cell bioreduction of (R)-carvone by recombinant *Escherichia coli* with in situ substrate supply and product removal. **Biochemical Engineering Journal**, v. 117, p. 102–111, 2017.

CHARNEY, J.; TOMARELLI, R. M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **The Journal of biological chemistry**, v. 171, n. 2, p. 501–5, dez. 1947.

CHEN, R.; LEE, Y. Y. Membrane-Mediated Extractive Fermentation for Lactic Acid Production from Cellulosic Biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 63–65, p. 435–448, 1997.

COELHO, M. A. Z.; AMARAL, P. F. F.; BELO, I. *Yarrowia lipolytica*: an industrial workhorse. In: MÉNDEZ-VILLAS, A. (Ed.). . **Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**. 1. ed. Badajoz: Formatex, 2010. p. 930–944.

CONSTATINESCU, D.; HERRMANN, C.; WEINGÄRTNER, H. Patterns of protein unfolding and protein aggregation in ionic liquids. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 12, n. 8, p. 1756–1763, 9 fev. 2010.

COOPER, C. M.; FERNSTROM, G. A.; MILLER, S. A. Performance of Agitated Gas-Liquid Contactors. **Industrial & Engineering Chemistry**, v. 36, n. 6, p. 504–509, jun. 1944.

CORZO, G.; REVAH, S. Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica.* **Bioresource Technology**, v. 70, p. 173–180, 1999.

CROLLA, A.; KENNEDY, K. J. Optimization of citric acid production from *Candida lipolytica* Y -1095 using n -paraffin. **Journal of Biotechnology**, v. 89, p. 27–40, 2001.

CROLLA, A.; KENNEDY, K. J. Fed-batch production of citric acid by *Candida lipolytica* grown on n-paraffins. **Journal of biotechnology**, v. 110, n. 1, p. 73–84, 13 maio 2004.

CULL, S. G. et al. Room-Temperature Ionic Liquids as Multiphase Bioprocess Operations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 69, n. 2, p. 227–233, 2000.

DA SILVA, L. V. et al. Potential application of raw glycerol from biodiesel in citric acid production by *Yarrowia lipolytica*. **CHEMICAL ENGINEERING**, v. 20, p. 211–216, 2010.

DA SILVA, L. V. et al. 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.

DA SILVA, L. V. et al. 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.

DA SILVA, L. V. **Produção de Ácido Cítrico por *Yarrowia lipolytica* a partir de Glicerol e Análise Proteômica**. Rio de Janeiro, Brasil: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2014.

DAFOE, J. T.; DAUGULIS, A. J. In situ product removal in fermentation systems: improved process performance and rational extractant selection. **Biotechnology letters**, v. 36, n. 3, p. 443–460, mar. 2014.

DARVISHI, F. et al. High-level production of extracellular lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants from methyl oleate. **New biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 756–760, out. 2011.

DE VRIJE, T. et al. “In situ” removal of isopropanol, butanol and ethanol from fermentation broth by gas stripping. **Bioresource technology**, v. 137, p. 153–159, jun. 2013.

DEIVE, F. J.; SANROMÁN, M. A.; LONGO, M. A. A comprehensive study of lipase production by *Yarrowia lipolytica* CECT 1240 (ATCC 18942): from shake flask to continuous bioreactor. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 85, n. 2, p. 258–266, 2010.

DENNEWALD, D.; PITNER, W.-R.; WEUSTER-BOTZ, D. Recycling of the ionic liquid phase in process integrated biphasic whole-cell biocatalysis. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 5, p. 1132–1137, maio 2011.

DESTAIN, J. et al. Utilization of methyloleate in production of microbial lipase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121, n. 1–3, p. 269–277, 2005.

DESTAIN, J.; ROBLAIN, D.; THONART, P. Improvement of lipase production from *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnology letters**, v. 19, n. 2, p. 105–107, 1997.

DHILLON, G. S. et al. Recent Advances in Citric Acid Bio-production and Recovery. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 4, p. 505–529, 14 jul. 2010.

DHILLON, G. S. et al. Utilization of different agro-industrial wastes for sustainable bioproduction of citric acid by *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 54, n. 2, p. 83–92, abr. 2011.

DISSING, U.; MATTIASSON, B. Cultivation of *Lactococcus lactis* in a polyelectrolyte-neutral polymer aqueous two-phase system. **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 4, p. 333–338, 1994.

DOCHERTY, K. M.; DIXON, J. K.; KULPA, C. F. Biodegradability of imidazolium and pyridinium ionic liquids by an activated sludge microbial community. **Biodegradation**, v. 18, n. 4, p. 481–493, ago. 2007.

DOCHERTY, K. M.; KULPA, J. C. F. Toxicity and antimicrobial activity of imidazolium and pyridinium ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 7, n. 4, p. 185, 2005.

DOMÍNGUEZ, A. et al. Effect of lipids and surfactants on extracellular lipase production by *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 78, p. 1166–1170, 2003.

DROUIN, C. M.; COOPER, D. G. Biosurfactants and aqueous two-phase fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 40, p. 86–90, 1992.

DUETZ, W. A. Microtiter plates as mini-bioreactors: miniaturization of fermentation

methods. **Trends in microbiology**, v. 15, n. 10, p. 469–75, out. 2007.

DUETZ, W. A. et al. Methods for intense aeration, growth, storage, and replication of bacterial strains in microtiter plates. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 6, p. 2641–2646, 2000.

DUETZ, W. A.; CHASE, M.; BILLS, G. Miniaturization of Fermentations. In: BALTZ, R. H.; DAVIES, J. E.; DEMAIN, A. L. (Eds.). . **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 3. ed. Washington, DC: ASM Press, 2010. p. 99–116.

DUETZ, W. A.; WITHOLT, B. Effectiveness of orbital shaking for the aeration of suspended bacterial cultures in square-deepwell microtiter plates. **Biochemical Engineering Journal**, v. 7, p. 113–115, 2001.

DUETZ, W. A.; WITHOLT, B. Oxygen transfer by orbital shaking of square vessels and deepwell microtiter plates of various dimensions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 17, n. 3, p. 181–185, 2004.

EARLE, M. J.; SEDDON, K. R. Ionic liquids. Green solvents for the future. **Pure and Applied Chemistry**, v. 72, n. 7, p. 1391–1398, 2000.

FAN, L.-L.; LI, H.-J.; CHEN, Q.-H. Applications and mechanisms of ionic liquids in whole-cell biotransformation. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 7, p. 12196–12216, jan. 2014.

FAN, Z. et al. Asymmetric Reduction of Ethyl 4-Chloro-3-oxobutanoate to Ethyl (S) -4-Chloro-3-hydroxybutanoate Catalyzed by *Aureobasidium pullulans* in an Aqueous / Ionic Liquid Biphase System. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 29, n. 6, p. 577, 2008.

FAUZI, A. H. M.; AMIN, N. A. S. An overview of ionic liquids as solvents in biodiesel synthesis. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 8, p. 5770–5786, 2012.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G. et al. Release of Omega-3 Fatty Acids by the Hydrolysis of Fish Oil Catalyzed by Lipases Immobilized on Hydrophobic Supports. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, n. 8, p. 1173–1178, 20 fev. 2011.

FICKERS, P. et al. Overproduction of lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 63, n. 2, p. 136–42, dez. 2003.

FICKERS, P. et al. Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n. 4, p. 742–749, abr. 2004.

FICKERS, P. et al. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. **FEMS yeast research**, v. 5, n. 6–7, p. 527–43, abr. 2005.

FICKERS, P.; DESTAIN, J.; THONART, P. Improvement of *Yarrowia lipolytica* lipase production by fed-batch fermentation. **Journal of Basic mMcrobiology**, v. 49, n. 2, p. 212–215, abr. 2009.

FICKERS, P.; MARTY, A.; NICAUD, J. M. The lipases from *Yarrowia lipolytica*: genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 6, p. 632–44, 2011.

FICKERS, P.; SAUVEPLANE, V.; NICAUD, J.-M. The Lipases from *Y. lipolytica*: Genetics, Production, Regulation, and Biochemical Characterization. In: BARTH, G. (Ed.). ***Yarrowia lipolytica***. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 2013. v. 25p. 99–119.

