PEDRO HENRIQUE SANTOS OLIVEIRA

Análise fisiológica e cinética do crescimento da levedura oleaginosa *Yarrowia
lipolytica* IMUFRJ 50682 em diferentes fontes de carbono

São Paulo
2014

PEDRO HENRIQUE SANTOS OLIVEIRA

Análise fisiológica e cinética do crescimento da levedura oleaginosa *Yarrowia
lipolytica* IMUFRJ 50682 em diferentes fontes de carbono

Dissertação apresentada à Escola
Politécnica da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Orientador: Prof. Dr. Andreas K. Gombert

São Paulo

2014

PEDRO HENRIQUE SANTOS OLIVEIRA

Análise fisiológica e cinética do crescimento da levedura oleaginosa *Yarrowia
lipolytica* IMUFRJ 50682 em diferentes fontes de carbono

Dissertação apresentada à Escola
Politécnica da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Área de Concentração: Engenharia
Química

Orientador: Prof. Dr. Andreas K. Gombert

São Paulo

2014

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, dede 2014

Assinatura do autor

Assinatura do orientador

Oliveira, Pedro Henrique Santos

Análise fisiológica e cinética do crescimento da levedura oleaginosa *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 em diferentes fontes de carbono / P.H.S. Oliveira. -- versão corr. -- São Paulo, 2014.

123 p.

Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Química.

**1. Leveduras (*Yarrowia*; Cinética do crescimento; Fontes de carbono) 2. Fisiologia 3. Bioquímica microbiana
I. Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Química II.t.**

Ao meus pais e irmã, fonte inesgotável de carinho, amor e inspiração.

Amo muito vocês !

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Andreas Karoly Gombert pela oportunidade concedida, pela paciência e compreensão no seu trabalho como orientador frente às dificuldades que encontrei ao longo desse projeto.

Aos meus pais pelo incentivo, exemplo e auxílio (inclusive financeiro) nessa caminhada científica.

À minha irmã, pela companhia, cuidado, carinho e amor.

À Fernanda Bacciotti pelo auxílio no desenvolvimento e na execução dos experimentos até então inéditos no grupo, pelas boas discussões científicas, por compartilhar sua experiência em microbiologia de forma generosa e despretensiosa e finalmente pela amizade, paciência e carinho.

Às técnicas de laboratório Orlinda Azevedo e Andréa Silva pelo dedicado trabalho na manutenção e ordem dos laboratórios, pelas brincadeiras, descontração, amizade e carinho.

A todos os meus colegas de GEnBio, em especial, prof. Adriano, prof. Aldo, prof.^a Beatriz, Bianca, Bruno Labate, Bruno Oishi, Carolina, Daniel, Daniela, Felipe, Guilherme, Letícia Veloso (minha *best* do laboratório), Kelly, Larissa, Luís Franco, Maira, Mariana, Luiz Castel, Sarah, Thiago, Rafael Ferraz, Rafael da Gama, Sebastián (Tião) e Wesley pela ajuda generosa quando solicitada, pelas boas discussões científicas e filosóficas, pela amizade, pelo carinho e companheirismo.

A todo pessoal da secretaria de pós-graduação, em especial, a Maria Elisete que como uma grande mãe, cuida de todos nós na pós-graduação.

E finalmente ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado que me permitiu sobreviver durante essa empreitada no mundo científico das leveduras.

*“In the beginning there was yeast, and it raised bread, brewed beer, and made wine. After many not days but centuries and even millennia later, it was named *Saccharomyces cerevisiae*. After more years and centuries there was another yeast, and it was named *Schizosaccharomyces pombe*; now there were two stars in the yeast heaven. In only a few more years there were other yeasts, and then more, and more, and more. The era of the non-conventional yeasts had begun.”*

(SPENCER, 2002)

RESUMO

Yarrowia lipolytica é uma levedura estritamente aeróbia e oleaginosa, pertencente ao filo *Ascomycota*. Atualmente é uma das espécies de levedura não-convencional mais estudadas para aplicações biotecnológicas. Se comparada a outras leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae*, observam-se notáveis distinções relacionadas a sua fisiologia, genética e filogenia. É conhecida sua capacidade de excretar altas quantidades de ácidos orgânicos (ácidos cítrico, isocítrico, cetoglútarico e pirúvico) e de secretar diferentes enzimas (lipases, proteases etc.), permitindo a degradação de diferentes substratos, incluindo os de caráter hidrofóbico. O presente trabalho teve como objetivo implementar técnicas de cultivo em meio sólido ou líquido para a levedura *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, que permitissem avaliar sua capacidade em utilizar diferentes fontes de carbono, além de calcular os principais parâmetros da fisiologia celular, como velocidades específicas e fatores de conversão. Nos cultivos em meio sólido, verificou-se que esta levedura apresenta fraco ou nenhum crescimento nas fontes de carbono sacarose, xilose, citrato e acetato. Além disto, observou-se que a tiamina é fator de crescimento essencial ao desenvolvimento desta levedura quando cultivada em glicose e glicerol. Verificou-se também que esta linhagem apresenta maior tolerância ao NaCl, se comparada à linhagem *Y. lipolytica* W29 (tradicionalmente empregada nos estudos acadêmicos). Nos cultivos em meio líquido, foi estabelecida uma composição de meio de cultivo totalmente definido, que permitiu o crescimento desta levedura com velocidade específica máxima de $0,35 \text{ h}^{-1}$ em glicose e $0,46 \text{ h}^{-1}$ em glicerol, como únicas fontes de carbono. Nestes cultivos, os fatores de conversão de substrato a células, durante a fase exponencial de crescimento, foram $0,32 \text{ g}$ de massa seca de células/g glicose e $0,48 \text{ g}$ de massa seca de células/g glicerol. Durante os cultivos em meio líquido, que foram realizados a 28°C e 200 rotações por minuto em incubador rotativo, empregando frascos do tipo erlenmeyer com deflectores, fechados com algodão e um quinto do volume ocupado com meio líquido e $2,5 \text{ g.l}^{-1}$ iniciais da fonte de carbono, não foi observada a formação de nenhum metabólito extracelular, o que é indicativo de um metabolismo energético puramente respiratório. Nestas condições, usando-se ureia como fonte de nitrogênio, o pH permaneceu estável do início ao final dos cultivos. Observou-se também que a levedura estudada não é capaz de crescer em pH menor que 2,0.

Palavras-Chave: Levedura. Levedura oleaginosa. *Yarrowia lipolytica*. Cinética Microbiana. Fisiologia de leveduras.

ABSTRACT

Yarrowia lipolytica is a dimorphic, strictly aerobic and oleaginous yeast belonging to the phylum *Ascomycota*. It is currently one of the non-conventional yeast species most studied for biotechnological applications. If compared to other yeasts, such as *S. cerevisiae*, notable distinctions are observable related to its physiology, genetics and phylogeny. It is well known for its ability to secrete high quantities of organic acids (citric acid, isocitric acid, ketoglutaric acid and pyruvic acid) and innate ability to secrete various enzymes (lipases, proteases etc.), which allows the species to degrade different substrates, including hydrophobic ones. The present work aimed at the implementation of cultivation techniques in solid or liquid media for the yeast *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, enabling to assess its ability to assimilate different carbon sources, and to calculate the main parameters of cellular physiology, such as specific growth rate and specific yields. In solid media assays, it was found that *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 presents a weak to almost null growth when sucrose, xylose, citrate and acetate are used as sole carbon sources. Furthermore, it was observed that thiamine is an essential growth factor for the proper assimilation of the carbon sources glucose and glycerol. Response towards osmotic stress was assessed in complex solid media, in which the strain *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 exhibited higher halotolerance, up to 1,0 M NaCl, if compared to the other strain *Yarrowia lipolytica* W29 (traditionally employed in academic studies). A defined liquid medium composition was adapted, enabling the assessment of the specific growth rates for both strains, of which *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 exhibited specific growth rates of 0.35 h^{-1} on glucose and 0.46 h^{-1} on glycerol, when used individually as sole carbon sources. On those assays, the substrate to biomass yields, during the exponential growth phase, was 0.32 g cell dry weight/g glucose and 0.48 g cell dry weight/g glycerol. During the cultivations in liquid medium, which were carried out in thermostatted orbital shaker incubator at 200 rpm and 28 °C, employing baffled cotton capped erlenmeyer flasks with a fifth of its volume occupied with the growth medium and 2.5 g.l^{-1} of the carbon source of choice, it was not observed any extracellular metabolic formation, indicating a pure respiratory metabolism. The addition of urea as nitrogen source was crucial at maintaining a stable pH during the whole cultivations. It was also observed that the studied yeast strains are not capable of growing at a pH lower than 2.0.

Keywords: Yeast. Oleaginous. *Yarrowia lipolytica*. Microbial kinetic. Yeast physiology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: ÁRVORE FILOGENÉTICA DOS EUCARIOTOS BASEADO EM UMA SÍNTESE DAS ULTRAESTRUTURAS E EVIDÊNCIAS BIOLÓGICAS E MOLECULARES DAS CÉLULAS. PODE-SE VISUALIZAR A MAIOR PROXIMIDADE FILOGENÉTICA ENTRE OS ANIMAIS E FUNGOS QUANDO COMPARADO ÀS PLANTAS. FIGURA RETIRADA DE CAVALIER-SMITH, 2003.	22
FIGURA 2: ALOCAÇÃO FILOGENÉTICA DA <i>YARROWIA LIPOLYTICA</i> E ESPÉCIES ADJACENTES POR DETERMINAÇÃO DE ANÁLISE DE MÁXIMA PARCIMÔNIA DO SEQUENCIAMENTO GENÉTICO D1/D2 LSU rRNA. FIGURA RETIRADA DE KURTZMAN; FELL E BOEKHOUT (2011).	23
FIGURA 3: CICLO DO GLIOXILATO (CG) APRESENTADO DE FORMA A EVIDENCIAR SUA SEMELHANÇA COM O CICLO DO ÁCIDO CÍTRICO (CAC) E SUA PARTICIPAÇÃO NA FORMAÇÃO DOS PRINCIPAIS INTERMEDIÁRIOS, SUCCINATO E MALATO. LINHA TRACEJADA REPRESENTA AS ETAPAS ESPECÍFICAS AO CG, LINHA NORMAL, AS ETAPAS ESPECÍFICAS AO CAC, LINHA EM NEGRITO, AS ETAPAS COMPARTILHADAS PELO CG E CAC E LINHA BRANDA, A ETAPA DESTINADA A GLICONEOGÊNESE. FIGURA RETIRADA DE LORENZ E FINK (2002).	29
FIGURA 4: ESQUEMA DA DEGRADAÇÃO DE LIPÍDEOS (ENZIMAS EM <i>ITÁLICO</i>) E POTENCIAIS PRECURSORES NA PRODUÇÃO DE FLAVORIZANTES E AROMATIZANTES (<i>SUBLINHADOS</i>). *A ENZIMA HIDROPERÓXIDO LIASE É OBTIDA POR ROTA HETERÓLOGA. FIGURA ADAPTADA DE WACHÉ ET AL. (2006).	40
FIGURA 5: ESQUEMA COMPARANDO AS ETAPAS NECESSÁRIAS PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR <i>Y. LIPOLYTICA</i> E <i>A. NIGER</i> . PRODUÇÃO DE AC EMPREGANDO LEVEDURAS, DENTRE ELAS <i>Y. LIPOLYTICA</i> , REPRESENTARIAM REDUÇÃO DAS ETAPAS DE PRODUÇÃO E GERAÇÃO DE EFLUENTES POLUENTES (METAIS PESADOS) E SÓLIDOS ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), TIPICAMENTE OBTIDOS NOS PROCESSOS QUE EMPREGAM <i>A. NIGER</i> . FIGURA ADAPTADA DE FINOGENOVA ET AL. (2005).	43
FIGURA 6: ESQUEMA DO PLAQUEAMENTO ADOTADO PARA TODOS OS ENSAIOS DE DILUIÇÃO SERIADA. W29 REPRESENTA O SEGMENTO DA PLACA CONTENDO SOMENTE OS SPOTS DA LINHAGEM <i>Y. LIPOLYTICA</i> W29. UFRJ REPRESENTA O SEGMENTO DA PLACA CONTENDO SOMENTE OS SPOTS DA LINHAGEM <i>Y. LIPOLYTICA</i> IMUFRJ 50682.	61
FIGURA 7: SISTEMA DE CULTIVO EM FRASCO AGITADO DESENVOLVIDO NO GRUPO DE LEVEDURAS PARA REALIZAÇÃO DE CINÉTICAS DE CRESCIMENTO DE LEVEDURAS. A ESTERILIZAÇÃO ERA FEITA COM TODO O SISTEMA DE CULTIVO MONTADO. A PINÇA DE MOHR ERA USADA PARA PINÇAR O TUBO FLEXÍVEL, EVITANDO-SE ASSIM A CONTAMINAÇÃO DO MEIO APÓS A ESTERILIZAÇÃO E DURANTE O CULTIVO/AMOSTRAGENS.	64
FIGURA 8: CINÉTICA DE CRESCIMENTO PARA AS LINHAGENS <i>Y. LIPOLYTICA</i> W29 E IMUFRJ 50682 EM MDB CONTENDO SULFATO DE AMÔNIO COMO FONTE DE NITROGÊNIO E GLICOSE COMO FONTE DE CARBONO. PARA FINS ILUSTRATIVOS, SÃO APRESENTADOS SOMENTE OS DADOS DE UMA DAS DUAS REPETIÇÕES REALIZADAS.	88
FIGURA 9: DIFERENÇA NA COLORAÇÃO DOS PELLETS DE CÉLULAS OBTIDOS DO CULTIVO DA LINHAGEM <i>Y. LIPOLYTICA</i> W29 EM MEIO COMPLEXO YPD (ESQUERDA) E MEIO DEFINIDO (DIREITA), AMBAS APÓS SUCESSIVAS RESSUPENSÕES EM ÁGUA DESTILADA (LAVAGEM), SUGERINDO QUE CÉLULAS DE <i>Y. LIPOLYTICA</i> SÃO CAPAZES DE ADERIR ALCUNS COMPONENTES COMPLEXOS DO MEIO YPD.	90
FIGURA 10: IMAGENS OBTIDAS COM LENTE OBJETIVA DE IMERSÃO EM ÓLEO DE 100X. À ESQUERDA, CÉLULAS DA LINHAGEM IMUFRJ 50682 E, À DIREITA, CÉLULAS DA LINHAGEM W29, TODAS CULTIVADAS EM MEIO YPD POR 12 H.	91
FIGURA 11: IMAGENS OBTIDAS COM LENTE OBJETIVA DE IMERSÃO EM ÓLEO DE 100X. À ESQUERDA, CÉLULAS DA LINHAGEM W29 CULTIVADAS EM MEIO MDBU COM GLICOSE E À DIREITA EM GLICEROL. A PRIMEIRA ETAPA DO CULTIVO FOI REALIZADO EM MDBU COM 20 g.L ⁻¹ DE GLICOSE, PARA OBTENÇÃO DE CÉLULAS, QUE FORAM CENTRIFUGADAS E RESSUPENSAS EM MDBU COM 20 g.L ⁻¹ GLICOSE OU GLICEROL SEM ADIÇÃO DE TIAMINA PARA INCUBAÇÃO POR 72 H.	92
FIGURA 12: FORMAÇÃO DE ESPUMA EM CULTIVO DE <i>Y. LIPOLYTICA</i> IMUFRJ 50682 EM MDBU COM 20 g.L ⁻¹ INICIAIS DE GLICOSE SEM ADIÇÃO DE ANTIESPUMANTE. FOTO RETIRADA APÓS 24 H DE INCUBAÇÃO EM SHAKER ROTATIVO A 28 °C E 200 RPM. ...	93
FIGURA 13: PERFIS DE CONSUMO DE GLICOSE [W29 (▲) E IMUFRJ 50682 (▼)] E GERAÇÃO DE BIOMASSA [W29 (●) E IMUFRJ 50682 (■)] PROVENIENTE DOS CULTIVOS EM FRASCO AGITADO A 200 RPM E 28 °C, REALIZADOS EM MDBU ATÉ A EXAUSTÃO DA FONTE DE CARBONO GLICOSE. AMOSTRAS FORAM RETIRADAS A CADA HORA PARA QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR E DE SUBSTRATO (VIDE ÍTEM 4.9). OS DADOS OBTIDOS NESTE CULTIVO FORAM UTILIZADOS NA DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS m_{MAX} E YX/SEX (VIDE FIGURAS 19 E 20 NO APÊNDICE). PARA FINS ILUSTRATIVOS, SÃO APRESENTADOS SOMENTE OS DADOS DE UMA DAS TRÊS REPETIÇÕES REALIZADAS. PARA OS DADOS UTILIZADOS NA OBTENÇÃO DAS CURVAS, VIDE TABELA 11.	95
FIGURA 14: IMAGENS OBTIDAS COM OBJETIVA DE IMERSÃO EM ÓLEO DE 100X. À ESQUERDA, CÉLULAS DA LINHAGEM W29 E À DIREITA IMUFRJ 50682 CULTIVADAS EM MDBU COM GLICOSE. FOTOS RETIRADAS AO FINAL DO CULTIVO, APÓS 12 H DA INOCULAÇÃO (REFERENTES AOS DADOS APRESENTADOS NA FIGURA 13).	95
FIGURA 15: PERFIS DE CONSUMO DE GLICEROL [W29 (▲) E IMUFRJ 50682 (▼)] E GERAÇÃO DE BIOMASSA [W29 (●) E IMUFRJ 50682 (■)] PROVENIENTE DOS CULTIVOS EM FRASCO AGITADO A 200 RPM E 28 °C, REALIZADOS EM MDBU ATÉ A EXAUSTÃO DA FONTE DE CARBONO GLICEROL. AMOSTRAS FORAM RETIRADAS A CADA HORA PARA QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR E DE SUBSTRATO (VIDE ÍTEM 4.9). OS DADOS OBTIDOS NESTE CULTIVO FORAM UTILIZADOS NA DETERMINAÇÃO DOS	