FINOGENOVA, T. V et al. Biosynthesis of isocitric acid from ethanol by yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 231–235, 1991.

FINOGENOVA, T. V et al. Biosynthesis of citric and isocitric acids from ethanol by mutant *Yarrowia lipolytica* N 1 under continuous cultivation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 4–5, p. 493–500, ago. 2002.

FONTES, G. C. et al. Factorial design to optimize biosurfactant production by *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**, v. 2010, p. 1–8, jan. 2010.

FÖRSTER, A. et al. Citric acid production from sucrose using a recombinant strain of the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 75, n. 6, p. 1409–1417, jul. 2007.

FOULET, A. et al. Understanding the physical properties, toxicities and anti-microbial activities of choline-amino acid-based salts: Low-toxic variants of ionic liquids. **Journal of Molecular Liquids**, v. 221, p. 133–138, 1 set. 2016.

FREEMAN, A.; WOODLEY, J. M.; LILLY, M. D. In Situ Product Removal as a Tool for Bioprocessing. **Nature Biotechnology**, v. 11, n. 9, p. 1007–1012, 1993.

FRIESEN, D. T. et al. Recovery of citric acid from fermentation beer using supported-liquid membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 56, p. 127–141, 1991.

FUKAYA, Y. et al. Bio ionic liquids: room temperature ionic liquids composed wholly of biomaterials. **Green Chemistry**, v. 9, p. 1155–1157, 2007.

FUKUMOTO, K.; YOSHIZAWA, M.; OHNO, H. Room Temperature Ionic Liquids from 20 Natural Amino Acids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 8, p. 2398–2399, 2005.

GAO, Y.-L. et al. Thermodynamics of ammonium sulfate—polyethylene glycol aqueous two-phase systems. Part1. Experiment and correlation using extended uniquac equation. **Fluid Phase Equilibria**, v. 63, n. 1–2, p. 157–171, jan. 1991.

GAUTAM, S.; SIMON, L. Partitioning of β-glucosidase from *Trichoderma reesei* in poly(ethylene glycol) and potassium phosphate aqueous two-phase systems: Influence of pH and temperature. **Biochemical Engineering Journal**, v. 30, n. 1, p. 104–108, 1 maio 2006.

GHANEMA, O. BEN et al. Thermophysical properties and acute toxicity towards green algae and *Vibrio fischeri* of amino acid-based ionic liquids. **Journal of Molecular Liquids**, v. 212, p. 352–359, 1 dez. 2015.

GIESE, H. et al. Improvement and scale-down of a *Trichoderma reesei* shake flask protocol to microtiter plates enables high-throughput screening. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 118, n. 6, p. 702–709, dez. 2014.

GIMENO, C. J. et al. Unipolar Cell Divisions in the Yeast *S . cerevisiae* Lead to Filamentous Growth : Regulation by Starvation and RAS. **Cell**, v. 66, p. 1077–1090, 1992.

GKATZIONIS, K. et al. Effect of *Yarrowia lipolytica* on blue cheese odour development: Flash profile sensory evaluation of microbiological models and cheeses. **International Dairy Journal**, v. 30, n. 1, p. 8–13, maio 2013.

GLYK, A.; SCHEPER, T.; BEUTEL, S. Influence of different phase-forming parameters on the phase diagram of several PEG-salt aqueous two-phase systems. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 59, n. 3, p. 850–859, 2014.

GLYK, A.; SCHEPER, T.; BEUTEL, S. PEG-salt aqueous two-phase systems: an attractive and versatile liquid-liquid extraction technology for the downstream processing of proteins and enzymes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 16, p. 6599–65616, ago. 2015.

GOLTERMAN, H. L.; CLYMO, R. S.; OHNSTAD, M. A. M. **Methods for physical and chemical analysis of freshwaters**. [s.l.] London, Blackweel Sci., 1978.

GONÇALVES, F. A. G.; COLEN, G.; TAKAHASHI, J. A. *Yarrowia lipolytica* and Its Multiple Applications in the Biotechnological Industry. v. 2014, 2014.

GREWAL, H. S.; KALRA, K. . Fungal Production of Citric Acid. **Biotechnology Advances**, v. 13, n. 2, p. 209–234, 1995.

HACHEM, F.; ANDREWS, B. A.; ASENJO, J. A. Hydrophobic partitioning of proteins in aqueous two-phase systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, n. 7, p. 507–517, 15 nov. 1996.

HAGLER, A. N.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. Yeasts from Marine and Estuarine Waters with Different Levels of Pollution in the State of Rio de Janeiro , Brazil. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 41, p. 173–178, 1981.

HAMMER, S.; PFENNIG, A.; STUMPF, M. Liquid-liquid and vapor-liquid equilibria in water + poly(ethylene glycol) + sodium sulfate. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 39, n. 3, p. 409–413, jul. 1994.

HANSON, M. A.; RAO, G.; FLICKINGER, M. C. Biominiaturization of Bioreactors. In: **Encyclopedia of Industrial Biotechnology**. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc., 2009.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235–251, jun. 2006.

HATTI-KUAL, R. Aqueous Two-Phase Systems. In: HATTI-KUAL, R. (Ed.). . **Aqueous Two-Phase Systems: Methods and Protocols**. 1. ed. [s.l.] Humana Press, 2000. p. 1–10.

HE, J.-Y. et al. Microbial reduction of ethyl acetoacetate to ethyl (R)-3-hydroxybutyrate in an ionic liquid containing system. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 3, p. 316–321, mar. 2009.

HERMANN, R.; LEHMANN, M.; BÜCHS, J. Characterization of gas-liquid mass transfer phenomena in microtiter plates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 81, n. 2, p. 178–186, 20 jan. 2003.

HEVEKERL, A.; KUENZ, A.; VORLOP, K.-D. Filamentous fungi in microtiter plates-an easy way to optimize itaconic acid production with *Aspergillus terreus*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 16, p. 6983–9, ago. 2014.

HOFMEISTER, F. Zur Lehre yon der W irkung tier Salze. **Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie**, v. 25, n. 1, p. 1–30, 1888.

HOLZ, M. et al. Aconitase overexpression changes the product ratio of citric acid production by *Yarrowia lipolytica*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 81, n. 6, p. 1087–1096, jan. 2009.

HORI, K.; UNNO, H. 2.41 - Integrated Production and Separation. In: MOO-YOUNG, M. (Ed.). . **Comprehensive Biotechnology (Second Edition)**. Burlington: Academic Press, 2011. p. 579–590.

HOTHA, S.; BANIK, R. M. Production of Alkaline Protease by *Bacillus thuringiensis* H 14 in Aqueous Two-Phase Systems. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 69, n. 1, p. 5–10, 1997.

HOU, X.-D. et al. Evaluation of Toxicity and Biodegradability of Cholinium Amino Acids Ionic Liquids. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e59145, 15 mar. 2013.

HOUGH-TROUTMAN, W. L. et al. Ionic liquids with dual biological function: sweet and anti-microbial, hydrophobic quaternary ammonium-based salts. **New Journal of Chemistry**, v. 33, n. 1, p. 26–33, 2009.

HOWARTH, J.; JAMES, P.; DAI, J. Immobilized baker's yeast reduction of ketones in an ionic liquid, [bmim]PF6 and water mix. **Tetrahedron Letters**, v. 42, p. 7517, 2001.

HURLEY, F. H.; WIER, T. P. Electrodeposition of Metals from Fused Quaternary Ammonium Salts. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 98, n. 5, p. 203, 1 maio 1951.

IMANDI, S. B. et al. Optimization of medium constituents for the production of citric acid from byproduct glycerol using Doehlert experimental design. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 5, p. 1367–1372, abr. 2007.

INOUE, A.; HORIKOSHI, K. Estimation of Solvent-Tolerance of Bacteria by the Solvent Parameter Log P. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 71, n. 3, p. 194–196, 1991.

ISETT, K. et al. Twenty-Four-Well Plate Miniature Bioreactor High-Throughput System : Assessment for Microbial Cultivations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 98, n. 5, p. 1017–1028, 2007.

ISLAM, R. S. et al. Scale-up of *Escherichia coli* growth and recombinant protein expression conditions from microwell to laboratory and pilot scale based on matched $k_L a$. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 99, n. 5, p. 1128–1139, 1 abr. 2008.

JEUDE, M. et al. Fed-Batch Mode in Shake Flasks by Slow-Release Technique. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 95, n. 3, p. 433–445, 2006.

JUANG, R.; HUANG, R.; WU, R. Separation of citric and lactic acids in aqueous solutions

by solvent extraction and liquid membrane processes. **Journal of Membrane Science**, v. 136, p. 89–99, 1997.

KAMZOLOVA, S. et al. Oxygen requirements for growth and citric acid production of. **FEMS Yeast Research**, v. 3, n. 2, p. 217–222, abr. 2003.

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

KAMZOLOVA, S. V. et al. Characteristics of the growth on rapeseed oil and synthesis of citric and isocitric acids by *Yarrowia lipolytica* yeasts. **Microbiology**, v. 76, n. 1, p. 20–24, fev. 2007.

KAMZOLOVA, S. V.; LUNINA, J. N.; MORGUNOV, I. G. Biochemistry of Citric Acid Production from Rapeseed Oil by *Yarrowia lipolytica* Yeast. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, n. 12, p. 1965–1976, 26 out. 2011.

KAMZOLOVA, S. V et al. Isocitric acid production from rapeseed oil by *Yarrowia lipolytica* yeast. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 20, p. 9133–44, out. 2013.

KAR, T. et al. Investigation of the effect of different extracellular factors on the lipase production by *Yarrowia lipolityca* on the basis of a scale-down approach. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 35, n. 9, p. 1053–1059, set. 2008.

KAR, T. et al. Impact of scaled-down on dissolved oxygen fluctuations at different levels of the lipase synthesis pathway of *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**, v. 14, n. S2, p. 523–529, 2010.

KARASU-YALCIN, S.; TIJEN BOZDEMIR, M.; YESIM OZBAS, Z. Effects of different fermentation conditions on growth and citric acid production kinetics of two *Yarrowia lipolytica* strains. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 24, n. 3, p. 347–360, 2010.

KARTHIKEYAN, A.; SIVAKUMAR, N. Citric acid production by Koji fermentation using banana peel as a novel substrate. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5552–5556, 2010.

KATZBAUER, B. et al. Extractive lactic acid fermentation using aqueous two-phase systems. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 9, n. 2, p. 79–87, 1995.

KEASLER, S. J. et al. Molecular Insights for the Optimization of Solvent-Based Selective Extraction of Ethanol From Fermentation Broths. **AIChE Journal**, v. 59, n. 8, p. 3065–3070, 2013.

KEBABCI, Ö.; CİHANGİR, N. Comparison of three *Yarrowia lipolytica* strains for lipase production : NBRC 1658 , IFO 1195 , and a local strain. **Turkish Journal of Biology**, v. 36, p. 15–24, 2012.

KENSY, F.; ENGELBRECHT, C.; BÜCHS, J. Scale-up from microtiter plate to laboratory fermenter: evaluation by online monitoring techniques of growth and protein expression in *Escherichia coli* and *Hansenula polymorpha* fermentations. **Microbial Cell Factories**, v. 8, n. 1, p. 68, 2009.

KILIÇ, M. et al. Investigation of extractive citric acid fermentation using response-surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 7, p. 759–767, 2002.

KINCLOVÁ, O.; POTIER, S.; SYCHROVÁ, H. Difference in substrate specificity divides the yeast alkali-metal-cation/H+ antiporters into two subfamilies. **Microbiology**, v. 148, n. 4, p. 1225–1232, 2002.

KIRINCIC, S.; CVETO, K. Viscosity of aqueous solutions of polyethylene glycol at 298.15 K. **Fluid Phase Equilibria**, v. 155, p. 311–325, 1998.

KRATZER, R. et al. Whole-cell bioreduction of aromatic α-keto esters using *Candida tenuis* xylose reductase and *Candida boidinii* formate dehydrogenase co-expressed in *Escherichia coli.* **Microbial Cell Factories**, v. 7, n. 37, p. 1–12, 2008.

KUBOI, R. et al. Fermentation of *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and Production of Subtilin in Polyethylene Glycol / Phosphate Aqueous Two-Phase Systems. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 78, n. 6, p. 431–436, 1994.

KUMAR, S.; WITTMANN, C.; HEINZLE, E. Minibioreactors. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 1, p. 1–10, 2004.

KWON, Y. J.; KAUL, R.; MATTIASSON, B. Extractive lactic acid fermentation in poly (ethyleneimine)-based aqueous two-phase system. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 50, n. 3, p. 280–290, 1996.

LANCIOTTI, R. et al. Use of *Yarrowia lipolytica* strains for the treatment of olive mill wastewater. **Bioresource technology**, v. 96, n. 3, p. 317–322, fev. 2005.

LATTERMANN, C.; BÜCHS, J. Microscale and miniscale fermentation and screening. **Current opinion in biotechnology**, v. 35, p. 1–6, 23 dez. 2015.

LEE, H.-I.; LEON, J.; RASKIN, I. Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 10, p. 4076–4079, 1995.

LEE, S. Y. et al. Fermentative butanol production by Clostridia. **Biotechnology and bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 209–228, 1 out. 2008.

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, n. 3, p. 292–295, ago. 2007.

LINDE, T. et al. Fermentation in 24-well plates is an efficient screening platform for filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 224–230, 1 ago. 2014.

LIU, X.-Y. et al. Inulin hydrolysis and citric acid production from inulin using the surface-engineered *Yarrowia lipolytica* displaying inulinase. **Metabolic engineering**, v. 12, n. 5, p. 469–476, set. 2010.

LONG, Q. et al. The development and application of high throughput cultivation technology in bioprocess development. **Journal of Biotechnology**, v. 192, p. 323–338, 20 dez. 2014.

LOPES, M. et al. *Yarrowia lipolytica* lipase production enhanced by increased air pressure. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 255–260, fev. 2008.

LOPES, M. et al. The use of olive mill wastewater by wild type *Yarrowia lipolytica* strains: medium supplementation and surfactant presence effect. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, n. 4, p. 533–537, 2009.

LOPES, V. R. O. et al. Nitrogen sources on tpomw valorization through solid state fermentation performed by *Yarrowia Lipolytica*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 33, n. 2, p. 261–270, 2016.

LOU, W. et al. Biocatalytic anti-Prelog stereoselective reduction of 4′-methoxyacetophenone to (R)-1-(4-methoxyphenyl)ethanol with immobilized *Trigonopsis variabilis* AS2.1611 cells using an ionic liquid-containing medium. **Green Chemistry**, v. 11, p. 1377–1384, 2009a.

LOU, W.-Y. et al. Using a water-immiscible ionic liquid to improve asymetric reduction of 4-(trimethylsilyl) -3-butyn-2-one catalyzed by immobilized *Candida parapsilosis* CCTCC M203011 cells. **BMC Biotechnology**, v. 9, n. 90, p. 1–12, 2009b.

LOU, W.; ZONG, M.; SMITH, T. J. Use of ionic liquids to improve whole-cell biocatalytic asymmetric reduction of acetyltrimethylsilane for efficient synthesis of enantiopure (S) -1-trimethylsilylethanol. **Green Chemistry**, v. 8, p. 147–155, 2006.

LUO, G. et al. Two-phase electro-electrodialysis for recovery and concentration of citric acid. **Separation and Purification Technology**, v. 38, n. 3, p. 265–271, set. 2004.

MADZAK, C.; GAILLARDIN, C.; BECKERICH, J.-M. Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review. **Journal of Biotechnology**, v. 109, n. 1–2, p. 63–81, 8 abr. 2004.

MAIER, U.; BÜCHS, J. Characterisation of the gas – liquid mass transfer in shaking bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 7, p. 99–106, 2001.

MALINOWSKI, J. J. Two-phase partitioning bioreactors in fermentation technology. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 7, p. 525–538, 2001.

MARINI, A. et al. Isolation of a *Aspergillus niger* lipase from a solid culture medium with aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 22, p. 2135–2141, 2011.