PARÂMETROS M_{MAX} E YX/S_{EXP} (VIDE FIGURAS 21 E 22 NO APÊNDICE). PARA FINS ILUSTRATIVOS, SÃO APRESENTADOS SOMENTE OS DADOS DE UMA DAS TRÊS REPETIÇÕES REALIZADAS. PARA OS DADOS UTILIZADOS NA OBTENÇÃO DAS CURVAS, VIDE TABELA 12.	96
FIGURA 16: IMAGENS OBTIDAS COM OBJETIVA DE IMERSÃO EM ÓLEO DE 100X. À ESQUERDA, CÉLULAS DA LINHAGEM W29 E À DIREITA IMUFRJ 50682 CULTIVADAS EM MDBU COM GLICEROL. FOTOS RETIRADAS AO FINAL DO CULTIVO, APÓS 10 H DA INOCULAÇÃO (REFERENTES AOS DADOS APRESENTADOS NA FIGURA 15).	96
FIGURA 18: CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA OBTENÇÃO DOS FATORES DE CONVERSÃO DAS MEDIDAS DE ABS_{600} PARA CONCENTRAÇÃO CELULAR EM MASSA SECA $[G.L^{-1}]$. PARA LINHAGEM W29, OS FATORES DE CONVERSÃO OBTIDOS PARA CULTIVOS EM GLICOSE FOI $(0,593 \pm 0,017)$ E PARA GLICEROL $(0,751 \pm 0,014)$. PARA A LINHAGEM IMUFRJ 50682, OS FATORES DE CONVERSÃO OBTIDOS PARA CULTIVOS EM GLICOSE FOI $(0,515 \pm 0,015)$ E PARA GLICEROL $(0,647 \pm 0,016)$	110
FIGURA 19: REGRESSÕES LINEARES PARA OBTENÇÃO DA VELOCIDADE ESPECÍFICA MÁXIMA DE CRESCIMENTO (M_{MAX}) EM GLICOSE PARA W29 $(0,2666 \pm 0,0063$ E $R^2 = 0,9861)$ E IMUFRJ 50682 $(0,3514 \pm 0,0092$ E $R^2 = 0,9850)$. OS PONTOS REPRESENTAM OS VALORES DAS TRIPLICATAS E A LINHA TRACEJADA AO REDOR DA LINEARIZAÇÃO REPRESENTA O INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95%.....	111
FIGURA 20: REGRESSÕES LINEARES PARA OBTENÇÃO DOS FATORES DE CONVERSÃO DO SUBSTRATO GLICOSE A BIOMASSA SECA NA FASE EXPONENCIAL (YX/S_{EXP}) PARA W29 $(-0,3418 \pm 0,013; -0,3339 \pm 0,017; -0,3758 \pm 0,011)$ E IMUFRJ 50682 $(-0,3214 \pm 0,012; -0,3322 \pm 0,010; -0,3129 \pm 0,012)$	112
FIGURA 21: REGRESSÕES LINEARES PARA OBTENÇÃO DA VELOCIDADE ESPECÍFICA MÁXIMA DE CRESCIMENTO (M_{MAX}) EM GLICEROL PARA W29 $(0,3599 \pm 0,0097$ E $R^2 = 0,9883)$ E IMUFRJ 50682 $(0,4618 \pm 0,0177$ E $R^2 = 0,9769)$. OS PONTOS REPRESENTAM OS VALORES DAS TRIPLICATAS E A LINHA TRACEJADA AO REDOR DA LINEARIZAÇÃO REPRESENTA O INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95%.....	113
FIGURA 22: REGRESSÕES LINEARES PARA OBTENÇÃO DOS FATORES DE CONVERSÃO DO SUBSTRATO GLICEROL A BIOMASSA SECA NA FASE EXPONENCIAL (YX/S_{EXP}) PARA W29 $(-0,5107 \pm 0,0274; -0,5126 \pm 0,0099; -0,5044 \pm 0,0284)$ E IMUFRJ 50682 $(-0,4944 \pm 0,0330; -0,4472 \pm 0,0370; -0,5038 \pm 0,0348)$	114
FIGURA 23: ESQUEMA DE UMA CÉLULA GENÉRICA DE LEVEDURA, COM INDICAÇÃO DAS PRINCIPAIS ROTAS METABÓLICAS ENVOLVIDAS NO METABOLISMO DE GLICOSE, MALTOSE, GALACTOSE, LACTOSE, SACAROSE, FRUTOSE, MANOSE, XILOSE, GLICEROL E ETANOL. OS CÍRCULOS NA MEMBRANA CELULAR INDICAM A PRESENÇA DE MECANISMOS DE TRANSPORTE OU PROTEÍNAS ASSOCIADAS A ESSE PROCESSO. O TRONCO PRINCIPAL, EM LINHA DESTACADA E COM PONTOS, REPRESENTA A VIA GLICOLÍTICA, CULMINANDO DENTRO DE UMA MITOCÔNDRIA GENÉRICA, REPRESENTANDO AS PRINCIPAIS REAÇÕES DO CICLO DO ÁCIDO CÍTRICO. LINHAS PONTILHADAS REPRESENTAM AS VIAS DE FONTES DE CARBONO NÃO FERMENTÁVEIS. FIGURA REPRODUZIDA DE FLORES ET AL. (2000).	122

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE ASSIMILAÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO E NITRATO PARA <i>Y. LIPOLYTICA</i> . ADAPTADO DE KURTZMAN; FELL E BOEKHOUT (2011).	26
TABELA 2: ÁCIDOS ORGÂNICOS PRODUZIDOS POR DIFERENTES LINHAGENS DE <i>Y. LIPOLYTICA</i> EM DIFERENTES SUBSTRATOS. ADAPTADO DE FINOGENOVA ET AL., (2005). * PETROLATO REFERE-SE A UMA MISTURA DE HIDROCARBONETOS DE ALTO PESO MOLECULAR, TAMBÉM CONHECIDO COMO VASELINA.	41
TABELA 3: LISTAGEM DOS PRINCIPAIS ELEMENTOS QUE COMPREENDEM A CLASSE DE MACRONUTRIENTES INDISPENSÁVEIS AO DESENVOLVIMENTO DE MICRORGANISMOS, SUA FORMA ASSIMILÁVEL E PRINCIPAL FONTE. TABELA ADAPTADA DE MADIGAN ET AL. 2010.....	46
TABELA 4: LISTAGEM DOS PRINCIPAIS ELEMENTOS QUE COMPREENDEM A CLASSE DE MICRONUTRIENTES NECESSÁRIOS AO DESENVOLVIMENTO DE MICRORGANISMOS E SUA FUNÇÃO NO METABOLISMO CELULAR. A MAIORIA DESSES ELEMENTOS É NECESSÁRIO EM PEQUENAS QUANTIDADES E SÃO OBTIDOS DE FONTES INORGÂNICAS (SAIS DOS RESPECTIVOS COMPOSTOS). TABELA ADAPTADA DE MADIGAN ET AL. 2010.	47
TABELA 5: LISTAGEM DOS PRINCIPAIS FATORES DE CRESCIMENTO E SUA FUNÇÃO NO METABOLISMO CELULAR. TABELA ADAPTADA DE MADIGAN ET AL. 2010. CONTINUA NA PÁGINA 48.....	47
TABELA 6: ESQUEMA DA COMPOSIÇÃO DAS DIFERENTES PLACAS DE MDBS. O SÍMBOLO (+) INDICA A PRESENÇA DO COMPOSTO E (-) INDICA A AUSÊNCIA. CNC REPRESENTA O CONTROLE NEGATIVO DE CRESCIMENTO E CPC O CONTROLE POSITIVO DE CRESCIMENTO.....	59
TABELA 7: RESULTADOS DOS ENSAIOS EM MEIO SOLIDIFICADO (MDBS) PARA AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE ASSIMILAÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO (GLICOSE, GLICEROL, SACAROSE, XILOSE, CITRATO E ACETATO). OS RESULTADOS APRESENTADOS SÃO REFERENTES ÀS 48 H DE INCUBAÇÃO. NÃO SÃO APRESENTADOS OS RESULTADOS OBTIDOS PARA ETANOL (VIDE ITEM 5.1.2.2).....	71
TABELA 8: RESULTADOS COMPILADOS E CLASSIFICADOS DE ACORDO COM O CRESCIMENTO DE <i>Y. LIPOLYTICA</i> OBSERVADO NAS FONTES DE CARBONO INVESTIGADAS (GLICOSE, GLICEROL, SACAROSE, XILOSE, CITRATO E ACETATO) NAS DIFERENTES COMPOSIÇÕES DE MEIO DEFINIDO SOLIDIFICADO (MDBS).	72
TABELA 9: RESULTADOS DAS DILUIÇÕES EM SÉRIE PARA AVALIAÇÃO DA RESPOSTA AO ESTRESSE SALINO NO CRESCIMENTO DAS LINHAGENS. FOTOGRAFIAS RETIRADAS APÓS 48 H DE INCUBAÇÃO A 30 °C. YPD REPRESENTA O CONTROLE POSITIVO DO CRESCIMENTO, NO QUAL NÃO HOUE ADIÇÃO DE NaCl. A CONCENTRAÇÃO DE 0,6 M DE NaCl REPRESENTA A SALINIDADE MÉDIA ABSOLUTA DOS OCEANOS.	81
TABELA 10: PARÂMETROS CINÉTICOS E FISIOLÓGICOS PARA OS CULTIVOS REALIZADOS EM MDBU PARA AS FONTES DE CARBONO GLICOSE E GLICEROL. OS DADOS APRESENTADOS SÃO EQUIVALENTES ÀS MÉDIAS OBTIDAS PARA AS TRIPLICATAS, JUNTAMENTE COM O ERRO ASSOCIADO (SEM).	97
TABELA 11: DADOS REFERENTES AOS CULTIVOS DE AMBAS AS LINHAGENS DE <i>Y. LIPOLYTICA</i> EM MDBU E 2,5 g.L ⁻¹ INICIAIS DE GLICOSE. VALORES PLOTADOS NO GRÁFICO DA FIGURA 13 (MAIS INFORMAÇÕES RELATIVAS AO CULTIVO, VIDE FIGURA E TEXTO ASSOCIADO).	115
TABELA 12: DADOS REFERENTES AOS CULTIVOS DE AMBAS AS LINHAGENS DE <i>Y. LIPOLYTICA</i> EM MDBU E 2,5 g.L ⁻¹ INICIAIS DE GLICEROL. VALORES PLOTADOS NO GRÁFICO DA FIGURA 15 (MAIS INFORMAÇÕES RELATIVAS AO CULTIVO, VIDE FIGURA E TEXTO ASSOCIADO).	116
TABELA 13: RELAÇÃO DE ALGUNS DOS EXPERIMENTOS REALIZADOS, INCLUINDO OS DESTE TRABALHO E OS DIFERENTES TESTES PRELIMINARES. ESTÃO RELACIONADOS COM OS PRINCIPAIS OBJETIVOS, AS LINHAGENS DE MICRORGANISMOS EMPREGADAS, AS PRINCIPAIS CONCLUSÕES OBTIDAS E SE OS RESULTADOS ENCONTRAM-SE NO TEXTO DESTE TRABALHO (COM AS SESSÕES DO TEXTO INDICADAS). CONTINUA NAS PÁGINAS 118, 119, 120 E 121.	117
TABELA 14: RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS GENÔMICAS OBTIDAS ATRAVÉS DO SEQUENCIAMENTO DE DIFERENTES LEVEDURAS, APRESENTADAS COM SUA NOMENCLATURA ORIGINAL DE PUBLICAÇÃO (NOVAS TAXONOMIAS EM PARÊNTESES). A PLOIDIA É MOSTRADA PARA AS LINHAGENS COMPLETAMENTE SEQUENCIADAS, JUNTAMENTE COM O TAMANHO GENÔMICO (EM MEGABASES, EXCLUINDO-SE O DNA RIBOSSOMAL). CDS (CODING DNA SEQUENCE) REPRESENTA A QUANTIDADE PREVISTA DE GENES CODIFICADORES DE PROTEÍNAS EM CADA ESPÉCIE. TABELA ADAPTADA DE DUJON (2010).....	123

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Abs ₆₀₀	Absorbância a 600 nm
AC	Ácido cítrico
ACG	Ácido α-cetoglutárico
AMD	Adenosina monofosfato
AIC	Ácido Iso-cítrico
CAC	Ciclo do Ácido Cítrico
CDS	Coding DNA Sequence – Sequência de DNA codificadora de proteínas
CG	Ciclo do Glioxilato
CNC	Controle Negativo de Crescimento
CPC	Controle Positivo de Crescimento
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DNA	DeoxyriboNucleic Acid – Ácido Desoxirribonucleído
DQO	Demanda Química de Oxigênio
F6F	Frutose-6-fosfato
FDA	Food and Drug Administration
G3P	Glicerol-3-fosfato
G6P	Glicose-6-fosfato
GRAS	Generally Regarded As Safe
k_{La}	Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio
MDB	Meio Definido Barth
MDBS	Meio Definido Barth Solidificado
MDBU	Meio Definido Barth com Ureia
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
PFC	Perfluorocarboneto
SH	Substratos Hidrofóbicos
YNB	Yeast Nitrogene Base – Base para cultivo de leveduras com fonte de nitrogênio.
$Y_{P/S}$	Rendimento produto substrato
$Y_{X/S}^{exp}$	Fator de conversão de substrato a biomassa na fase exponencial; rendimento celular
YPD	Yeast extract Peptone Dextrose – Extrato de levedura, peptona e glicose.
YPDS	Yeast extract Peptone Dextrose Solidificado – Extrato de levedura, peptona e dextrose solidificado
XDH	Xilitol desidrogenase
XR	Xilose redutase

r_s^{max}	Velocidade específica máxima de consumo de substrato na fase exponencial
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> – Desvio padrão da média
$\mu_{m\acute{a}x}$	Velocidade específica máxima de crescimento

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	18
3.1	LEVEDURAS NÃO-CONVENCIONAIS.....	18
3.2	HISTÓRIA DA LEVEDURA NÃO-CONVENCIONAL <i>YARROWIA LIPOLYTICA</i>	20
3.3	FILOGENIA E ECOLOGIA DE <i>Y. LIPOLYTICA</i>	21
3.4	METABOLISMO CENTRAL DE CARBONO EM LEVEDURAS	24
3.4.1	<i>Captação de açúcares e primeiras etapas do metabolismo</i>	25
3.4.2	<i>O destino final do piruvato</i>	27
3.4.3	<i>Reações anapleróticas</i>	28
3.4.4	<i>A via das pentose-fosfato e sua relação com o metabolismo de xilose</i>	30
3.4.4.1	Metabolismo da xilose (via XR-XDH).....	31
3.4.5	<i>Metabolismo de etanol</i>	32
3.4.6	<i>Metabolismo de glicerol</i>	32
3.5	POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE <i>Y. LIPOLYTICA</i>	33
3.5.1	<i>Biorremediação de solos e ambientes marinhos poluídos por hidrocarbonetos</i>	34
3.5.2	<i>Tratamento de efluentes ricos em óleos</i>	35
3.5.3	<i>Produção de lipases</i>	36
3.5.4	<i>Produção de proteínas heterólogas</i>	38
3.5.5	<i>Produção de flavorizantes e aromatizantes</i>	39
3.5.6	<i>Produção de ácidos orgânicos</i>	40
3.5.7	<i>Produção de óleo microbiano</i>	44
3.6	MEIOS PARA O CULTIVO DE <i>Y. LIPOLYTICA</i> E OUTRAS LEVEDURAS.....	46
3.6.1	<i>Meios de cultura complexos</i>	48
3.6.2	<i>Meios de cultura definidos</i>	49
4	MATERIAIS E MÉTODOS EXPERIMENTAIS	51
4.1	PREPARAÇÃO DE MATERIAIS	51
4.2	EQUIPAMENTOS.....	51
4.3	MEIOS DE CULTURA	51
4.3.1	<i>Meio YPD</i>	51
4.3.2	<i>Meio definido Barth (MDB)</i>	52
4.3.3	<i>Meios definidos adaptados</i>	53
4.4	MICRORGANISMOS.....	54
4.5	ESTOCAGEM	55
4.6	PREPARAÇÃO DO INÓCULO E INOCULAÇÃO.....	56
4.6.1	<i>Pré-inóculo</i>	56
4.6.2	<i>Inóculo</i>	56
4.6.2.1	Cálculo do volume de inóculo	57
4.6.2.2	Lavagem	57
4.6.3	<i>Inoculação</i>	58
4.7	ENSAIOS DE DILUIÇÃO SERIADA EM MEIO SOLIDIFICADO.....	58
4.7.1	<i>Diluição seriada para análise qualitativa da assimilação de diferentes fontes de carbono em diferentes condições de cultivo</i>	59
4.7.1.1	Preparação das placas com MDB solidificado	59
4.7.1.2	Diluição seriada, plaqueamento e incubação	60
4.7.2	<i>Diluição seriada em meio YPD solidificado para análise do estresse salino</i>	61
4.7.2.1	Preparação das placas com YPDS e cloreto de sódio	61
4.7.2.2	Diluição seriada, plaqueamento e incubação do teste de estresse salino.....	62
4.8	ENSAIOS QUANTITATIVOS EM MEIO LÍQUIDO	62

4.8.1	<i>Preparação do meio de cultivo para os ensaios quantitativos</i>	62
4.8.2	<i>Sistema de cultivo e de amostragem</i>	63
4.8.3	<i>Cultivo e amostragem</i>	64
4.9	MÉTODOS ANALÍTICOS	65
4.9.1	<i>Quantificação da concentração celular</i>	65
4.9.2	<i>Cálculo dos parâmetros cinéticos associados aos cultivos em batelada</i>	66
4.9.3	<i>Determinação da concentração da fonte de carbono</i>	67
4.9.4	<i>Identificação de metabólitos extracelulares</i>	67
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
5.1	ENSAIOS DE DILUIÇÃO EM SÉRIE	68
5.1.1	<i>Resultados preliminares de cultivos em meio solidificado</i>	68
5.1.1.1	Determinação da temperatura de incubação	68
5.1.1.2	Capacidade biossintética do gênero <i>Yarrowia</i>	69
5.1.2	<i>Assimilação de diferentes fontes de carbono</i>	70
5.1.2.1	Glicose e glicerol, as fontes de carbono que permitiram bom crescimento de <i>Y. lipolytica</i>	72
5.1.2.2	Etanol	74
5.1.2.3	Sacarose	74
5.1.2.4	Xilose	78
5.1.2.5	Citrato	79
5.1.2.6	A relação entre os metabolismos de acetato e etanol	80
5.1.3	<i>Tolerância ao estresse salino (halotolerância)</i>	80
5.2	ENSAIOS QUANTITATIVOS EM MEIO LÍQUIDO	83
5.2.1	<i>Considerações preliminares sobre o cultivo de <i>Y. lipolytica</i> em meio líquido</i>	83
5.2.2	<i>Teste de diferentes meios de cultivo</i>	85
5.2.3	<i>Seleção do meio de cultivo definido e estabelecimento da metodologias de cultivo</i>	86
5.2.3.1	Meio de cultivo definido para o cultivo de <i>Y. lipolytica</i> em frasco agitado	86
5.2.3.2	Preparação do inóculo	88
5.2.3.3	Formação de espuma e adição de antiespumante	92
5.2.4	<i>Cinética de crescimento em glicose e glicerol</i>	94
5.2.5	<i>Formação de metabólitos extracelulares</i>	99
6	CONCLUSÕES	101
7	BIBLIOGRAFIA	103

1 INTRODUÇÃO

Esta é a primeira dissertação de mestrado abordando a levedura *Yarrowia lipolytica* no Grupo de Engenharia de Bioprocessos (GEnBio) do Departamento de Engenharia Química (DEQ) da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo (EPUSP). Em paralelo, estudos relacionados à capacidade desta levedura em acumular óleo foram desenvolvidos por Fernanda Bacciotti, aluna de mestrado do mesmo grupo de pesquisa.

O trabalho insere-se numa colaboração em pesquisa com a Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), em projeto financiado pelo CNPq e coordenado pela Prof^a. Dr^a. Maria Alice Zarur Coelho, da Escola de Química daquela instituição e envolve a formação de uma rede multidisciplinar para o estudo da levedura *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, isolada há algumas décadas da Baía da Guanabara (RJ).

Essa rede multidisciplinar compreende, além do GEnBio e da Escola de Química, pesquisadores do Instituto de Biofísica e do Instituto de Bioquímica Médica, todos vinculados à UFRJ. Inclui também o Centro de Biociência e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF) e a empresa *Hygeia Biotech*.

Nosso grupo de pesquisa assumiu a responsabilidade de realizar os estudos fisiológicos básicos com a *Y. lipolytica* IMUFRJ 50862, que é uma linhagem selvagem. Os protocolos adotados/desenvolvidos nesse estudo poderão ser utilizados em estudos futuros envolvendo as linhagens mutantes (com melhorias na capacidade inata da levedura em acumular óleos, por exemplo) a serem desenvolvidas pelas equipes da UFRJ.

A estratégia inicial do projeto foi investigar na literatura meios de cultura definidos adequados ao cultivo de *Y. lipolytica*, para então avaliar se as fontes de carbono glicose, sacarose, xilose, glicerol, etanol, citrato ou acetato são assimiláveis pela linhagem selvagem *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682, isolada da Baía da Guanabara, no Rio de Janeiro. Em paralelo, analisou-se a linhagem *Y. lipolytica* W29, amplamente estudada e caracterizada pela comunidade científica internacional, para uma comparação entre linhagens e correlação com eventuais dados disponíveis na literatura aberta.

Para determinação dos parâmetros fisiológicos (i.e. velocidades específicas e fatores de conversão) de ambas as linhagens, cinéticas de crescimento foram realizadas em meio de cultura líquido definido, para as fontes de carbono assimiláveis por essa espécie de levedura.

A determinação dos parâmetros fisiológicos básicos relativos ao crescimento, nas diferentes fontes de carbono selecionadas, poderá servir também como base para futura utilização desta levedura em processos biotecnológicos industriais.

2 OBJETIVOS

O objetivo central da presente dissertação é a determinação dos parâmetros fisiológicos básicos relativos ao crescimento de *Yarrowia lipolytica* em diferentes fontes de carbono.

Para tal, os seguintes objetivos específicos podem ser listados:

- Selecionar um meio de cultura de composição definida, adequado ao cultivo de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682;
- Determinar se glicose, sacarose, xilose, glicerol, etanol, citrato ou acetato são assimiláveis por essa levedura, como única fonte de carbono e energia;
- Verificar a tolerância desta levedura ao estresse salino (NaCl) em meio de cultura complexo sólido;
- Avaliar o efeito da subtração de tiamina e de elementos traço do meio de cultura, no crescimento das colônias desta levedura;
- Calcular os principais parâmetros fisiológicos (velocidades específicas e fatores de conversão) durante o crescimento desta levedura em meio líquido, para as fontes de carbono assimiláveis;
- Identificar e quantificar metabólitos extracelulares que porventura sejam formados por esta levedura, durante os cultivos em meio líquido;

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Leveduras não-convencionais

A quinta edição do maior livro de taxonomia de leveduras, *The Yeasts, a Taxonomic Study*, descreve 149 gêneros e aproximadamente 1500 espécies de leveduras (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011). Nota-se um aumento significativo na identificação e catalogação de novos táxons quando comparada com a quarta edição do mesmo livro, publicado em 1998, na qual 700 espécies de leveduras foram descritas. De acordo com o autor, isso se deve, principalmente, à aplicação de técnicas modernas de sequenciamento genético para alocação taxonômica precisa dos microrganismos isolados.

As espécies de leveduras mais conhecidas e estudadas atualmente, e portanto referenciadas como convencionais, são *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*. Enquanto *Saccharomyces cerevisiae* desempenha papel fundamental nos processos biotecnológicos para produção de combustíveis, de alimentos fermentados, de bebidas alcoólicas, de produtos de panificação e de químicos finos, *Schizosaccharomyces pombe*, conhecida também como “levedura de fissão”, é tida como organismo modelo nos campos de biologia celular e molecular.

Frente à grande diversidade de espécies de leveduras com características fisiológicas particulares, o estudo de outros gêneros e espécies (referenciadas, portanto, como não-convencionais) vem se tornando cada vez mais importante diante do crescimento, desenvolvimento e diversificação do setor biotecnológico.

Wolf (1996) descreveu 10 espécies de leveduras não-convencionais (em parênteses, a nomenclatura antiga) de especial importância em aplicações biotecnológicas, conforme segue a listagem:

- ***Schwanniomyces occidentalis***: Utiliza ampla gama de compostos orgânicos como fonte de carbono e energia. Expressa as enzimas α -amilase e glucoamilase, sendo capaz de degradar completamente amido.
- ***Kluyveromyces lactis***: Levedura especializada em assimilar lactose e galactose como fonte de carbono e energia.

- ***Pichia pastoris***: Levedura metilotrófica, capaz de produzir altas concentrações celulares em meio contendo metanol como única fonte de carbono. Além disso, investiga-se sua aplicação como plataforma de expressão de proteínas heterólogas.
- ***Pichia guilliermondii***: Utiliza hidrocarbonetos como única fonte de carbono e energia, sendo capaz de super-sintetizar riboflavina (Vitamina B2).
- ***Pichia methanolica (Pichia pinus)***: Levedura metilotrófica usada em estudos de genética molecular.
- ***Hansenula polymorpha (Pichia angusta)***: Levedura metilotrófica com alta capacidade de expressão enzimática, em especial a metanol oxidase, que pode atingir concentrações até um terço do total de proteínas celulares.
- ***Yarrowia lipolytica***: Capaz de assimilar hidrocarbonetos, ácidos graxos livres e outros lipídeos complexos como fonte de carbono e energia. Possui amplo potencial para ser utilizada em processos de tratamento de efluentes ricos em lipídeos (e.g. tratamento de efluentes no processo de obtenção de óleo de oliva) e na produção de ácidos orgânicos (e.g. ácido cítrico, isocítrico, α -cetoglutárico e pirúvico).
- ***Arxula adeninivorans***: Extremamente termo tolerante, sendo capaz de desenvolver-se à temperatura de 45 °C sem exibir uma fase de adaptação. É ainda capaz de assimilar adenina e outras purinas.
- ***Candida maltosa***: Possui características semelhantes à *Y. lipolytica*, cujos estudos focam na sua capacidade em assimilar n-alcanos, ácidos graxos e hidrocarbonetos como fonte de carbono e energia.
- ***Trichosporon spp.***: Apresenta potencial biotecnológico para ser empregada como sensor microbiano na determinação de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) em tratamento de efluentes, degradação de fenol etc.

3.2 História da levedura não-convencional *Yarrowia lipolytica*

De acordo com Barth e Gaillardin (1996), pesquisas relacionadas à levedura *Y. lipolytica* surgiram inicialmente em meados de 1940 devido a suas características fisiológicas distintas das demais leveduras. As primeiras linhagens dessa espécie eram mais comumente identificadas em substratos ricos em lipídios e proteínas (queijos, embutidos, iogurtes etc.), em contrapartida a substratos ricos em açúcares.

E de fato, essa espécie, na época classificada como *Candida lipolytica*, utiliza também açúcares como fonte de carbono, mas prontamente assimila diferentes tipos de álcoois, ácidos orgânicos e n-alcanos.

Na década de 1960 observou-se que essa espécie era capaz de produzir grandes quantidades de ácidos orgânicos (e.g. ácidos cítrico e isocítrico) quando cultivadas em n-alcanos, o que aumentou o interesse da indústria nessa espécie, tendo em vista sua capacidade inata de assimilação desses diferentes tipos de substratos abundantes e de baixo custo (TSUGAWA apud BARTH; GAILLARDIN (1996)).

A partir de então, alguns grupos de pesquisa ao redor do mundo começaram a estudar esta nova e promissora espécie de levedura, acumulando dados fisiológicos e genéticos para então, em meados de 1980, desenvolverem um sistema eficaz de transformação.

Os primeiros estudos de clonagem e expressão de genes codificadores de proteínas heterólogas foram iniciados, valendo-se da capacidade intrínseca da espécie em secretar grandes quantidades de enzimas (e.g. lipases, proteases etc.) em condições específicas de cultivo.

A indução, usualmente, consiste na adição de uma fonte de carbono que requer a secreção da enzima específica para uma prévia “digestão” extracelular. A transformação é feita empregando-se um promotor associado à produção de alguma dessas enzimas, geralmente a lipase, cuja indução, por exemplo, é feita com adição de óleos numa determinada etapa do cultivo.

Y. lipolytica é classificada pela **United States Food and Drug Administration** (USFDA) como **Generally Regarded As Safe** (GRAS – “comumente considerada segura”) para produção de ácido cítrico (TSUGAWA apud BARTH; GAILLARDIN (1996)).

No ano de 2004 foi publicado o sequenciamento completo do genoma de *Y. lipolytica* CLIB99¹ (DUJON et al., 2004). Essa publicação possibilitou uma comparação entre as espécies mais conhecidas de leveduras, elucidando características genômicas e relações filogenéticas entre as espécies até então mais estudadas.

3.3 Filogenia e ecologia de *Y. lipolytica*

Y. lipolytica é classificada como um microrganismo pertencente ao domínio *Eukarya*, na grande clade *Opisthokonta*, na qual se insere o tradicional reino *Fungi*. Essa classificação cladista insere os fungos no mesmo grupo monofilético que os animais, o *Metazoa*. A ramificação de um ancestral comum da clade *Opisthokonta* formou o grupo dos *Holomycota* (no qual se inserem os fungos e outros grupos menores de microrganismos), que seguiram caminho filogenético distinto dos animais que se enquadram no grupo *Holozoa* (CAVALIER-SMITH, 2003).

Essa classificação deixa clara a maior proximidade filogenética dos fungos com os animais, se comparados às plantas, cuja divisão de um ancestral comum dentro do domínio *Eukarya* formou a distinção básica entre os eucariotos *Unikonta*, descendentes de organismos com um flagelo e *Bikonta*, descendentes de organismos com dois flagelos (vide **figura 1**).

Como um fungo, é considerada uma levedura estritamente aeróbia, pertencente ao filo *Ascomycota*, classe dos *Saccharomycetes*. Inicialmente foi classificada como *Candida lipolytica*, uma vez que ainda não se havia observado estados sexuais dessa levedura.