MARQUES, D. DE A. V. et al. Comparison of oxygen mass transfer coefficient in simple and extractive fermentation systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 47, n. 1–3, p. 122–126, 2009.

MARQUES, D. A. V et al. Extractive fermentation of clavulanic acid by *Streptomyces* DAUFPE 3060 using aqueous two-phase system. **Biotechnology progress**, v. 27, n. 1, p. 95–103, jan. 2011.

MATSUMOTO, M. et al. Extraction of organic acids using imidazolium-based ionic liquids and their toxicity to *Lactobacillus rhamnosus*. **Separation and Purification Technology**, v. 40, n. 1, p. 97–101, nov. 2004.

MATSUMOTO, M.; MOCHIDUKI, K.; KONDO, K. Toxicity of ionic liquids and organic solvents to lactic acid-producing bacteria. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 98, n. 5, p. 344–347, jan. 2004.

MAX, B. et al. Biotechnological production of citric acid. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 862–875, 2010.

MEGAW, J.; BUSETTI, A.; GILMORE, B. F. Isolation and characterisation of 1-alkyl-3-

methylimidazolium chloride ionic liquid-tolerant and biodegrading marine bacteria. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e60806, jan. 2013.

MERCHUK, J. C.; ANDREWS, B. A.; ASENJO, J. A. Aqueous two-phase systems for protein separation. Studies on phase inversion. **Journal of chromatography B**, v. 711, n. 1–2, p. 285–293, 26 jun. 1998.

MIN-TIAN, G. et al. Production of L-lactic acid by electrodialysis fermentation (EDF). **Process Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 1903–1907, out. 2004.

MOELLER, L. et al. Optimization of Citric Acid Production from Glucose by *Yarrowia lipolytica*. **Engineering in Life Sciences**, v. 7, n. 5, p. 504–511, out. 2007.

MORALES-VARGAS, A. T.; DOMÍNGUEZ, A.; RUIZ-HERRERA, J. Identification of dimorphism-involved genes of *Yarrowia lipolytica* by means of microarray analysis. **Research in Microbiology**, v. 163, n. 5, p. 378–387, jun. 2012.

MORGUNOV, I. G. et al. Regulation of NAD + Dependent Isocitrate Dehydrogenase in the Citrate Producing Yeast *Yarrowia lipolytica*. **Biochemistry (Moscow)**, v. 69, n. 12, p. 1391–1398, 2004.

MORÍN, M. et al. Proteomic analysis reveals metabolic changes during yeast to hypha transition in*Yarrowia lipolytica*. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 42, n. 11, p. 1453–1462, 1 nov. 2007.

NANDINI, K. E.; RASTOGI, N. K. Liquid–Liquid Extraction of Lipase Using Aqueous Two-Phase System. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 2, p. 295–303, 5 nov. 2011.

NASCIMENTO, F. V. DO. **Produção de eritritol por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 em sistemas miniaturizados**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2016.

NERLI, B. B.; ESPARIZ, M.; PICÓ, G. A. Thermodynamic study of forces involved in bovine serum albumin and ovalbumin partitioning in aqueous two-phase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 72, n. 4, p. 468–474, 2001.

NICAUD, J. Yarrowia lipolytica. **Yeast**, v. 29, p. 409–418, 2012.

NOCKEMANN, P. et al. Choline saccharinate and choline acesulfamate: ionic liquids with low toxicities. **The Journal of Physical Chemistry. B**, v. 111, n. 19, p. 5254–5263, 17 maio 2007.

OOI, C. W. et al. Extractive fermentation using aqueous two-phase systems for integrated

production and purification of extracellular lipase derived from *Burkholderia pseudomallei*. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 68–73, jan. 2011.

OSWAL, N. et al. Palm oil mill effluent treatment by a tropical marine yeast. **Bioresource Technology**, v. 85, p. 35–37, 2002.

PADILHA, G. DA S. et al. Extraction of lipase from *Burkholderia cepacia* by PEG/Phosphate ATPS and its biochemical characterization. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 1, p. 7–19, 2012.

PANDEY, S. K.; BANIK, R. M. Extractive fermentation for enhanced production of alkaline phosphatase from *Bacillus licheniformis* MTCC 1483 using aqueous two-phase systems. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 5, p. 4226–4231, mar. 2011.

PANULA-PERÄLÄ, J. et al. Enzyme controlled glucose auto-delivery for high cell density cultivations in microplates and shake flasks. **Microbial Cell Factories**, v. 7, n. 31, p. 1–12, jan. 2008.

PAPAGIANNI, M. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 244–263, 2007.

PAPANIKOLAOU, S. et al. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 737–744, 2002.

PAPANIKOLAOU, S. et al. Influence of glucose and saturated free-fatty acid mixtures on citric acid and lipid production by *Yarrowia lipolytica*. **Current Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 134–142, fev. 2006.

PAPANIKOLAOU, S. et al. Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* cultivated on olive-mill wastewater-based media. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 7, p. 2419–2428, maio 2008.

PAPANIKOLAOU, S. et al. Biosynthesis of lipids and organic acids by *Yarrowia lipolytica* strains cultivated on glucose. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 111, n. 12, p. 1221–1232, dez. 2009.

PAPOUSKOVA, K.; SYCHROVA, H. Yarrowia lipolytica possesses two plasma membrane alkali metal cation/H+ antiporters with different functions in cell physiology. **FEBS Letters**, v. 580, n. 8, p. 1971–1976, 2006.

PASSINO, D. R. M.; SMITH, S. B. Acute bioassays and hazard evaluation of representative contaminants detected in great lakes fish. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 6, n. 11, p. 901–907, 1 nov. 1987.

PATRIGNANI, F. et al. Variability of the lipolytic activity in *Yarrowia lipolytica* strains in pork fat. **Meat Science**, v. 88, n. 4, p. 689–693, ago. 2011.

PAZOUKI, M. et al. Comparative studies on citric acid production by *Aspergillus niger* and *Candida lipolytica* using molasses and glucose. **Bioprocess Engineering**, v. 22, n. 4, p. 353–361, 6 abr. 2000.

PAZOUKI, M.; PANDA, T. Recovery of citric acid - a review. **Bioprocess Engineering**, v. 19, p. 435–439, 1998.

PEKSEL, A.; KUBICEK, C. P. Effects of Sucrose Concentration during Citric Acid Accumulation by *Aspergillus niger*. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 27, p. 581–590, 2003.

PEREIRA-MEIRELLES, F. V.; ROCHA-LEÃO, M. H. M.; SANŤANNA, G. L. A stable lipase from *Candida lipolytica*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 63–65, n. 1, p. 73–85, mar. 1997.

PEREIRA-MEIRELLES, F. V.; ROCHA-LEÃO, M. H. M.; SANT'ANNA, G. L. Lipase location in *Yarrowia lipolytica* cells. **Biotechnology Letters**, v. 22, n. 1, p. 71–75, 2000.

PERUMALSAMY, M.; MURUGESAN, T. Prediction of liquid-liquid equilibria for PEG 2000-sodium citrate based aqueous two-phase systems. **Fluid Phase Equilibria**, v. 244, n. 1, p. 52–61, 2006.

PESSOA JUNIOR, A.; KILIKIAN, B. V. Purificação de produtos biotecnológicos. In: **Purificação de produtos biotecnológicos**. [s.l.] Manole, 2005.

PETKOVIC, M. et al. Novel biocompatible cholinium-based ionic liquids — toxicity and biodegradability. **Green Chemistry**, v. 12, p. 643–649, 2010.

PFRUENDER, H. et al. Efficient Whole-Cell Biotransformation in a Biphasic Ionic Liquid/Water System. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 43, p. 4529–4531, 2004.

PFRUENDER, H.; JONES, R.; WEUSTER-BOTZ, D. Water immiscible ionic liquids as solvents for whole cell biocatalysis. **Journal of Biotechnology**, v. 124, n. 1, p. 182–190, 25 jun. 2006.

PHAM, T. P. T.; CHO, C.-W.; YUN, Y.-S. Environmental fate and toxicity of ionic liquids: a review. **Water Research**, v. 44, n. 2, p. 352–372, jan. 2010.