A formação de ascos e ascósporos (células sexuais típicas aos fungos ascomicetos, responsáveis pela produção de esporos para propagação sexuada) foi observada em *Y. lipolytica* por Wickerham; Kurtzman e Herman (1970). Desta forma, a levedura foi reclassificada como *Endomycopsis lipolytica*. Posteriormente, foi alocada como *Saccharomycopsis lipolytica* por Yarrow (1972). No entanto, frente a algumas características únicas que a espécie apresentava dentre os membros do gênero *Saccharomycopsis*, como formato dos ascósporos e presença de coenzima

¹ Linhagem submetida erroneamente como CLIB99. O projeto sequenciou a linhagem CLIB122 (fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=284591>).

Q-9, van der Walt e von Arx (1980) descreveram o gênero *Yarrowia* [van der Walt & von Arx] para alocação dessa nova espécie (vide **figura 2**) (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011).

Figura 1: Árvore filogenética dos eucariotos baseado em uma síntese das ultraestruturas e evidências biológicas e moleculares das células. Pode-se visualizar a maior proximidade filogenética entre os animais e fungos quando comparado às plantas. Figura retirada de Cavalier-Smith, 2003.²

Y. lipolytica não é considerada patogênica, diferentemente de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. Raramente algumas linhagens são capazes de desenvolver-se em temperaturas superiores a 32 – 34 °C. Hagler e Mendonça-Hagler (1979) reportaram que todas as linhagens de *Y. lipolytica*, isoladas de ambientes marinhos no Rio de Janeiro, apresentavam crescimento adequado a temperatura de no máximo 35 °C. Mesmo tendo sido isoladas de ambientes de clima tropical, nenhuma apresentou crescimento acima de 37 °C, representando, possivelmente, uma tipicidade do gênero.

² A figura não foi adaptada e nem traduzida devida sua complexidade. Para entendimento básico, traduz-se *Kingdom* para Reino.

Usualmente, essa levedura pode ser isolada de ambientes ricos em lipídios e proteínas como queijos, embutidos e iogurtes, além de ambientes poluídos por hidrocarbonetos (FICKERS et al., 2005b).

Embora ainda não se saiba se *Y. lipolytica* possua um habitat primário na natureza, essa espécie pode ser encontrada em ambientes marinhos e até mesmo em ambientes hipersalinos (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011).

De fato, a linhagem *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 estudada neste trabalho foi isolada de um estuário na Baía da Guanabara, no Rio de Janeiro. As primeiras menções a esta linhagem (ainda como *Y. lipolytica* 583) foi aquela reportada no estudo conduzido por Hagler e Mendonça-Hagler (1979) para avaliação da capacidade de crescimento de diferentes linhagens de *Y. lipolytica* isoladas de ambientes marinhos do Rio de Janeiro (16 linhagens no total). Propunha-se então a avaliação da capacidade de crescimento dessas linhagens em condições marinhas e estuarinas, visando o emprego das mesmas na biorremediação de ambientes contaminados por hidrocarbonetos (i.e. derramamento de petróleo, zonas portuárias etc.).

Figura 2: Alocação filogenética da *Yarrowia lipolytica* e espécies adjacentes por determinação de análise de máxima parcimônia do sequenciamento genético D1/D2 LSU rRNA. Figura retirada de Kurtzman; Fell e Boekhout (2011).

3.4 Metabolismo central de carbono em leveduras

Açúcares são utilizados por todas as leveduras conhecidas, possuindo como característica central a conversão de glicose-6-fosfato (G6P) e frutose-6-fosfato (F6P) em piruvato através do maquinário enzimático que compõe a via glicolítica. O destino do piruvato, a partir de então, depende da espécie de levedura ou mesmo da condição de cultivo (vide **figura 23** em Anexo)

Na maioria dos casos, em condições aeróbias, o piruvato é oxidado completamente a CO₂ via Ciclo do Ácido Cítrico (ciclo tricarboxílico ou ciclo de Krebs). No entanto, algumas leveduras consideradas *Crabtree* positivas, possuem sua capacidade respiratória inibida quando submetidas a altas concentrações de determinados açúcares (e.g. glicose, sacarose, maltose etc.) mesmo em condições de plena aerobiose. *S. cerevisiae* é um exemplo típico de levedura *Crabtree* positiva, fermentando açúcares, preferencialmente, mesmo em condições de plena aerobiose.

Portanto, para o restante das leveduras, o metabolismo energético e de carbono possuem como caminho central a via glicolítica e o Ciclo do Ácido Cítrico (CAC), que desempenham papel fundamental na produção de energia (ATP), na redução das coenzimas NADH e NADPH (a partir de suas formas oxidadas) e na formação dos blocos primários à síntese de outras biomoléculas indispensáveis ao metabolismo.

Esta seção do trabalho acumula informações relativas ao metabolismo de leveduras e outros microrganismos. Como referências bibliográficas principais tem-se Nelson e Cox (2011) com “Princípios de Bioquímica de Lehninger”; Madigan et al. (2010) com “Microbiologia de Brock” e Walker (1998) com “*Yeast Physiology and Biotechnology*”. Para o metabolismo de carboidratos em leveduras não-convencionais, foi utilizado como referência geral e como fonte para outros artigos aqui devidamente citados, a revisão feita por Flores et al. (2000) sobre o metabolismo de carboidratos em leveduras não-convencionais.

3.4.1 Captação de açúcares e primeiras etapas do metabolismo

O transporte da fonte carbono é um denominador comum a todas as leveduras, uma vez que a membrana celular não é permeável a uma vasta gama de solutos, dentre eles açúcares. Para tal, a captação é intermediada por transportadores específicos, comumente denominados permeases, cujos genes responsáveis por sua transcrição são regulados em função da presença e concentração de diferentes fontes de carbono no meio de cultivo.

A primeira etapa no metabolismo corresponde ao transporte da fonte de carbono pelo microrganismo, exceto nos casos onde di- ou tri-sacarídeos são hidrolisados externamente. Por exemplo, a sacarose, na maioria dos casos, é hidrolisada externamente por uma invertase, cuja expressão é inibida pela presença de glicose. A literatura reporta a espécie *Yarrowia lipolytica* como sendo incapaz de assimilar sacarose (vide **tabela 1**), justamente por não ser capaz de secretar nenhuma invertase para hidrólise prévia deste dissacarídeo.

S. cerevisiae possui 20 genes codificadores de proteínas relacionadas ao processo de transporte de glicose (*HXT1* a *HXT17*, *GAL2*, *SNF3* e *RGT2*). As proteínas da classe Hxt_p englobam a principal família de facilitadores de transporte de hexoses, sendo que *S. cerevisiae* é considerado o organismo com maior número de genes codificadores desses transportadores (ÖZCAN; JOHNSTON, 1999). Essa classe de transportadores atuam de forma passiva e independente de gasto energético no transporte de substrato via difusão facilitada.

Já em *Y. lipolytica*, o sistema de transporte de glicose possui apenas dois componentes: alta afinidade (após crescimento em 0,05% de glicose) e baixa afinidade (após crescimento em 2% de glicose), cujos valores de K_m são 0,14 e 1,3 mM, respectivamente. Devido à proximidade dos valores, conclui-se que a atividade de ambos permanece constante e independe da concentração de glicose do meio (DOES; BISSON, 1989).

Após a glicose ser transportada para dentro da célula, a etapa que se segue é fosforilação intracelular intermediada por hexoquinases. A fosforilação da glicose pela célula evita que a mesma difunda-se para o meio extracelular.

Tem-se conhecimento da existência de isoformas específicas de hexoquinases (i.e. isoenzimas) que possuem atuação seletiva de acordo com o substrato que preferencialmente reconhecem.

Por exemplo, enquanto hexoquinases genéricas não possuem especificidade de substrato (i.e. atuam tanto na fosforilação de glucose, frutose e manose), glicoquinases atuam especificamente na fosforilação de glicose. Nos mamíferos, desempenham papel na regulação metabólica dos níveis de glicose nos tecidos onde são mais abundantes (i.e. fígado, pâncreas, trato intestinal e cérebro).

Tabela 1: Avaliação da capacidade de assimilação de diferentes fontes de carbono e nitrato para *Y. lipolytica*. Adaptado de Kurtzman; Fell e Boekhout (2011).

Crescimento em Meio Líquido Definido			
Glicose	+	D-Ribose	v
Inulina	-	Metanol	-
Sacarose	-	Etanol	+
Rafinose	-	Glicerol	+
Melibiose	-	Eritritol	+
Galactose	v	Ribitol	v
Lactose	-	Galactiol	-
Trealose	-	D-Manitol	+
Maltose	-	D-Glucitol	+
Melezitose	-	<i>myo</i> -Inositol	-
Metil- α -D-Glicosídeo	-	DL-Lactato	+
Amido solúvel	-	Succinato	+
Celobiose	w / -	Citrato	+
Salicina	w / -	D-Gluconato	v
L-Sorbose	v	D-Glucosamina	-
L-Raminose	-	N-Acetil-D-Glucosamina	+
D-Xilose	-	Hexadecano	+
L-Arabinose	-	Nitrato	-
D-Arabinose	-	Sem Adição Vitaminas	-

Legenda: (+) apresenta crescimento; (-) não apresenta crescimento, (v) variável e (w/-) fraco ou ausente.

Em *Y. lipolytica* tem-se conhecimento da existência de uma hexoquinase e uma glicoquinase (HIRAI et al., 1977). Alterando os genes que codificam essas enzimas, foi sugerido por Petit e Gancedo (1999) que a maior parte da glicose deve ser fosforilada *in vivo* pela glicoquinase.

G6P é então convertida à duas trioses fosfato numa sequência de reações enzimáticas, irreversíveis, que caracterizam o comprometimento final celular na utilização da molécula fosforilada de glicose para a via glicolítica. Em *Y. lipolytica*, até o momento, não foram identificadas diferenças significativas no maquinário enzimático dessa etapa.

3.4.2 O destino final do piruvato

Y. lipolytica é considerada uma levedura estritamente aeróbia e portando o destino final do piruvato é necessariamente a sua oxidação completa a dióxido de carbono (CO₂). Para entrar no Ciclo do Ácido Cítrico (CAC), o piruvato é oxidado a acetil-CoA via complexo multienzimático, denominado piruvato desidrogenase, localizado na membrana das mitocôndrias, o que necessariamente implica no transporte do piruvato para dentro dessas organelas. Enzimas nesse complexo multienzimático empregam tiamina pirofosfato (derivado da tiamina, mais conhecida como vitamina B₁) e íons de magnésio como cofatores.

Alternativamente, acetil-CoA pode ser formado ciotosolicamente por ação de enzimas localizadas no citosol celular, processo esse denominado piruvato *by-pass*.

Portanto, acetil-CoA gerado tanto pelo complexo piruvato desidrogenase quanto pelo piruvato *by-pass*, entram no CAC a partir da sua reação com uma molécula de oxaloacetato, intermediado pela enzima citrato sintase, para formação de uma molécula de citrato.

Citrato é então convertido a isocitrato pela enzima aconitase, uma metaloenzima contendo enxofre e ferro. A conversão de isocitrato a 2-oxoglutarato (α -cetoglutarato) é feita pela enzima isocitrato desidrogenase. O ciclo então segue com a formação de succinato, fumarato e malato até finalmente terminar com o oxaloacetato, para novamente fundir-se a uma molécula de acetil-CoA e iniciar o ciclo novamente.

Detalhes referentes a essas últimas etapas não foram ainda investigadas a fundo para *Y. lipolytica* e portanto representam oportunidades para estudos que compreenderiam melhor a regulação metabólica desses intermediários do CAC.

3.4.3 Reações anapleróticas

Metabólitos intermediários do CAC são removidos constantemente para suprirem reações biosintéticas do metabolismo de todos os organismos vivos. Por exemplo, oxaloacetato e α -cetoglutarato são removidos para formação dos aminoácidos aspartato e glutamato, respectivamente.

A principal reação anaplerótica em leveduras, crescendo em meio de cultura definido, açúcares como fonte de carbono e amônio como fonte de nitrogênio, é a reação de conversão de piruvato a oxaloacetato (vide **figura 23** em Anexo), catalisada pela enzima piruvato carboxilase. Essa reação emprega energia e uma molécula de CO_2 , sendo capaz de suprir o CAC, principalmente, com o intermediário oxaloacetato.

O oxaloacetato produzido por via da piruvato carboxilase pode ser empregado em outra reação anaplerótica importante em leveduras, cuja função principal é suprir a célula com os intermediários succinato e malato através da assimilação de moléculas de acetil-CoA (malato como resultado da condensação de uma molécula de glioxilato e acetil-CoA, intermediado pela malato sintase), recebendo o nome de Ciclo do Glioxilato (CG).

É assim denominado uma vez que a reação catalisada pela isocitrato liase, responsável por catalisar a reação de formação de succinato e glioxilato, representa a etapa que o distingue, essencialmente, do CAC (vide **figura 3**). É importante notar que as reações do CG ocorrem citosolicamente, diferentemente das reações do CAC que ocorrem, necessariamente, dentro das mitocôndrias.

O CG é essencial aos microrganismos que assimilam fontes de carbono com menos de três carbonos, e.g. etanol e acetato e também no processo de produção de glicose (gliconeogênese) a partir de ácidos graxos, uma vez que o produto do catabolismo dessas substâncias, via β -oxidação, são moléculas de acetil-CoA.

Figura 3: Ciclo do Glioxilato (CG) apresentado de forma a evidenciar sua semelhança com o Ciclo do Ácido Cítrico (CAC) e sua participação na formação dos principais intermediários, succinato e malato. Linha tracejada representa as etapas específicas ao CG, linha normal, as etapas específicas ao CAC, linha em negrito, as etapas compartilhadas pelo CG e CAC e linha branda, a etapa destinada a gliconeogênese. Figura retirada de Lorenz e Fink (2002).

Sabe-se que a isocitrato liase expressa por *Y. lipolytica* é mais similar à expressa por fungos filamentosos e *Candida tropicalis* se comprada a mesma enzima expressa por *S. cerevisiae*, possuindo ainda uma sequência sinalizadora de marcação peroxissomal (provavelmente relacionada ao acúmulo de óleos). Deleção do gene responsável por codificar essa enzima em *Y. lipolytica* resultou em mutantes incapazes de assimilar etanol, acetato e ácidos carboxílicos (como era de se esperar), como também interferiu na capacidade de assimilação de glicose (BARTH; SCHEUBER, 1993).

Schizosaccaromyces pombe não expressa as enzimas do CG, sendo essa uma possível explicação por sua incapacidade em assimilar etanol (FLURY; HEER; FIECHTER, 1974).

É interessante notar que mutantes já foram desenvolvidos visando minimizar a produção de ácido isocítrico (produto intermediário indesejável na produção de ácido cítrico) através da superexpressão do gene *ICL1* que codifica a enzima isocitrato liase em *Y. lipolytica* (FÖRSTER et al., 2007b). A redução na proporção de ácido isocítrico formado, nesse estudo, foi de 10 - 12% para 3 - 6% em glicerol e carboidratos como fonte de carbono, e de 37 - 45% para 4 - 7% em hexadecano e óleo de girassol.

Os resultados evidenciam que a maior parte do ácido cítrico e isocítrico produzido em *Y. lipolytica* são provenientes das reações obtidas citosolicamente via CG quando óleos são utilizados como única fonte de carbono e energia.

3.4.4 A via das pentose-fosfato e sua relação com o metabolismo de xilose

A principal função da via das pentoses é suprir todo o maquinário celular com NADPH, coenzima responsável por doar hidrogênio em reações biosintéticas redutoras. Também atua na proteção celular ao reagir com compostos oxidantes oriundos do metabolismo (ação antioxidativa).

É também responsável por produzir ribose 5-fosfato, constituinte primário dos ácidos nucleicos e eritrose 4-fosfato utilizado na síntese de aminoácidos aromáticos.

A via das pentoses é caracterizada por duas reações oxidativas iniciais, fisiologicamente irreversíveis, enquanto as restantes são reversíveis e não-

oxidativas. O metabolismo de hexoses divide-se entre via glicolítica e via das pentoses após a primeira fosforilação da glicose e formação da glicose 6-fosfato.

Sabe-se que o tipo de fonte de nitrogênio utilizada nos cultivos possui influência direta na quantidade de açúcares direcionados à via das pentoses. Por exemplo, já foi reportado que cultivos de *S. cerevisiae* suplementados com aminoácidos, quando comparados a cultivos com nitrogênio inorgânico, apresentam menor quantidade de carbono direcionado a via das pentose fosfato, uma vez que faz-se menos necessária a síntese de novos aminoácidos para suprir às necessidades de síntese proteica no estabelecimento das funções estruturais básicas da levedura (GANCEDO; LAGUNAS, 1973).

3.4.4.1 Metabolismo da xilose (via XR-XDH)

Inicialmente, a assimilação de xilose acontece com sua redução a xilitol, intermediado pela xilose redutase (XR), enzima essa dependente de NAD(P)H. Posteriormente, xilitol é oxidado a xilulose pela enzima xilitol desidrogenase (XDH). A xilulose produzida é então fosforilada para entrar na via das pentoses fosfato.

Cabe ressaltar que essa etapa de assimilação de xilose é a tipicamente encontrada em leveduras, uma vez que em bactérias a reação de xilose a xilulose pode ser realizada pela xilose isomerase, enzima essa estabilizada por cobalto, requerendo magnésio para função catalítica.

As estratégias atuais para produção de linhagens de leveduras, incluindo *S. cerevisiae*, capazes de assimilar xilose, envolvem a clonagem e superexpressão dos genes responsáveis pela codificação das enzimas XR e XDH.

O gene *XYL1*, responsável por codificar a enzima XR já foi identificado em diferentes leveduras, e é expresso constitutivamente na levedura *K. lactis*, ficando claro que sua deleção impossibilita o metabolismo de xilose pelo microrganismo (BILLARD et al., 1995).

Em *Pichia stipitis*, o gene responsável por codificar a enzima XDH é o *XYL2* (nessa mesma levedura, o gene *XYL1* expressa a enzima XR). Já foi possível expressar ambos os genes *XYL1* e *XYL2* de *P. stipitis* em *S. cerevisiae*, para obtenção de mutantes capazes de fermentar xilose a etanol (WALFRIDSSON et al., 1997).

3.4.5 Metabolismo de etanol

Etanol pode ser utilizado por diversas leveduras como única fonte de carbono e energia. Já sua produção é mais evidente em leveduras especializadas na fermentação de açúcares, e.g. *S. cerevisiae*. No entanto, central a produção e consumo de etanol, está a enzima álcool desidrogenase, responsável por catalisar a reação reversível de acetaldeído a etanol. *S. cerevisiae* expressa quatro isoenzimas álcool desidrogenase. *ADH1* codifica a isoenzima proeminente durante a fermentação de glicose a etanol. Já a isoenzima codificada pelo gene *ADH2* é reprimida pela presença glicose, sendo responsável pelo catabolismo de etanol (DENIS; FERGUSON; YOUNG, 1983).

Em estudo conduzido por Barth e Künkel (1979) apud Flores et al. (2000), identificou-se em *Y. lipolytica* uma álcool desidrogenase NAD^+ dependente que atua mais eficientemente em álcoois de cadeia longa. Outras três álcool desidrogenase NADP^+ dependentes também foram caracterizadas, cuja regulação depende da fonte de carbono empregada nos cultivos. Além disso, nesse mesmo estudo, observou-se que linhagens de *Y. lipolytica* são capazes de tolerar concentrações de até 1 M de álcool alílico (i.e. isômeros de propenol).

O acetaldeído formado no catabolismo de etanol é convertido a acetado pela enzima aldeído desidrogenase. O acetato é então convertido a acetil-CoA mediado pela enzima acetil-CoA sintetase, sendo essa enzima essencial no catabolismo de acetato em leveduras. O acetil-CoA formado pode seguir caminhos distintos: ser oxidado completamente, via CAC (primeiramente é transportado para dentro da matriz mitocondrial, pela ação da L-carnitina) ou ser assimilado via CG, para formação de intermediários do CAC e/ou para formação de glicose (gliconeogênese).

3.4.6 Metabolismo de glicerol

Glicerol pode ser utilizado como fonte de carbono e energia por leveduras em condições aeróbias. Em *Candida utilis* e *S. cerevisiae* o glicerol é primeiramente fosforilado pela glicerol quinase para formação de L-glicerol-3-fosfato (G3P) que é então oxidado na membrana mitocondrial via glicerol fosfato ubiquinona oxirredutase

(GANCEDO; GANCEDO; SOLS, 1968), para então entrar na via glicolítica (vide **figura 23** em Anexo).

Como já mencionado, a assimilação de açúcares é dependente de mecanismo de transporte, presente na membrana celular. No entanto, sabe-se que em *S. cerevisiae* o glicerol e outras moléculas menores, de dois a três carbonos sem carga elétrica, são capazes de entrar na célula via difusão simples.

Observações de que determinadas leveduras são capazes de crescer em glicerol de forma tão eficiente quanto em glicose, levantaram a hipótese de que outros mecanismos de transporte de glicerol poderiam estar presentes nessas espécies. E de fato, Gancedo; Gancedo e Sols (1968) constataram que o transporte de glicerol em *C. utilis* é até 10^5 “mais eficiente”, se comparado a *S. cerevisiae* que possivelmente não apresenta transportadores específicos para glicerol. Até o momento, não foram identificados sistemas de transporte de glicerol para a espécie *Y. lipolytica*.

3.5 Potencial biotecnológico de *Y. lipolytica*

O uso de leveduras em “aplicações biotecnológicas” acompanha a humanidade há milênios, desde os mais primitivos processos fermentativos para produção de bebidas alcoólicas e crescimento de pães, até os processos atuais de produção de biofármacos.

Por esse motivo, as leveduras podem ser relacionadas entre os organismos “domesticados” pelo homem há mais tempo. Estima-se que desde 2000-6000 AC os sumérios já detinham o conhecimento “biotecnológico” para produção de cerveja e os egípcios para produção de pães fermentados (WALKER, 1998).

Nos dias atuais, a humanidade já não “domestica” leveduras somente para o propósito de fermentar o malte, crescer pães ou produzir etanol. Leveduras geneticamente modificadas produzem uma miríade de substâncias de interesse médico e industrial, além de serem empregadas numa ampla gama de outros processos de interesse humano.

Algumas dessas aplicações serão abordadas nos próximos tópicos. O objetivo é listar, de forma sucinta, o que recorrentemente é possível encontrar na

literatura aberta, de forma a criar um panorama geral das aplicações biotecnológicas mais promissoras da levedura *Y. lipolytica*.

Não houve pretensão em aprofundar-se nos tópicos que se seguem, uma vez que cada um deles, facilmente, poderia originar um trabalho independente.

3.5.1 Biorremediação de solos e ambientes marinhos poluídos por hidrocarbonetos

Atualmente o petróleo é a principal fonte energética da humanidade. No entanto sua exploração e utilização geram impactos ecológicos significativos. A recuperação de ambientes poluídos por óleos tem sido tema de diversas pesquisas científicas.

De acordo com Bankar, Kumar e Zinjarde (2009), um grupo de pesquisa austríaco já foi capaz de isolar uma linhagem de *Y. lipolytica* capaz de degradar em 10 dias 68% de óleo diesel em uma faixa de temperatura de 0 a 30 °C. Pesquisas posteriores mostraram ainda que a linhagem denominada *Y. lipolytica* RM7/11 foi capaz de degradar 50% de n-hexadecano e 73% de n-dodecano, a 15 °C em curto período de tempo (5 dias).

A maioria dos estudos em biorremediação é conduzida em laboratório, gerando de certa forma resultados que podem ser muito diferentes daqueles esperados na biorremediação *in situ* (i.e. ambiente poluído na natureza, como praias, portos, manguezais, estuários, deltas, lençóis, solo etc.). No entanto, estudos preliminares com a linhagem *Y. lipolytica* A-101 mostraram que a mesma é capaz de colaborar com a degradação de combustíveis derivados de petróleo, *in situ*, através de uma suposta ação conjunta com o microssistema local presente no solo (BANKAR; KUMAR; ZINJARDE, 2009).

Em ambientes marinhos, os derramamentos (durante o transporte ou extração) são as causas mais preocupantes de poluição ambiental pela exploração do petróleo. Para biorremediar esses ambientes, faz-se necessário uma espécie de microrganismo capaz de assimilar uma gama complexa de hidrocarbonetos e compostos aromáticos em ambientes de alta salinidade. De acordo com Bankar, Kumar e Zinjarde (2009) diversas linhagens de *Y. lipolytica* já foram estudadas para essa finalidade.

Microrganismos isolados de ambientes salinos poluídos por hidrocarbonetos, geralmente apresentam características fisiológicas selecionadas através da pressão seletiva natural imposta na microbiota local pelo ecossistema poluído. As características mais evidentes são: versatilidade na assimilação de fontes de carbono (i.e. hidrocarbonetos, proteínas, lipídeos, carboidratos etc.) e alta tolerância a salinidade (i.e. halofilia). Cientistas buscam e selecionam microrganismos com estas características visando estudar possíveis aplicações na biorremediação de ambientes poluídos nos quais outras espécies não apresentariam condições favoráveis de desenvolvimento.

Tendo em mente esse conceito, Hagler e Mendonça-Hagler (1979) selecionaram 16 cepas de *Y. lipolytica* (ainda denominada *C. lipolytica*) para investigação dos requerimentos nutricionais ao crescimento desses microrganismos em condições similares às encontradas em um derramamento marítimo de petróleo. Nesse estudo, as principais características observadas foram a forte atividade lipolítica em todas as cepas isoladas, temperatura máxima favorável ao crescimento inferior a 37 °C, tolerância salina de até 10% (nove entre as dezesseis cepas selecionadas mostraram ainda tolerância na faixa de 12 a 16% de NaCl, no entanto, o autor não especifica quais são essas linhagens) e pH ótimo de crescimento igual a 8 (semelhante ao pH de ambientes marinhos). É interessante notar que Barth e Gaillardin (1996) sugerem para o gênero pH de 4 (ou fortemente tamponado em pH igual a 6) para o cultivo de *Y. lipolytica* nas fontes de carbono acetato e ácidos graxos.

Os fatores principais limitantes ao crescimento foram determinados como sendo as fontes de carbono, de fosfato e de nitrogênio, concluindo que *Y. lipolytica* é um microrganismo adequado a biorremediação de ambientes poluídos, sendo necessária somente adição de uma fonte de fosfato e nitrogênio para estimular o rápido crescimento e degradação dos hidrocarbonetos responsáveis pela poluição.

3.5.2 Tratamento de efluentes ricos em óleos

Estudos relacionados ao tratamento de efluentes ricos em óleos são de grande interesse ambiental e econômico. Estudos já comprovaram que o emprego de *Y. lipolytica* no tratamento de efluentes provenientes do processamento de óleo

de oliva é eficaz, sendo possível ainda produzir produtos de interesse biotecnológico de alto valor agregado, como por exemplo lipases, a partir do que era considerado descartável e poluente.

Em estudo sobre o uso de efluentes oriundos da produção de óleo de oliva para produção de lipases, Lopes et al. (2009) demonstraram que as linhagens selvagens de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 e W29 eram capazes de se desenvolver nesse substrato abundante e barato. Ainda no mesmo estudo, a linhagem W29 mostrou-se melhor adaptada para a produção de biomassa e lipase.

Em estudo sobre o tratamento de efluentes ricos em óleos, provenientes de indústrias e restaurantes, Wu; Ge e Wan (2009) apresentaram resultados promissores com a linhagem selvagem *Y. lipolytica* W29 imobilizada em alginato de cálcio na degradação desses óleos e na diminuição da Demanda Química de Oxigênio (DQO) desses efluentes. Os resultados sugerem uma boa estabilidade térmica e a capacidade de se reutilizar diversas vezes o preparado de células imobilizadas em alginato de cálcio.

3.5.3 Produção de lipases

Como já mencionado anteriormente, a capacidade inata da *Y. lipolytica* em consumir substratos hidrofóbicos (SH) baseia-se na sua capacidade em secretar lipases para o meio extracelular. As lipases possuem um papel fundamental no início do processo de assimilação desse substrato, uma vez que são responsáveis por iniciar a quebra dos lipídeos (e.g. diglicerídeos e triglicerídeos) em formas mais simples assimiláveis pelo microrganismo, denominados ácidos graxos livres.

Lipases são utilizadas na indústria alimentícia, de papel e celulose e mais recentemente foi demonstrado que lipases produzidas por *Y. lipolytica* são adequadas à formulação de medicamentos para o tratamento de insuficiência exócrina pancreática (TURKI et al., 2010). Nesse estudo, a lipase produzida por *Y. lipolytica* mostrou-se altamente promissora devido a sua estabilidade em baixos valores de pHs (adequada ao trato digestivo humano), retenção da sua capacidade enzimática em temperaturas em torno de 36 - 37 °C (temperatura média do corpo humano), capacidade de hidrolisar triglicerídeos de cadeia longa, média e curta

(baixa especificidade) e similaridade com a lipase naturalmente produzida nos humanos (menor risco de reações alérgicas).

Com o sequenciamento dos genes e o desenvolvimento de ferramentas de manipulação genética, *Y. lipolytica* tem se tornado um promissor modelo para o estudo da assimilação de lipídeos (BARTH; GAILLARDIN, 1997).

Um estudo extenso sobre a caracterização da lipase codificada pelo gene *LIP2* foi realizado por Pignède *et al.* (2000). Nesse estudo, foi comprovado que o gene *LIP2* codifica uma proteína precursora de 334 aminoácidos e que a lipase secretada é um polipeptídeo glicosilado de 301 aminoácidos, membro da família das triacilglicerol hidroxilases.

No desenvolvimento da sua tese de doutorado, Amaral (2007) analisou a influência da quantidade de oxigênio solubilizado disponível em meio de cultura líquido, na formação de biomassa e produção de lipase para a mesma linhagem investigada neste estudo (*Y. lipolytica* IMUFRJ 50682).

Através da aspersão eficiente de ar atmosférico em água (1 atm e 35 °C) a concentração de saturação de oxigênio é da ordem de 7 mg.l⁻¹ (7 ppm). A disponibilidade de oxigênio dissolvido (pO₂) usualmente é um fator limitante em processos biotecnológicos que empregam microrganismos estritamente aeróbios em cultivos de alta concentração celular e alta produtividade. A adição de perfluorodecalina (PFC), um tipo de perfluorocarboneto cíclico, foi a estratégia abordada pela autora para aumentar a concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultura, uma vez que esse solvente orgânico apresenta alta solubilidade ao oxigênio (35,5 mmol.l⁻¹ à pressão e temperatura padrões) (LOWE *et al.*, 1998 apud AMARAL, 2007). Sua função como “carregador de oxigênio” para a fase líquida promove aumento no coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}) sem apresentar efeitos tóxicos no cultivo de células animais (CHO; WANG, 1988 apud AMARAL, 2007).

O estudo demonstrou que a adição de 20% (v/v) de perfluorodecalina (cultivos realizados em frasco com YPD como meio de cultura) foi capaz de aumentar a produtividade de lipase em até 23 vezes, concluindo que o oxigênio é um fator limitante na produção de lipase. A autora afirma ainda que a produção de lipase é comercialmente viável quando produzida em meio YPD com adição de

PFCs, sob agitação de 650 rpm e aeração de $1,5 \text{ l.min}^{-1}$ (dados obtidos de ensaios em biorreatores de 2 l).

Mutantes adaptados para cultivos em batelada e batelada alimentada têm sido desenvolvidos para aumentar a capacidade de secreção de lipase através de mutagênese química ou de engenharia genética (FICKERS et al., 2005a). O autor afirma que *Y. lipolytica* pode ser utilizada como sistema de expressão para proteínas heterólogas que utilizariam o mesmo promotor e sistema nativo de secreção de lipase desta levedura.

3.5.4 Produção de proteínas heterólogas

Se comparadas a outros sistemas de expressão de proteínas heterólogas (i.e. bactérias, células animais e plantas), leveduras apresentam algumas vantagens. Dentre elas, as principais seriam a viabilidade e facilidade de cultivo em biorreatores para produções em larga escala, simplicidade para manipulação genética (por se tratar de um organismo unicelular) e sistema de expressão de proteínas mais completo que o presente em bactérias (por se tratar de um microrganismo eucarioto), o que permitiria a expressão de proteínas com características pós-traducionais típicas de organismos superiores (e.g. mamíferos e plantas).