PINACCI, P.; RADAELLI, M. Recovery of citric acid from fermentation broths by electrodialysis with bipolar membranes. **Desalination**, v. 148, p. 177–179, 2002.

PING, L. et al. Improvement of extracellular lipase production by a newly isolated *Yarrowia lipolytica* mutant and its application in the biosynthesis of L-ascorbyl palmitate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 302–311, 2018.

PLANAS, J. et al. Enhanced production of lactic acid through the use of a novel aqueous two-phase system as an extractive fermentation system. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 45, n. 6, p. 737–743, 1996.

PLANAS, J.; LEFEBVRE, D.; TJERNELD, F. Analysis of Phase Composition in Aqueous Two-Phase Systems Using a Two-Column Chromatographic Method : Application to Lactic Acid Production by Extractive Fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 54, n. 4, p. 303–311, 1997.

PRAPHAILONG, W.; FLEET, G. H. The effect of pH, sodium chloride, sucrose, sorbate and benzoate on the growth of food spoilage yeasts. **Food Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 459–468, 1997.

PRPICH, G. P.; DAUGULIS, A. J. A Novel Solid – Liquid Two-Phase Partitioning Bioreactor for the Enhanced Bioproduction of 3-Methylcatechol. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 98, n. 5, p. 1008–1016, 2007.

QUIJANO, G.; COUVERT, A.; AMRANE, A. Ionic liquids: applications and future trends in bioreactor technology. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8923–8930, dez. 2010.

RADOŠEVIĆ, K. et al. Comparative in vitro study of cholinium-based ionic liquids and deep eutectic solvents toward fish cell line. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 131, p. 30–36, 1 set. 2016.

RANKE, J. et al. Design of sustainable chemical products--the example of ionic liquids. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 6, p. 2183–2206, jun. 2007.

RATANAPONGLEKA, K. Recovery of Biological Products in Aqueous Two Phase Systems. **International Journal of Chemical Engineering and Applications**, v. 1, n. 2, p. 191–198, 2010.

RITO-PALOMARES, M. Practical application of aqueous two-phase partition to process development for the recovery of biological products. **Journal of Chromatography B**, v. 807, n. 1, p. 3–11, 25 jul. 2004.

RYMOWICZ, W.; RYWIŃSKA, A.; GŁADKOWSKI, 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, 1 jan. 2008.

RYWIŃSKA, A. et al. Effect of agitation and aeration on the citric acid production by *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol. **Preparative biochemistry & biotechnology**, v. 42, n. 3, p. 279–291, jan. 2012.

RYWIŃSKA, A. et al. Glycerol as a promising substrate for *Yarrowia lipolytica* biotechnological applications. **Biomass and Bioenergy**, v. 48, p. 148–166, jan. 2013.

SALTER, G. J.; KELL, D. B. Solvent selection for whole cell biotransformations in organic media. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 139–177, jan. 1995.

SANTOS, A. G. et al. Toxicity of ionic liquids toward microorganisms interesting to the food industry. **RSC Advances**, v. 4, n. 70, p. 37157–37163, 5 ago. 2014.

SARDESSAI, Y.; BHOSLE, S. Tolerance of bacteria to organic solvents. **Research in Microbiology**, v. 153, n. 5, p. 263–268, jun. 2002.

SAXENA, R. K. et al. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiological Methods**, v. 52, p. 1–18, 2003.

SCHMIDEDER, A. et al. Non-water miscible ionic liquid improves biocatalytic production of geranyl glucoside with *Escherichia coli* overexpressing a glucosyltransferase. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, n. 9, p. 1409–1414, 2016.

SCHMIDT, A. S.; VENTOM, A. M.; ASENJO, J. A. Partitioning and purification of α-amylase in aqueous two-phase systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, n. 2, p. 131–142, 1 fev. 1994.

SCHÜGERL, K.; HUBBUCH, J. Integrated bioprocesses. **Current opinion in microbiology**, v. 8, n. 3, p. 294–300, jun. 2005.

SEDDON, K. R. Ionic Liquids for Clean Technology. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 68, n. 4, p. 351–356, abr. 1997.

SHANKARANAND, V. S.; LONSANE, B. K. Coffee husk: an inexpensive substrate for

production of citric acid by *Aspergillus niger* in a solid-state fermentation system. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 165–168, 1994.

SHOW, P. L. et al. Extractive fermentation for improved production and recovery of lipase derived from *Burkholderia cepacia* using a thermoseparating polymer in aqueous two-phase systems. **Bioresource Technology**, v. 116, p. 226–233, 1 jul. 2012.

SILVA, W. O. B. et al. Production and extraction of extracellular lipase from entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 321–326, 2005.

SINHA, J.; DEY, P. K.; PANDA, T. Aqueous two-phase : the system of choice for extractive fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, p. 476–486, 2000a.

SINHA, J.; DEY, P. K.; PANDA, T. Extractive fermentation for improved production of endoglucanase by an intergeneric fusant of *Trichoderma reesei / Saccharomyces cerevisiae* using aqueous two-phase system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, p. 163–175, 2000b.

SOCCOL, C. R. et al. New Perspectives for Citric Acid Production and Application. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 141–149, 2006.

STARK, D.; VON STOCKAR, U. In situ product removal (ISPR) in whole cell biotechnology during the last twenty years. **Adv Biochem Eng Biotechnol**, v. 80, p. 149–175, 2003.

SZABO, R. Dimorphism in *Yarrowia lipolytica*: Filament formation is suppressed by nitrogen starvation and inhibition of respiration. **Folia Microbiologica**, v. 44, n. 1, p. 19–24, 1999.

SZABO, R.; ŠTOFANÍKOVÁ, V. Presence of organic sources of nitrogen is critical for filament formation and pH-dependent morphogenesis in *Yarrowia lipolytica*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 206, n. 1, p. 45–50, 2002.

TAN, T. et al. Screening of high lipase producing *Candida* sp. and production of lipase by fermentation. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 4, p. 459–465, 2003.

THEVENIEAU, F.; NICAUD, J.; GAILLARDIN, C. Applications of the Non-Conventional Yeast *Yarrowia lipolytica*. In: SATYANARAYANA, T.; KUNZE, G. (Eds.). . **Yeast Biotechnology: Diversity and Applications**. [s.l.] Springer, Dordrecht, 2009. p. 589–613.

TIK, N.; BAYRAKTAR, E.; MEHMETOGLU, Ü. In situ reactive extraction of lactic acid

from fermentation media. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 76, n. 7, p. 764–768, jul. 2001.

TISELIUS, A.; PORATH, J.; ALBERTSSON, P. Separation and Fractionation of Macromolecules and Particles. **Science**, v. 141, n. 3575, p. 13–20, 1963.

TOKUOKA, K. Sugar- and salt-tolerant yeasts. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 74, p. 101–110, 1993.

TOMASZEWSKA, L. et al. A comparative study on glycerol metabolism to erythritol and citric acid in *Yarrowia lipolytica* yeast cells. **FEMS Yeast Research**, v. 14, n. 6, p. 966–976, 2014.

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. **Word Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 14, p. 399–404, 1998.

TREICHEL, H. et al. A Review on Microbial Lipases Production. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 2, p. 182–196, 2010.

TURKI, S. et al. An enhanced process for the production of a highly purified extracellular lipase in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 5, p. 1371–1385, mar. 2010.

VAN HECKE, W.; KAUR, G.; DE WEVER, H. Advances in in-situ product recovery (ISPR) in whole cell biotechnology during the last decade. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 7, p. 1245–1255, 15 nov. 2014.

VENTURA, S. P. M. et al. Ecotoxicity analysis of cholinium-based ionic liquids to *Vibrio fischeri* marine bacteria. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 102, p. 48–54, 1 abr. 2014.

VRIKKIS, R. M. et al. Biocompatible Ionic Liquids: A New Approach for Stabilizing Proteins in Liquid Formulation. **Journal of Biomechanical Engineering**, v. 131, n. 7, p. 74514, 2009.

WALDEN, P. Molecular Weights and Electrical Conductivity of Several Fused Salts. **Bulletin of the Russian Academy of Sciences**, p. 405–422, 1914.