S. cerevisiae, a levedura mais estudada atualmente para tal finalidade, se comparada a *Y. lipolytica*, tem apresentado algumas limitações: baixa produção de proteínas secretadas, número limitado de sequências sinalizadoras viáveis, baixa estabilidade dos plasmídeos, diminuição no desenvolvimento de biomassa com o aumento da concentração de etanol e capacidade limitada em assimilar diferentes fontes de carbono (NICAUD et al., 2002).

Em estudo explorando a capacidade inata de *Y. lipolytica* em secretar lipases, Nicaud et al. (2002) descreveram vetores para a expressão de uma proteína de *Aspergillus oryzae*, obtendo excelentes resultados na transformação e no rendimento da proteína de interesse. Para mais detalhes sobre os rendimentos obtidos, levando em consideração os promotores empregados, a quantidade de cópias integradas e o tipo de mutante utilizado, vide artigo completo por Nicaud et al. (2002).

O cultivo de microrganismos visando a produção de proteínas heterólogas é feito, preferencialmente, em meios de cultura definidos. A adição de elementos promotores do crescimento, tipicamente empregados no cultivo de leveduras (e.g. extrato de levedura, peptona, malte etc.) representam um fator complicador na etapa de purificação da proteína de interesse, que é geralmente secretada para o meio de cultura. Desta maneira, esse estudo poderá beneficiar, futuramente, processos que empreguem *Y. lipolytica* na produção de proteínas heterólogas a partir das fontes de carbono analisadas neste trabalho.

3.5.5 *Produção de flavorizantes e aromatizantes*

Em revisão sobre produção de aromas e flavorizantes, Waché *et al.* (2006) descrevem as diversas aplicações que podem ser dadas à *Y. lipolytica* para produção de aromas e flavorizantes a partir da degradação de lipídeos e outros alcanos. Discorrem também sobre a possibilidade, através de engenharia genética, de produção de diversos produtos aromáticos de alto valor agregado.

Partindo de lipídeos, substratos esses assimiláveis por *Y. lipolytica*, pode-se obter uma vasta gama de compostos aromáticos, usualmente empregados na indústria farmacêutica, cosmética e perfumaria e alimentícia (vide **figura 4**).

Figura 4: Esquema da degradação de lipídeos (enzimas em *itálico*) e potenciais precursores na produção de flavorizantes e aromatizantes (sublinhados). *A enzima hidroperóxido liase é obtida por rota heteróloga. Figura adaptada de Waché et al. (2006).

3.5.6 Produção de ácidos orgânicos

A produção de ácidos carboxílicos por microrganismos representa grande parte dos produtos biotecnológicos produzidos atualmente. A exemplo, pode-se citar o ácido cítrico (AC) cuja produção anual global excedeu 1,6 milhões de toneladas em 2008 (SAUER et al., 2008). Este valor o coloca como principal ácido orgânico sintetizado por microrganismos (RYWIŃSKA et al., 2011). O AC é empregado principalmente como acidulante de bebidas, aditivo de alimentos, dentre outros produtos, como detergentes, cosméticos, medicamentos etc.

A produção dos cetoácidos (i.e. ácidos α -cetoglutárico e pirúvico) está associada às espécies que exibem auxotrofia por tiamina. Não obstante, *Y. lipolytica* é auxotrófica a tiamina, na qual a produção de ácido α -cetoglutárico (ACG) e ácido pirúvico (AP) está associada a cultivos que empregam fonte de carbono em excesso e tiamina como fator limitante de crescimento.

Estudos já foram realizados para delinear as condições ideais de cultivo (em etanol) que favoreceriam a superprodução de ACG, avaliando parâmetros como concentração intra e extracelular de tiamina, pO_2 e pH. A produção de ACG é

induzida a partir da queda da concentração intracelular de tiamina e com manutenção de altas concentrações de íons amônio ao longo do processo fermentativo, caso contrário a formação de AC é favorecida (FINOGENOVA et al., 2005).

Para produção de AP, emprega-se glicose ou glicerol como fonte de carbono e as mesmas condições de cultivo descritas acima para produção de ACG, obtendo-se proporções de 75 a 80 % de AP e restante de ACG.

A biossíntese AC e ácido isocítrico (AIC) é estimulada em cultivos com excesso de fonte de carbono (glicose e glicerol) e ausência de tiamina e fonte de nitrogênio. A superprodução de AC e AIC é feita com a limitação nutricional de outros macronutrientes (fósforo, enxofre e magnésio) além do nitrogênio e do promotor de crescimento, tiamina.

Provavelmente, essa abordagem visa cessar o crescimento microbiano pela ausência de fonte de nitrogênio (essencial à síntese proteica) e desfavorecer a oxidação completa do piruvato via Ciclo do Ácido Cítrico (vide **item 3.4.2**), que sobrecarregado acaba por produzir excesso de AC, automaticamente exportado para fora da mitocôndria para ser processado em lipídeos ou excretado.

A **tabela 2** resume os principais ácidos orgânicos produzidos por diferentes linhagens de *Y. lipolytica*.

Tabela 2: Ácidos orgânicos produzidos por diferentes linhagens de *Y. lipolytica* em diferentes substratos. Adaptado de Finogenova et al., (2005). * Petrolato refere-se a uma mistura de hidrocarbonetos de alto peso molecular, também conhecido como vaselina.

Ácido	Substrato	Linhagem	Produto (g/l)
Ácido α -Cetoglutárico	Petrolato *	Selvagem	109
	Etanol	Mutante	50
Ácido Pirúvico	Glicose	Selvagem	50
	Glicerol	Selvagem	61
Ácido Cítrico e Ácido Isocítrico	Petrolato *	Selvagem	102
Ácido Isocítrico	Petrolato *	Selvagem	60
	Etanol	Selvagem	66
Ácido Cítrico	Petrolato *	Mutante	217
	Etanol	Mutante	120

Vantagens observadas em processos que empregam leveduras para a produção de AC são: maior variedade de substratos para os cultivos, melhores conversões produto/substrato ($Y_{P/S}$), menor sensibilidade à quantidade de oxigênio dissolvido e metais pesados (STOTTMEISTER; HOPPE, 1991 apud FÖRSTER et al., 2007b).

Além da versatilidade na assimilação de diferentes substratos, o processo de produção de AC por *Y. lipolytica* mostra-se mais vantajoso que o processo que emprega *Aspergillus niger*, fungo filamentoso tradicionalmente empregado na produção de AC (vide **figura 5**). Outra vantagem residiria no fato de *Y. lipolytica* não ser patogênica, eliminando o risco de desenvolvimento da doença conhecida como aspergilose pela inalação dos esporos de *A. niger*.³

As desvantagens residiriam no fato de linhagens selvagens de *Y. lipolytica* não assimilarem sacarose e tenderem a produzir altas quantidades de AIC (subproduto indesejado na obtenção de AC de alta pureza). No entanto, etanol, glicerol e ácidos graxos são alternativas viável à produção de AC, além do fato de mutantes de *Y. lipolytica* já terem sido desenvolvidos com sucesso, visando sanar ambas as questões supramencionadas (FÖRSTER et al., 2007a, 2007b).

³ Deve-se esclarecer que *Aspergillus fumigatus* é o maior responsável pelos casos de aspergilose, principalmente em paciente imunodeprimidos. No entanto, já foram reportados casos envolvendo outras espécies do gênero *Aspergillus*, i.e. *A.flavus*, *A.niger*, *A.nidulans* e *A.terreus*.

Figura 5: Esquema comparando as etapas necessárias para produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica* e *A. niger*. Produção de AC empregando leveduras, dentre elas *Y. lipolytica*, representariam redução das etapas de produção e geração de efluentes poluentes (metais pesados) e sólidos ($CaSO_4 \cdot 2H_2O$), tipicamente obtidos nos processos que empregam *A. niger*. Figura adaptada de Finogenova et al. (2005).

Frente à crescente demanda por combustíveis renováveis, dentre eles o biodiesel, questões relativas ao processamento dos subprodutos formados durante sua produção começam a ser discutidos. O glicerol, subproduto de baixo valor agregado, representa uma boa alternativa para ser empregado como substrato na obtenção de produtos biotecnológicos de maior valor agregado. De acordo com Papanikolaou *et al.* (2002), o emprego de glicerol na produção de AC mostrou-se eficiente e mais rentável se comparado à alternativa biotecnológica de conversão do glicerol a 1,3-propanodiol.

Rywińska et al. (2011) demonstraram ainda que uma linhagem mutante de *Y. lipolytica*, denominada Wratislavia AWG7, possui a estabilidade necessária para produção de AC em quimiostato. Usando glicerol como única fonte de carbono, foi possível obter rendimento produto/substrato ($Y_{P/S}$) na faixa de 0,59 a 0,67 [g.g⁻¹].

Nesse mesmo estudo, os autores afirmam que esta linhagem é capaz de produzir AC com alta pureza, em contrapartida a outras linhagens selvagens de *Y. lipolytica* que tendem a produzir simultaneamente AIC e polióis.

Como já mencionado, isso representa uma grande vantagem na obtenção de AC de alto grau de pureza, além de facilitar a etapa de cristalização, uma vez que contaminação superior a 5% por AIC pode perturbar a formação dos cristais de AC (FÖRSTER et al., 2007b).

Além disso, a opção por processos contínuos é mais atrativa para produção de ácidos orgânicos em escala industrial, uma vez que processos em batelada (e.g. *A. niger*) demandam maior tempo de produção e mão-de-obra, aumentando necessariamente os custos do processo produtivo.

3.5.7 Produção de óleo microbiano

Y. lipolytica é considerado um microrganismo oleaginoso por ser capaz de acumular lipídeos (mais que 25% em peso seco) na forma de triglicerídeos (TAG) e esteril-ésteres (SEs). O acúmulo de lipídeos ocorre a partir da exaustão de algum nutriente primário diferente da fonte de carbono, sendo usualmente empregada a fonte de nitrogênio (precursor de aminoácidos e ácidos nucleicos) para tal finalidade.

Dessa forma, com a exaustão da fonte de nitrogênio, o crescimento celular torna-se inviável, e a assimilação da fonte de carbono é redirecionada para a síntese de lipídeos, como forma de reserva energética, formando-se assim os corpúsculos lipídicos.

Em leveduras oleaginosas, a biossíntese de lipídeos inicia-se com o declínio intracelular de adenosina monofosfato (AMP), desencadeado pela exaustão da fonte de nitrogênio (EVANS; SCRAGG; RATLEDGE, 1983). Desta maneira, a enzima isocitrato desidrogenase (dependente de AMP e NAD⁺) possui sua atividade reduzida, o que resulta no acúmulo de citrato dentro da mitocôndria. Citrato é então removido (via sistema de transporte na membrana mitocondrial, que exporta uma

molécula de citrato para o citosol em troca de uma molécula de malato). A molécula de citrato é então clivada no citosol (via ATP-citrato liase) em acetil-CoA e oxaloacetato. Acetil-CoA é então direcionado a síntese de lipídeos e oxaloacetato é convertido a malato para entrar novamente na mitocôndria e continuar o processo de exportação de citrato para o citosol celular, fornecendo acetil-CoA para a síntese de lipídeos (HYNES; MURRAY, 2010).

Outros microrganismos, não oleaginosos, quando submetidos à mesma condição de carência nutricional, não acumulam lipídeos, cessando o crescimento celular e redirecionando o metabolismo para a produção polissacarídeos, dentre eles glucanos e manoses.

Dessa forma, plantas e leveduras com capacidade de acumular óleos podem representar uma alternativa biotecnológica viável para produção de óleos, sendo de interesse especial para a indústria de biodiesel (BEOPOULOS; CHARDOT; NICAUD, 2009).

Atualmente, a produção de biodiesel (metil éster de ácido graxo (MEAG)) emprega principalmente óleos comestíveis. A demanda atual por combustíveis renováveis e mais “limpos” está aumentando e ao empregar óleos comestíveis na produção de MEAG, tem-se em contrapartida à maior demanda por áreas cultiváveis, que poderiam ser destinadas a produção de alimentos. Óleos microbianos representariam uma alternativa sustentável, na qual mesmo substratos poluentes (e.g. resíduos de produção de óleo de oliva, resíduos contendo hidrocarbonetos de petróleo etc.) poderiam ser empregados para tal finalidade.

Além disso, outros substratos de baixo valor agregado poderiam ser utilizados em processos que empregassem microrganismos geneticamente modificados para a produção de óleos com perfil lipídico desejado, atendendo às necessidades de produção de biocombustíveis, de produtos para indústria de química fina e até mesmo para indústria alimentícia.

Um exemplo bem sucedido de *Y. lipolytica* geneticamente modificada para tal finalidade é relatado por Tsigie et al. (2012). A cepa *Y. lipolytica* Po1g foi desenvolvida para ser capaz de utilizar hidrolisado de casca de arroz na produção de óleo microbiano.

3.6 Meios para o cultivo de *Y. lipolytica* e outras leveduras

A formulação de meios de cultura para o cultivo de leveduras segue regras similares às aplicadas ao cultivo de outros microrganismos. Principalmente, deve-se buscar suprir todos os requerimentos nutricionais específicos a cada espécie.

Basicamente, todos os microrganismos quimiorganotróficos necessitam de três classes de compostos para se desenvolverem:

- Macronutrientes (vide **tabelas 3**);
- Micronutrientes, i.e. elementos traço (vide **tabelas 4**);
- Fatores de crescimento, i.e. vitaminas (vide **tabelas 5**).

Diferentes espécies podem apresentar requerimentos nutricionais específicos que devem ser atendidos para que o cultivo em laboratório seja bem sucedido.

Tabela 3: Listagem dos principais elementos que compreendem a classe de macronutrientes indispensáveis ao desenvolvimento de microrganismos, sua forma assimilável e principal fonte. Tabela adaptada de Madigan et al. 2010.

Classe	Elemento	Forma assimilável e fonte
Macronutrientes	Carbono (C)	Compostos orgânicos (i.e. glicose, sacarose, etc.)
	Hidrogênio (H)	H ₂ O e compostos orgânicos
	Nitrogênio (N)	NH ₃ e compostos orgânicos nitrogenados
	Fósforo (P)	PO ₄ ³⁻ de sais de fósforo
	Enxofre (S)	Compostos orgânicos de enxofre e sulfetos metálicos
	Potássio (K)	K ⁺ de sais de potássio
	Magnésio (Mg)	Mg ²⁺ de sais de magnésio
	Sódio (Na)	Na ⁺ proveniente do NaCl ou outros sais de sódio
	Cálcio (Ca)	Ca ²⁺ de sais de cálcio
	Ferro (Fe)	Fe ²⁺ e Fe ³⁺ de sais de ferro

Tabela 4: Listagem dos principais elementos que compreendem a classe de micronutrientes necessários ao desenvolvimento de microrganismos e sua função no metabolismo celular. A maioria desses elementos é necessário em pequenas quantidades e são obtidos de fontes inorgânicas (saís dos respectivos compostos). Tabela adaptada de Madigan et al. 2010.

Classe	Elemento	Função celular
Micronutrientes ou elementos traço	Boro (B)	Presente em um autoindutor de <i>quorum sensing</i> em bactérias.
	Cromo (Cr)	Requerido por mamíferos para o metabolism de glucose. Necessidade microbiana ainda não confirmada, mas provável.
	Cobalto (Co)	Vitamina B ₁₂ e transcarboxilases
	Cobre (Cu)	Respiração, citocromo c oxidase, superóxidos dismutases, fotossíntese etc.
	Ferro (Fe)	Geralmente necessário em maior quantidade que os outros elementos listados. Atua nos citocromos, catalases, peroxidases, proteínas contendo ferro e enxofre, oxigenases e todas as nitrogenases.
	Manganês (Mn)	Ativador de diversas enzimas.
	Molibdênio (Mo)	Enzimas que contém flavina, nitrato redutases, sulfito oxidases etc.
	Níquel (Ni)	Maioria das hidrogenases, coenzima F ₄₃₀ de metanogênicos, monóxido de carbono desidrogenase e uréase.
	Zinco (Zn)	Anidrase carbônica, álcool desidrogenase, RNA e DNA polimerase e diversas proteínas de ligação ao DNA.

Tabela 5: Listagem dos principais fatores de crescimento e sua função no metabolismo celular. Tabela adaptada de Madigan et al. 2010. Continua na página 48.

Classe	Substância	Função
Fatores de crescimento	Ácido <i>p</i> -aminobenzóico	Precursor de ácido fólico
	Ácido fólico	Metabolismo de carbono e transferência de grupo metil.
	Biotina	Biossíntese de ácidos graxos; β -descarboxilação e algumas reações de fixação de CO ₂ .
	Cobalamina (B ₁₂)	Redução e transferência de fragmentos contendo um carbono; síntese de desoxirribose.
	Ácido lipolico	Transferência de grupo acil na descarboxilação de piruvato e α -cetoglutarato.
	Ácido nicotínico (niacina)	Precursor de NAD ⁺ ; transferência de elétrons nas reações de oxidação e redução.
	Ácido pantotênico	Precursor da Coenzima A; ativação do acetil e de outros derivados de acil.
	Riboflavina	Precursor de FMN, FAD em flavoproteínas envolvidas no transporte de elétrons.

	Tiamina (B ₁)	α -descarboxilação e transcetolase.
	Vitaminas B ₆ (grupo piridoxal- piridoxamina)	Transformação de aminoácidos e cetoácidos.
	Grupo de vitaminas K e quinonas	Transporte de elétrons e síntese de esfingolipídeos.
	Hidroamatos	Compostos que se ligam ao ferro e solubilização e transporte de ferro para o interior da célula.

Os meios de cultura geralmente são classificados de acordo com sua composição, e.g. complexo, definido e especial e/ou quanto a sua apresentação, e.g. sólido, semissólido e líquido. Geralmente a base de todo meio de cultura é líquida, e os meios semissólido e sólido são obtidos com a adição de diferentes concentrações de agente emulsificante, e.g. agarose (ou ágar), amido de batata, colágeno, pectina, goma xantana etc.

3.6.1 Meios de cultura complexos

Meios complexos de cultura são empregados para o cultivo de uma grande variedade de microrganismos. Possuem em sua composição derivados processados de animais, vegetais e fungos, tais quais: caseína (proteína do leite), carne (extrato de carne), soja (caldo trípico de soja), batata, células de leveduras (extrato de levedura), gelatina, extrato de malte, sangue etc.

Um dos meios mais empregados no cultivo de leveduras é o YPD. A sigla é proveniente do inglês, cujas iniciais denominam seus principais componentes: extrato de levedura (**Y**east **e**xtract), peptona (**P**eptone) e dextrose (**D**extrose). É considerado um meio de cultivo complexo, uma vez que não é possível precisar sua composição. Por conter aminoácidos essenciais, vitaminas e lipídeos, não pode ser empregado em testes de seleção de auxotróficos.

Outro meio complexo descrito para o cultivo de leveduras é o YMG. É composto basicamente por extrato de levedura (**Y**east **e**xtract), extrato de malte (**M**alte **e**xtract), peptona e glicose (**G**lucose).

Neste estudo o meio YPD foi utilizado na replicação de células (i.e. propagação de células saudáveis e viáveis a partir de uma amostra original) para criação de estoque celular e preparação de pré-inóculos.

Os meios complexos não são adequados a análises quantitativas do consumo de uma determinada fonte de carbono, sendo necessária a formulação de meios cuja composição conhecida e definida permita analisar precisamente a fonte de carbono consumida.

3.6.2 Meios de cultura definidos

Meios de cultura definidos, também conhecidos como meios de cultura sintético ou mínimo, em contrapartida aos meios complexos, possuem composição precisa da fonte de carbono, de elementos traço, de vitaminas, da fonte de nitrogênio e dos sais inorgânicos. São formulados obedecendo aos requerimentos nutricionais básicos do microrganismo que se pretende cultivar.

As vantagens desse meio incluem sua facilidade de preparação e adaptação. São usados em diversas aplicações microbiológicas: seleção de cepas auxotróficas, testes de assimilação de carbono (e.g. plaqueamento de réplica), influência de promotores de crescimento etc.

Formulações, específicas de um mesmo meio definido, podem ser obtidas de acordo com sua aplicação:

- **Meio seletivo**, no qual a ausência ou presença de uma substância (e.g. fonte de carbono, vitamina, antibiótico, aminoácido etc.) representa um fator de seleção perante outros microrganismos ou entre membros de uma mesma linhagem que possuam alguma mutação em relação a linhagem parental.
- **Meio diferencial**, no qual a adição de uma substância (geralmente um corante) indique a presença de uma reação associada ao crescimento (e.g. meio para identificação de cepas capazes de fermentar lactose, produzir ácidos orgânicos etc.).⁴

⁴ Cabe ressaltar que alguns meios clássicos diferenciais (e.g. meio diferencial MacConkey) podem ser meios complexos com a adição de corantes que o tornariam um meio diferencial.

Para leveduras, um meio industrializado muito utilizado é o YNB (**Y**east **N**itrogen **B**ase) da *Becton, Dickinson and Company* (BD, New Jersey, EUA). Esse meio de cultura é encontrado em diferentes apresentações (e.g. com e sem a adição de aminoácidos, sulfato de nitrogênio e outras variações). É um meio que contém todos os sais inorgânicos e vitaminas necessários ao cultivo de leveduras. É utilizado como base na preparação de diferentes meios, uma vez que permite a adição da fonte de carbono desejada. Por ser um meio pronto, sua preparação é rápida e prática. No entanto, a preparação de grandes quantidades para cultivos em maior escala torna-se demasiadamente onerosa. Para contornar tal situação, é possível determinar quais os requerimentos fisiológicos específicos do microrganismo a ser estudado e formular, a partir de componentes individuais, um meio definido.

4 MATERIAIS E MÉTODOS EXPERIMENTAIS

4.1 Preparação de materiais

Todos os materiais, reagentes e meios de cultura foram esterilizados em autoclave por vapor úmido (121 °C por 20 min) à exceção dos reagentes termicamente instáveis (tiamina, ureia, sacarose e YNB), os quais foram filtrados em membrana hidrofílica-PES estéril Millex-GP® de 0,22 µm (Millipore, Massachusetts, EUA).

4.2 Equipamentos

- Incubador rotativo com controle de temperatura e agitação (C24 *Incubator Shaker*, New Brunswick, Edison, EUA);
- Espectrofotômetro (Genesys 20, Thermo Scientific, Waltham, EUA);
- pHmetro (AJX-512, Micronal SSA, Brasil);
- Balança analítica (AUX-220, Shimadzu, Kyoto, Japão);
- Centrífuga refrigerada (NT-825, Novatecnica, Piracicaba, Brasil);
- Ultrafreezer (MDF-U30865, Sanyo, Moriguchi, Japão);

4.3 Meios de cultura

4.3.1 Meio YPD

O meio YPD empregado nesse estudo era composto por (g.l⁻¹):

- Extrato de levedura (BD, New Jersey, EUA), 10;
- Peptona bacteriológica (BD, New Jersey, EUA) 20;
- D-(+)-Glicose (≥99.5%, GC, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), 20;
- Água *Milli-Q* (q.s.p.).

Para meio YPD solidificado (YPDS) adicionou-se 20 g.l⁻¹ de ágar (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) na preparação do meio YPD.

4.3.2 Meio definido Barth (MDB)

O meio definido Barth (MDB) usado nesse estudo era composto por (g.l⁻¹):

- (NH₄)₂SO₄ - 3,0;
- KH₂PO₄ - 2,5;
- MgSO₄.7H₂O - 0,5;
- Água Milli-Q (q.s.p.).

Para cada litro de solução, adicionavam-se 1 ml de solução de elementos traço e 1 ml de solução de tiamina⁵. A correção para pH = 6.0 foi feita utilizando solução de KOH 1 M.

O meio originalmente propõe 5,0 g.l⁻¹ de fosfato de amônio (NH₄H₂PO₄) como fonte de nitrogênio. No entanto, foi feita a substituição por equivalente molar, tendo o nitrogênio amoniacoal como base de cálculo, por sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄).

A solução de elementos traço era composta por (g.l⁻¹):

- ZnSO₄.7H₂O - 0,4;
- MnSO₄.H₂O - 0,31;
- CoCl₂.6H₂O - 0,18;
- Na₂MoO₄.2H₂O - 0,24;
- CaCl₂.2H₂O - 12,45;
- FeCl₃.6H₂O - 2,0;
- H₃BO₃ - 0,5;
- KI - 0,1;

⁵ Detalhes sobre a preparação do meio e adição de solução de elementos traço e tiamina serão melhor esclarecidos no **item 4.8.1 Preparação do meio de cultivo para os ensaios quantitativos**.

- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,1;
- Água Milli-Q (q.s.p.).

O meio originalmente propõe como fonte de cálcio (Ca), manganês (Mn), molibdênio (Mo) e cobalto (Co) as seguintes concentrações de sais na solução de elementos traço (g.l^{-1}):

- $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 20,0;
- $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 0,4;
- Na_2MoO_4 - 0,2;
- CoCl_2 - 0,1.

As substituições foram feitas por equivalente molar ao elemento principal de cada composto (cálcio, manganês, molibdênio e cobalto).

A solução de cloreto de tiamina continha (g.l^{-1}):

- Cloreto de tiamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) - 0,3;
- Água Milli-Q (q.s.p.).

A solução de glicose continha 250 g.l^{-1} ($0,25 \text{ g.ml}^{-1}$ ou 25% p/v) de D-(+)-Glicose ($\geq 99.5\%$, GC, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), esterilizada por filtração.

A solução de glicerol continha 250 g.l^{-1} ($0,25 \text{ g.ml}^{-1}$ ou 25% p/v) de Glicerol (*for molecular biology*, $\geq 99\%$, Sigma, St. Louis, EUA), esterilizada por filtração.

4.3.3 Meios definidos adaptados

Para avaliação da resposta fisiológica a diferentes condições de cultivo, foi utilizado como base o MDB em todas as formulações.

O meio definido Barth com Ureia (MDBU) representa uma adaptação do MDB através da substituição da fonte de nitrogênio originalmente proposta, sulfato de amônio, por ureia. Adicionou-se ao MDB solução de ureia estéril (por filtração). A substituição foi pautada no trabalho de van Leeuwen et al. (2009) que descreve modificação de meio definido clássico para cultivo de *S. cerevisiae*, visando viabilizar cultivos em batelada sem controle de pH.

4.4 Microrganismos

O principal microrganismo investigado neste trabalho é a espécie de levedura denominada *Yarrowia lipolytica* 583 (IMUFRJ 50682) isolada originalmente de um estuário da Baía da Guanabara no Rio de Janeiro e identificada pelo Instituto de Microbiologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro (HAGLER; MENDONÇA-HAGLER, 1981).

A linhagem de *Yarrowia lipolytica* W29 (ATCC® 20460™ ou CBS7504 ou CLIB89) será utilizada como modelo comparativo, uma vez que é a linhagem mais extensamente caracterizada do gênero *Yarrowia*, possibilitando a comparação dos resultados obtidos neste estudo com a literatura aberta.

Ambas as cepas foram cedidas gentilmente pela Prof.^a Dr.^a Maria Alice Zarur Coelho do Departamento de Engenharia Bioquímica da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Brasil).

Quando utilizada a ferramenta de bioinformática BLAST^{®6} (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool), esta acessa as informações genômicas referentes à linhagem *Y. lipolytica* CLIB122.

Acredita-se que a linhagem *Y. lipolytica* CLIB122 seja semelhante à linhagem *Y. lipolytica* W29 (CLIB89). Não foi possível identificar com precisão as informações relativas a linhagem sequenciada, visto que na própria literatura as informações se confundem, se contradizem ou simplesmente não existem. Por exemplo, a primeira publicação dos dados relativos ao sequenciamento de *Y. lipolytica* foram reportados, erroneamente, como sendo referentes à linhagem *Y. lipolytica* CLIB99 e que para fins práticos nem existe (DUJON et al., 2004).

Ficou anotado na base de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information) que a linhagem foi submetida erroneamente, sendo explicitado que a linhagem correta é *Y. lipolytica* CLIB122.

O consórcio *Génolevures*⁷ é composto por 13 parceiros cuja missão é compilar informações referentes ao sequenciamento de diferentes leveduras (18 no

⁶ **BLASTN 2.2.29+**: Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "**Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs**", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

⁷ **Génolevures**: Genomic Exploration of the Hemiascomycete Yeasts:
(<http://genolevures.org/index.html#>)

total, dos quais nove apresentam sequenciamento completo). No site do consórcio, a linhagem CLIB122 apresenta status de sequenciamento completo, enquanto a linhagem CLIB89 (W29) apresenta status parcial.

No entanto, em publicação recente, Dujon (2010) desenvolve uma análise evolutiva genômica de leveduras, compilando as informações genéticas disponíveis até o momento para as leveduras sequenciadas (vide **tabela 14** em Anexo). Nesse trabalho, o autor faz referência à linhagem *Y. lipolytica* CBS7504, ou seja, à linhagem W29, citando-a como status de completamente sequenciada.

4.5 Estocagem

As cepas de *Y. lipolytica* foram recebidas em meio de cultura sólido. Inoculou-se 200 ml de meio YPD em erlenmeyer de 500 ml para incubação *overnight* a 30 °C e 200 rpm. Procedeu-se com a centrifugação de 10 ml do meio de cultivo a 5000 rpm (Força G = 3250) e lavagem das células com água destilada estéril. Posteriormente, a massa celular (*pellet* celular) foi ressuspensa em 40 ml de água destilada e 10 ml de glicerol estéreis (concentração de glicerol 20% (v/v).

De forma asséptica, pipetou-se 1 ml dessa suspensão celular em tubos criogênicos de 1,5 ml que foram devidamente catalogados e armazenados em *ultrafreezer* a – 80 °C. Esse estoque foi denominado “Estoque Mãe”. Repetiu-se o mesmo procedimento descrito acima, empregando um dos tubos criogênicos do “Estoque Mãe” como inóculo do meio YPD para formação do “Estoque de Trabalho”.

Antes da etapa de congelamento, as suspensões celulares foram analisadas em microscópio e plaqueada em meio de cultura solidificado YPD para confirmação de que não houve contaminação em nenhuma das etapas descritas.

É interessante notar que os procedimentos adotados no Grupo de Leveduras para o estoque de *S. cerevisiae* e outras leveduras são praticamente os mesmos, com a diferença de que não existe a etapa de ressuspensão em água destilada estéril. A adição de glicerol é feita no próprio meio de cultura YPD na concentração de 20% (v/v). No entanto, observou-se que tal procedimento implica em perda gradual da viabilidade dos estoques quando adotado para estocagem de *Y. lipolytica*.

4.6 Preparação do inóculo e inoculação

A metodologia de preparação dos inóculos nesse estudo foi desenvolvida com o objetivo de se obterem células ainda em fase de crescimento exponencial e no entanto, livres de metabólitos e resquícios do meio de cultura do inóculo. Além disso, tal sistematização e padronização visaram minimizar a formação de fase *lag* de crescimento nas cinéticas realizadas.

A preparação dos inóculos e inoculação podem ser divididas nas seguintes etapas:

- Pré-inóculo
- Inóculo
- Cálculo do volume de inóculo
- Lavagem
- Inoculação

4.6.1 Pré-inóculo

Primeiramente, procedia-se com a preparação de um pré-inóculo: um (1) tubo criogênico do Estoque de Trabalho era descongelado a temperatura ambiente. Posteriormente, vertia-se todo o conteúdo em erlenmeyer de 500 ml contendo 100 ml de meio YPD que era incubado em *shaker* rotativo a 28 °C e 200 rpm por um período de 8 a 12 h (*overnight*).

4.6.2 Inóculo

Seguia-se com a preparação do inóculo propriamente dito: 1 ml de pré-inóculo era pipetado em erlenmeyer com deflectores de 500 ml contendo 100 ml de MDB. Posteriormente, adicionavam-se as soluções estéreis de tiamina e de fonte de carbono. A fonte de carbono usada nos inóculos era sempre a mesma dos cultivos a serem inoculados, evitando-se assim a formação de fase *lag* de crescimento. A concentração de glicose na preparação dos inóculos foi sempre 20 g.l⁻¹. Para outras

fontes de carbono, empregava-se concentração equivalente à da glicose, com base na quantidade molar de carbono.