WALTER, H.; JOHANSSON, G.; BROOKS, D. E. Partitioning in aqueous two-phase systems: recent results. **Analytical Biochemistry**, v. 197, n. 1, p. 1–18, 1991.

WANG, W.; ZONG, M.-H.; LOU, W.-Y. Use of an ionic liquid to improve asymmetric reduction of 4′-methoxyacetophenone catalyzed by immobilized *Rhodotorula* sp. AS2.2241 cells. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, n. 1, p. 70–76, jan. 2009.

WILKES, J. S. et al. Dialkylimidazolium Chloroaluminate Melts: A New Class of Room-Temperature Ionic Liquids for Electrochemistry, Spectroscopy, and Synthesis. **Inorganic Chemistry**, v. 237, n. 1980, p. 1263–1264, 1982.

WILKES, J. S.; ZAWOROTKO, M. J. Air and Water Stable I-Ethyl-3-methylimidazolium Based Ionic Liquids. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 13, p. 965–967, 1992.

WOJTATOWICZ, M.; MARCHIN, G. L.; ERICKSON, L. E. Attempts to improve strain A-101 of *Yarrowia lipolytica* for citric acid production from n-paraffins. **Process Biochemistry**, v. 28, n. 7, p. 453–460, 1993.

YAN, Y.; ZHANG, X.; CHEN, D. Enhanced catalysis of *Yarrowia lipolytica* lipase LIP2 immobilized on macroporous resin and its application in enrichment of polyunsaturated fatty acids. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 179–187, mar. 2013.

YANG, Z. Hofmeister effects: an explanation for the impact of ionic liquids on biocatalysis. **Journal of Biotechnology**, v. 144, n. 1, p. 12, out. 2009.

YAZDANI, A. et al. Microbial Biocompatibility and Biodegradability of Choline-Amino Acid Based Ionic Liquids. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 8, n. 5, p. 415–421, 2016.

YU, Y. et al. Biodegradable Naphthenic Acid Ionic Liquids: Synthesis, Characterization, and Quantitative Structure-Biodegradation Relationship. **Chemistry - A European Journal**, v. 14, n. 35, p. 11174–11182, 8 dez. 2008.

ZAFARANI-MOATTAR, M. T.; GASEMI, J. Liquid–liquid equilibria of aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and ammonium dihydrogen phosphate or diammonium hydrogen phosphate. Experiment and correlation. **Fluid Phase Equilibria**, v. 198, n. 2, p. 281–291, maio 2002.

ZAFARANI-MOATTAR, M. T.; SADEGHI, R. Liquid–liquid equilibria of aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and sodium dihydrogen phosphate or disodium hydrogen phosphate: Experiment and correlation. **Fluid Phase Equilibria**, v. 181, n. 1–2, p. 95–112, 25 maio 2001.

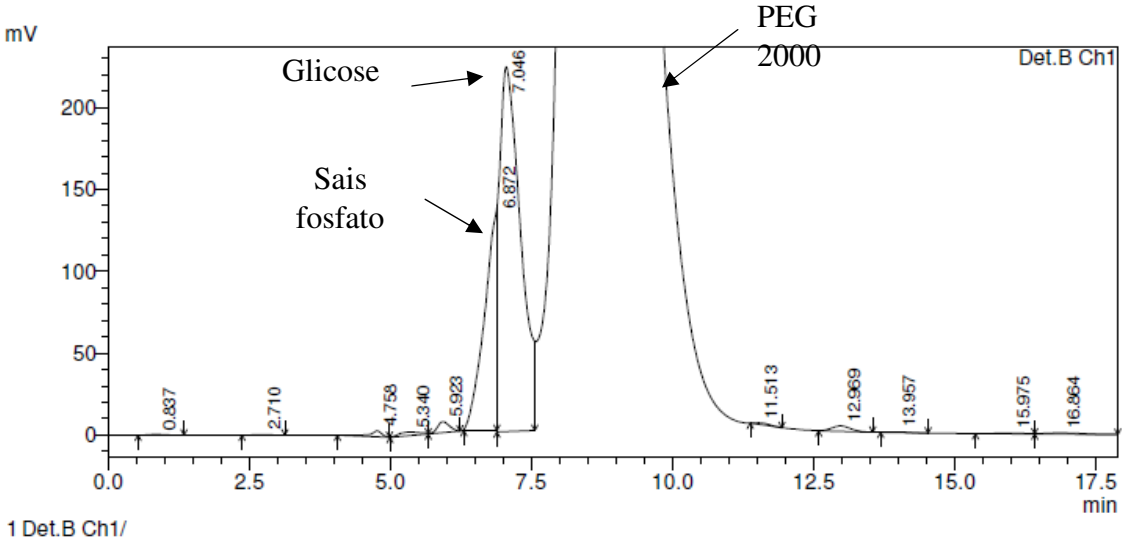
ZAFARANI-MOATTAR, M. T.; SADEGHI, R.; HAMIDI, A. A. Liquid-liquid equilibria of an aqueous two-phase system containing polyethylene glycol and sodium citrate: Experiment and correlation. **Fluid Phase Equilibria**, v. 219, n. 2, p. 149–155, 2004.

ZELIĆ, B. et al. Process strategies to enhance pyruvate production with recombinant *Escherichia coli*: from repetitive fed-batch to in situ product recovery with fully integrated electrodialysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 85, n. 6, p. 638–646, 20 mar. 2004.

ZHANG, W. et al. Liquid–liquid equilibrium of aqueous two-phase systems containing poly(ethylene glycol) of different molecular weights and several ammonium salts at 298.15K. **Thermochimica Acta**, v. 560, p. 47–54, maio 2013.

ZHOU, Y.-J. et al. Purification of porcine pancreatic lipase by aqueous two-phase systems of polyethylene glycol and potassium phosphate. **Journal of Chromatography B**, v. 926, p. 77–82, 1 maio 2013.

ANEXO I – CROMATOGRAMAS

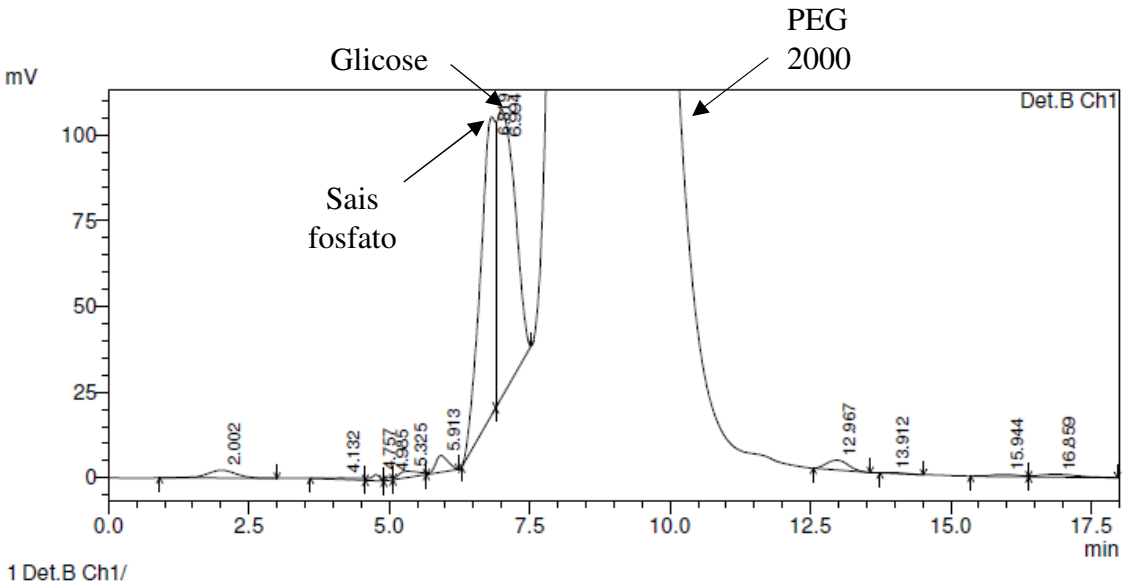


PeakTable

Detector B Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	0.837	4954	300	0.061	0.080
2	2.710	3285	174	0.040	0.046
3	4.758	55181	3625	0.675	0.968
4	5.340	55468	2080	0.679	0.556
5	5.923	100531	6694	1.231	1.788
6	6.872	2038823	132890	24.958	35.491
7	7.046	5760502	222827	70.515	59.511
8	11.513	17931	860	0.219	0.230
9	12.969	74233	3252	0.909	0.869
10	13.957	7987	336	0.098	0.090
11	15.975	17352	549	0.212	0.147
12	16.864	32911	844	0.403	0.225
Total		8169160	374432	100.000	100.000

Figura I.1. Cromatograma referente à fase de topo, tempo 0h, da cinética de produção de lipase em sistema miniaturizado (erlenmeyer 10 mL) na presença de sistema aquoso bifásico: PEG 2000 (30%)/KH_2PO_4-K_2HPO_4 (pH 7,0) (7%).

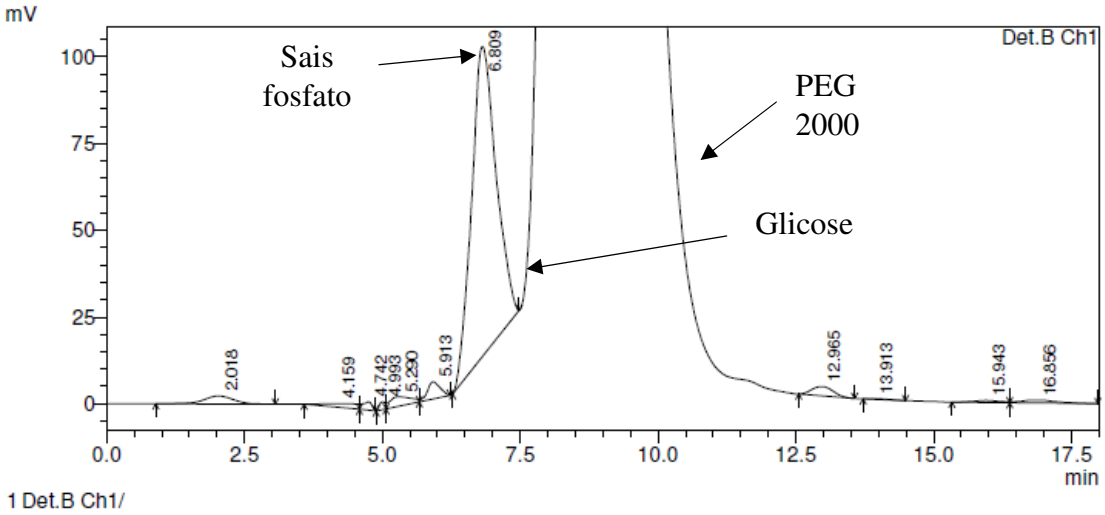


PeakTable

Detector B Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	2.002	82985	2252	2.154	1.199
2	4.132	22750	468	0.590	0.249
3	4.757	18911	1801	0.491	0.959
4	4.985	6693	1020	0.174	0.543
5	5.325	43302	1800	1.124	0.959
6	5.913	76459	4852	1.985	2.583
7	6.819	1609863	87108	41.785	46.383
8	6.994	1856385	84132	48.184	44.798
9	12.967	76266	2840	1.980	1.512
10	13.912	4422	146	0.115	0.078
11	15.944	19352	554	0.502	0.295
12	16.859	35335	830	0.917	0.442
Total		3852722	187803	100.000	100.000

Figura I.2. Cromatograma referente à fase de topo, tempo 24 h, da cinética de produção de lipase em sistema miniaturizado (erlenmeyer 10 mL) na presença de sistema aquoso bifásico: PEG 2000 (30%)/KH_2PO_4-K_2HPO_4 (pH 7,0) (7%).

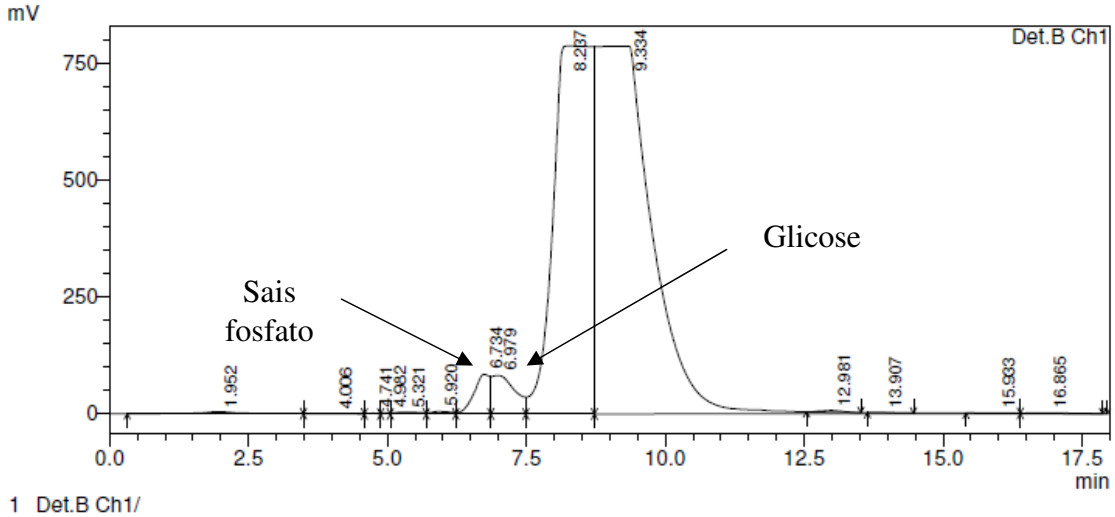


PeakTable

Detector B Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	2.018	86223	2295	2.658	2.099
2	4.159	49345	985	1.521	0.901
3	4.742	27614	2381	0.851	2.177
4	4.993	16483	2195	0.508	2.007
5	5.290	71228	2724	2.196	2.491
6	5.913	79683	4956	2.457	4.532
7	6.809	2780708	89561	85.731	81.897
8	12.965	72438	2707	2.233	2.475
9	13.913	4764	166	0.147	0.152
10	15.943	19113	549	0.589	0.502
11	16.856	35936	839	1.108	0.768
Total		3243534	109358	100.000	100.000

Figura II.3. Cromatograma referente à fase de topo, tempo 32h, da cinética de produção de lipase em sistema miniaturizado (erlenmeyer 10 mL) na presença de sistema aquoso bifásico: PEG 2000 (30%)/KH_2PO_4-K_2HPO_4 (pH 7,0) (7%).



1 Det.B Ch1/

PeakTable

Detector B Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	1.952	222154	3932	0.230	0.223
2	4.006	60478	1018	0.063	0.058
3	4.741	15893	1485	0.016	0.084
4	4.982	18425	2510	0.019	0.142
5	5.321	121894	3777	0.126	0.214
6	5.920	128109	5274	0.133	0.299
7	6.734	1693304	84434	1.752	4.787
8	6.979	2365578	82185	2.447	4.660
9	8.237	37822680	786924	39.130	44.617
10	9.334	54036333	786552	55.905	44.595
11	12.981	100140	3779	0.104	0.214
12	13.907	10031	375	0.010	0.021
13	15.933	23167	699	0.024	0.040
14	16.865	39842	807	0.041	0.046
Total		96658028	1763750	100.000	100.000

Figura II.4. Cromatograma referente à fase de topo, tempo 94h, , da cinética de produção de lipase em biorreator de 1,5 L na presença de sistema aquoso bifásico: PEG 2000 (30%)/KH_2PO_4-K_2HPO_4 (pH 7,0) (7%).

ANEXO II – DIAGRAMAS DE FASE DISPONÍVEIS NA LITERATURA

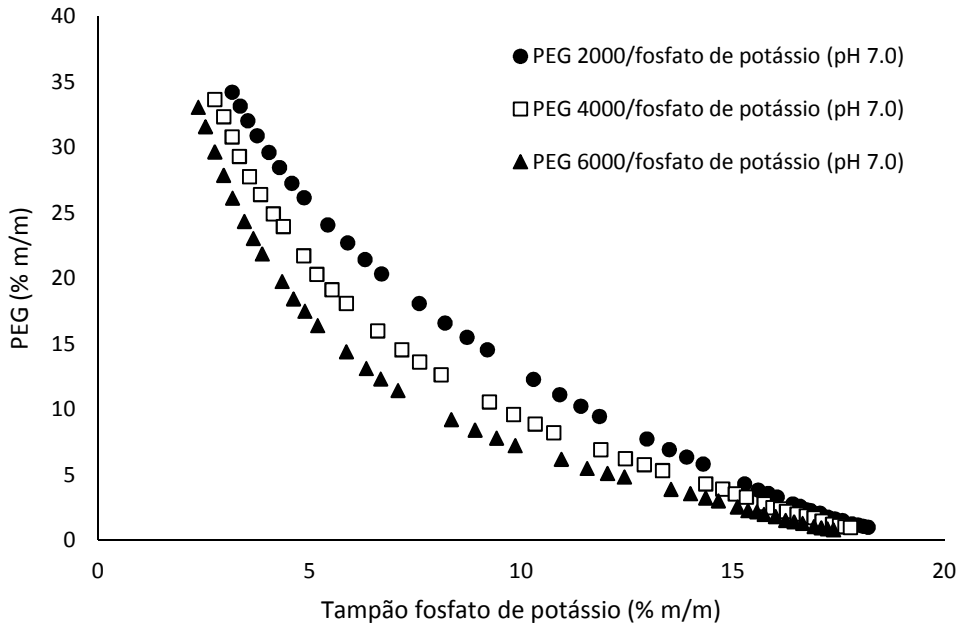


Figura II.1 Diagramas de fase para os sistemas formados por PEG/fosfato de potássio pH 7.0 obtidos a 23 ºC (GLYK; SCHEPER; BEUTEL, 2014)

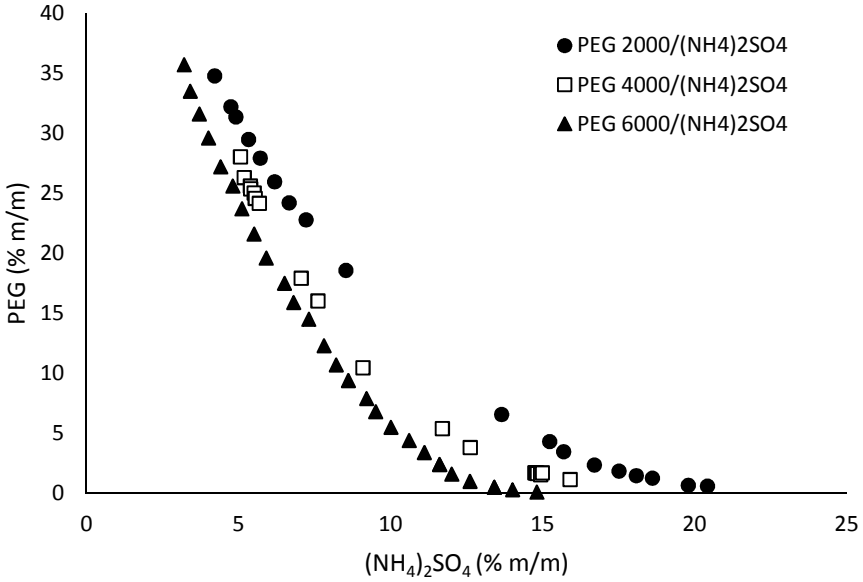


Figura II.2 Diagramas de fase para os sistemas formados por PEG2000 e 4000/$(NH_4)_2SO_4$ (GAO et al., 1991); PEG 6000/$(NH_4)_2SO_4$ (ZHANG et al., 2013) obtidos a 25 ºC

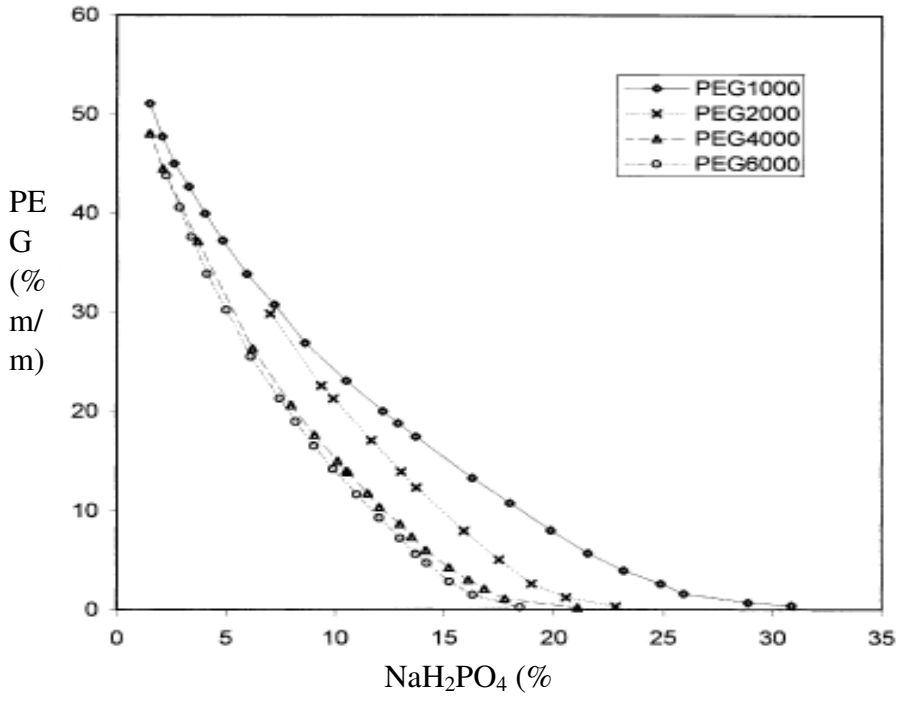


Figura II.3 Diagramas de fase para os sistemas formados por PEG/NaH_2PO_4 a 25 ºC. (ZAFARANI-MOATTAR; SADEGHI, 2001)

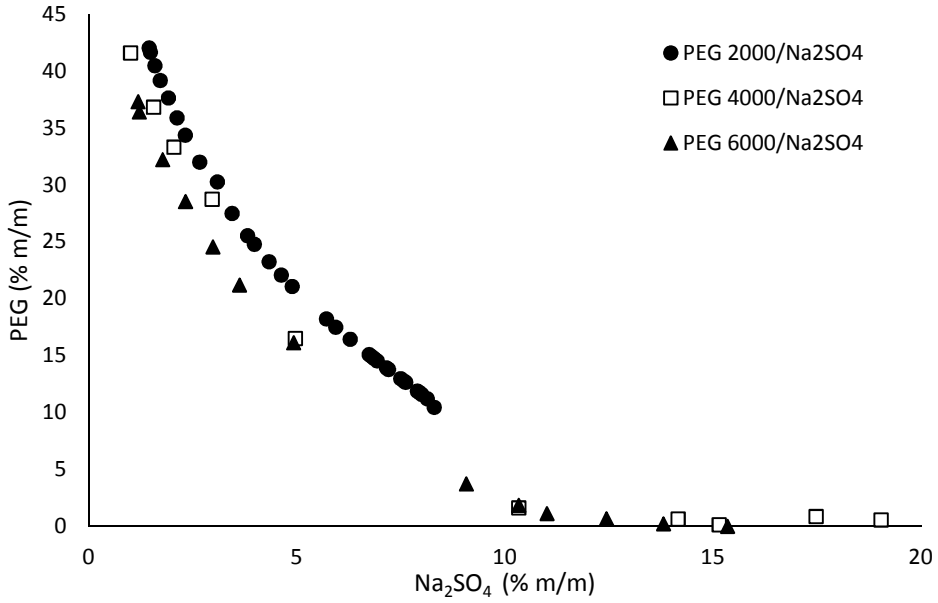


Figura II.4 Diagramas de fase para os sistemas formados por PEG 2000/NaH_2PO_4 a 25 ºC; PEG 4000/NaH_2PO_4 a 25ºC e PEG 6000/NaH_2PO_4 a 20ºC (HAMMER; PFENNIG; STUMPF, 1994).