O tempo de incubação necessário para obtenção de células ainda em fase de crescimento exponencial era de 8 a 12 h, no máximo, em *shaker* rotativo a 28 °C e 200 rpm.

4.6.2.1 Cálculo do volume de inóculo

Uma alíquota do inóculo era amostrada assepticamente para obtenção da medida de absorvância ($Abs_{Inóculo}$). Utilizando a **equação 1**, obtinha-se o volume de inóculo necessário para obtenção da absorvância inicial nos cultivos.

$$Abs_{Inóculo} \times V_{Inóculo} = Abs_{Cultivo} \times V_{Cultivo} \quad (1)$$

Onde:

$Abs_{Inóculo}$ = Medida de absorvância do inóculo;

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

$Abs_{Cultivos}$ = Valor de absorvância inicial desejada para os cultivos;

$V_{Cultivo}$ = Volume dos cultivos a serem inoculados;

4.6.2.2 Lavagem

As etapas de lavagem consistiam na centrifugação a 5000 rpm do volume calculado de inóculo ($V_{Inóculo}$), ressuspensão das células em MDB estéril e centrifugação a 5000 rpm. A etapa de ressuspensão era realizada duas vezes para garantir que nenhum metabólito e/ou resquício da fonte de carbono, provenientes do inóculo, fossem adicionados na etapa de cultivo.

4.6.3 Inoculação

As células eram então ressuspensas em MDB estéril sem fonte de carbono e inoculadas nos frascos de cultivo o mais rapidamente possível.

A maioria dos cultivos foi realizada em duplicata ou triplicata. Portanto, para cada linhagem estudada havia no mínimo dois frascos de cultivo a serem inoculados. Para facilitar todo o procedimento, que deve ser feito o mais rapidamente possível, o volume calculado de inóculo ($V_{Inóculo}$) era multiplicado por cinco. Após a etapa de lavagem, o *pellet* de células limpas era ressuspenso em 5 ml de MDB estéril sem fonte de carbono. Para cada frasco, procedia-se com a inoculação de 1 ml dessa suspensão celular.

4.7 Ensaios de diluição seriada em meio solidificado

A metodologia de diluição seriada em meio solidificado foi empregada nesse estudo para avaliar, de forma qualitativa, quais os efeitos observáveis no desenvolvimento das colônias formadas quando diferentes fatores nutricionais (i.e. fontes de carbono, elementos traço e tiamina) e de estresse (i.e. NaCl) eram adicionados ao meio de cultivo.

O método aplicado nessa etapa tem como base o protocolo utilizado por Della-Bianca e Gombert (2013) para estudo de estresse para diferentes linhagens de *S. cerevisiae*.

Shifrine; Phaff e Demain (1954) realizaram um estudo bem elaborado para determinação do padrão de assimilação de fontes de carbono em leveduras. Embora a metodologia empregada nesse estudo tenha sido bem diferente, os critérios analíticos adotados pelos autores para avaliação do crescimento serviram como referência na interpretação dos resultados obtidos nessa etapa. Shifrine; Phaff e Demain (1954) basearam-se nas técnicas clássicas que empregam testes de assimilação de carbono para a classificação de leveduras, método esse desenvolvido por Wickerham e Burton (1948).

4.7.1 Diluição seriada para análise qualitativa da assimilação de diferentes fontes de carbono em diferentes condições de cultivo

Para avaliar a capacidade de assimilação de diferentes fontes de carbono, empregou-se o MDB solidificado pela adição de 20 g.l⁻¹ de ágar (MDBS). Nessa etapa, foi realizada a avaliação da subtração de tiamina e/ou elementos traço no crescimento de ambas as linhagens de *Y. lipolytica* em glicose. Para as outras fontes de carbono, avaliou-se a subtração somente de tiamina, também para ambas as linhagens de *Y. lipolytica*, conforme esquema mostrado na **tabela 6**.

4.7.1.1 Preparação das placas com MDB solidificado

Para preparação das placas, criou-se uma tabela esquemática, contendo a numeração de controle das placas e sua composição (vide **tabela 6**).

Tabela 6: Esquema da composição das diferentes placas de MDBS. O símbolo (+) indica a presença do composto e (-) indica a ausência. CNC representa o controle negativo de crescimento e CPC o controle positivo de crescimento.

Nº Controle	Elemento Traço	Tiamina	Glicose	Glicerol	Sacarose	Xilose	Citrato	Acetato
1 (CNC)	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	+	-	-	-	-	-	-
3 (CPC)	+	+	+	-	-	-	-	-
4	+	-	+	-	-	-	-	-
5	-	+	+	-	-	-	-	-
6	+	+	-	+	-	-	-	-
7	+	-	-	+	-	-	-	-
8	+	+	-	-	+	-	-	-
9	+	-	-	-	+	-	-	-
10	+	+	-	-	-	+	-	-
11	+	-	-	-	-	+	-	-
12	+	+	-	-	-	-	+	-
13	+	-	-	-	-	-	+	-
14	+	+	-	-	-	-	-	+
15	+	-	-	-	-	-	-	+

Para se ter uma referência do crescimento, criaram-se os controles de crescimento. Controle Negativo de Crescimento (CNC) foi formulado com as

condições onde o crescimento não deveria ocorrer pela ausência de fonte de carbono, elementos traço e tiamina. Já o Controle Positivo de Crescimento (CPC), foi formulado de forma a garantir que o crescimento ocorra, normalmente.

Para tal, o MDB foi preparado sem adição de tiamina e elementos traços. Erlenmeyers de 100 ml foram devidamente nomeados de acordo com o esquema da **tabela 6**. Procedeu-se com a pesagem das seguintes quantidades de fontes de carbono, calculadas para obter-se concentração final equivalente, em carbono, a 20 g.l⁻¹ de glicose:

- Glicose – 1,000 g.
- Glicerol – 1,022 g.
- Etanol – 0,768 g (Equivale a 0,973 ml, considerando $\rho_{\text{Etanol}} = 0,789$).
- Sacarose – 0,950 g.
- Xilose – 0,999 g.
- Citrato de sódio – 1,632 g.
- Acetato de sódio – 2,265 g.

Todas as fontes de carbono foram autoclavadas com um 1 grama de ágar e 50 ml de MDB previamente preparado, a exceção do etanol (volátil) e sacarose (termicamente instável).

Após autoclavagem, com o meio ainda liquefeito, adicionaram-se, de forma asséptica, as fontes de carbono restantes e as soluções de tiamina e elementos traço, ambas estéreis.

4.7.1.2 Diluição seriada, plaqueamento e incubação

Os inóculos foram preparados de acordo com o descrito no **item 4.6**. Com o *pellet* de células “limpas” obtidas ao final do processo, preparou-se uma suspensão celular, em água destilada estéril, com valor de Abs₆₀₀ de 0,1. A partir dessa solução, foram feitas quatro diluições sucessivas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}) em água destilada estéril. O objetivo era obter 5 soluções com valores de Abs₆₀₀ de 0,1 a 0,00001.

As placas foram divididas ao meio, representando cada uma das linhagens estudadas, e numa linha sequencial horizontal foram feitos os *spots* pipetando-se manualmente 5 µl de cada solução (vide **figura 6**).

Figura 6: Esquema do plaqueamento adotado para todos os ensaios de diluição seriada. W29 representa o segmento da placa contendo somente os *spots* da linhagem *Y. lipolytica* W29. UFRJ representa o segmento da placa contendo somente os *spots* da linhagem *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682.

As placas foram incubadas a 30 °C em estufa. Fotografias foram tiradas, em fluxo laminar, após 24 e 48 h de incubação.

4.7.2 Diluição seriada em meio YPD solidificado para análise do estresse salino

Para avaliação da resposta do crescimento ao estresse salino, foi empregado meio de cultivo YPDS adicionado de diferentes quantidades de NaCl.

4.7.2.1 Preparação das placas com YPDS e cloreto de sódio

Os meios YPDS com as devidas concentrações de cloreto de sódio (NaCl) foram autoclavadas e vertidas, ainda liquefeitas, nas placas *petri*.

Como controle positivo de crescimento (CPC) usou-se o meio YPDS sem adição de NaCl. A concentração de NaCl nas demais placas foi de 0,3 M, 0,6 M, 1,0 M, 1,5 M e 2,0 M.

4.7.2.2 Diluição seriada, plaqueamento e incubação do teste de estresse salino

Os inóculos dessa etapa foram preparados em meio YPD. Um tubo criogênico de cada linhagem foi usado para inocular 100 ml de meio YPD em erlenmeyer de 500 ml.

Após 8 h de incubação a 28 °C e 200 rpm, as células foram centrifugadas e lavadas em água destilada estéril. A partir desse *pellet* de células, preparou-se uma suspensão celular, em água destilada estéril, com valor de Abs₆₀₀ de 0,1. A partir dessa solução, foram feitas quatro diluições sucessivas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}) em água destilada estéril. O objetivo era obter 5 soluções com valores de Abs₆₀₀ de 0,1 a 0,00001.

As placas foram divididas ao meio, representando cada uma das linhagens estudadas, e numa linha sequencial horizontal foram feitos os *spots* pipetando-se manualmente 5 µl de cada solução (vide **figura 6**).

As placas foram incubadas a 30 °C em estufa. Fotografias foram tiradas, em fluxo laminar, após 24 e 48 h de incubação.

4.8 Ensaio quantitativos em meio líquido

Para os ensaios quantitativos, empregou-se um sistema de cultivo e amostragem (vide **figura 7**) desenvolvido no Grupo de Leveduras para realização de cinéticas de crescimento de leveduras.

4.8.1 *Preparação do meio de cultivo para os ensaios quantitativos*

O meio usado nos ensaios quantitativos foi o MDB (descrito no **item 4.3.2**). A preparação começava com a adição dos sais inorgânicos, fonte de nitrogênio (quando usado sulfato de amônio), solução de elementos traço e solução de KOH

para correção do pH. Posteriormente, vertia-se 100 ml desse meio em erlenmeyers de 500 ml com deflectores. Todo o aparato de cultivo era então autoclavado, com os tubos de silicone pinçados.

Após atingir temperatura ambiente, adicionava-se, individualmente e de forma asséptica, 0,1 ml de solução de cloreto de tiamina. Nos ensaios que empregaram ureia como fonte de nitrogênio, 1 ml de solução estéril de ureia (0,14 g.ml⁻¹) foi adicionada nessa etapa.

A adição de solução contendo a fonte de carbono só era feita após a inoculação dos frascos, visando garantir uma maior uniformidade no início das bateladas, na concentração indicada em cada etapa, utilizando a solução estéril de fonte de carbono com concentração conhecida.

4.8.2 Sistema de cultivo e de amostragem

O sistema de cultivo e amostragem foi concebido de forma a preservar a cultura pura ao longo da realização de cinéticas de crescimento de leveduras, mesmo com a tomada de amostras.

Consiste basicamente num erlenmeyer (geralmente de 500 ml e no caso desse estudo com deflectores para aumentar a transferência de oxigênio para o meio líquido), rodilhão de algodão, tubo flexível de silicone (*Masterflex* 96410-13), agulha de cateter (periférico IV 14G, *Solidor*), agulha de seringa (hipodérmica de 1,20x25 18G1, *BD*) e pinça de Mohr. A configuração do sistema é mostrada na **figura 7**.

Figura 7: Sistema de cultivo em frasco agitado desenvolvido no Grupo de Leveduras para realização de cinéticas de crescimento de leveduras. A esterilização era feita com todo o sistema de cultivo montado. A pinça de Mohr era usada para pinçar o tubo flexível, evitando-se assim a contaminação do meio após a esterilização e durante o cultivo/amostragens.

4.8.3 Cultivo e amostragem

Os cultivos foram realizados em incubador rotativo a 28 °C e 200 rpm. Para garantir o controle de temperatura, era necessário garantir que a temperatura ambiente estivesse abaixo de 28 °C.

Amostragem era feita em intervalos de 1 hora, com o auxílio de uma seringa. Descartavam-se os 2 ml iniciais de cada amostragem, garantindo que o volume “morto” do tubo não fosse aspirado na amostra coletada.

Usualmente, amostrava-se de 2 a 3 ml de meio de cultivo. Prosseguia-se imediatamente para tomada de medida de absorbância e posteriormente a medida de pH, quando necessário.

O restante do meio, aproximadamente 1 ml, era filtrado em Millex® GV Membrana Durapore® em PVDF, 0,22 µm, não-estéril (Millipore, Massachusetts, EUA) diretamente nos *vials* de amostras de HPLC.

Os *vials* eram identificados e congelados a – 6 °C até serem processados.

4.9 Métodos analíticos

4.9.1 Quantificação da concentração celular

O crescimento celular foi acompanhado através de medidas de absorbância em espectrofotômetro ajustado no comprimento de onda de 600 nm. Esses valores foram convertidos para gramas de massa seca celular [g DW] por litro [l] utilizando-se o fator de conversão obtido pela curva de massa seca (vide **figuras 18** no Apêndice para as curvas de calibração e os fatores de conversão).

Para a obtenção da curva de massa seca, realizou-se cultivo em MDB com a respectiva fonte de carbono, i.e. glicose ou glicerol, para obtenção de uma suspensão com alta concentração celular, ainda em fase de crescimento exponencial. A suspensão de células foi centrifugada, lavada e ressuspensa em água destilada.

A partir dessa suspensão celular, foram realizadas quatro diluições. Todas as suspensões obtidas tiveram os valores de absorbância determinados.

Das diluições obtidas, alíquotas, em triplicata, foram filtrada em membrana MF-Millipore®, hidrofílica, 0,45 µm, não-estéril (Millipore, Massachusetts, EUA), previamente secas e com suas massas individuais determinadas.

As membranas com o *pellet* celular permaneceram secando, *overnight* em estufa a 80 °C (garantindo assim que atingissem peso constante, ou seja, ausência de umidade). A subtração entre o valor obtido da massa da membrana com células e da membrana completamente seca, é equivalente ao valor de massa seca celular [g DW]. Para obtenção do valor de concentração celular em massa seca [g DW.l⁻¹] os valores obtidos foram divididos pelos respectivos volumes usados na filtração de cada amostra.

A correlação entre absorbância e massa seca foi obtida plotando-se os valores de absorbância (Abs₆₀₀) versus massa seca celular [g DW]. A equação

obtida da regressão linear foi aplicada para conversão de todos os valores de absorbância (Abs_{600}) em concentração celular em massa seca $[g\ DW.l^{-1}]$.

4.9.2 Cálculo dos parâmetros cinéticos associados aos cultivos em batelada

Para o cálculo dos parâmetros cinéticos e análises estatísticas, foi utilizado o *software* GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, EUA).

Para as curvas de crescimento absoluto, os valores de concentração celular em massa seca $[g\ DW.l^{-1}]$; ordenada) foram plotados versus o tempo (abscissa). Para as curvas de consumo de substrato, o mesmo foi feito para a concentração da fonte de carbono $(g.l^{-1}\ S$; ordenada) versus o tempo (abscissa).

Para o cálculo das velocidades máximas específicas de crescimento ($\mu_{\max}$; em $[h^{-1}]$), gerou-se um gráfico do logaritmo neperiano dos valores de concentração celular em massa seca $[g\ DW.l^{-1}]$; ordenada) versus o tempo $([t]$; abscissa).

Aplicando regressão linear no trecho equivalente ao crescimento exponencial, foi possível obter o valor do coeficiente angular desta curva, que representa o valor de $\mu_{\max}$ em $[h^{-1}]$. Foram considerados os valores que apresentavam melhor R^2 na obtenção deste parâmetro. Os valores de $\mu_{\max}$ obtidos com o uso do *software* GraphPad Prism 6 equivalem a média aritmética das três triplicatas, e são apresentados juntamente com o SEM.

Para obtenção do fator de conversão de substrato a biomassa, i.e. rendimento celular, na fase exponencial ($Y_{X/S}^{exp}$), foi necessário gerar um gráfico com os valores de concentração celular em massa seca $[g\ DW.l^{-1}]$; ordenada) em função dos valores de concentração de substrato $[g\ S.l^{-1}]$; abscissa). O valor do módulo do coeficiente angular, obtido pela regressão linear dos dados em fase exponencial (melhor ajuste de R^2) equivale ao $Y_{X/S}^{exp}$ em $[(g\ DW).(g\ S)^{-1}]$.

A velocidade máxima específica de consumo de substrato (r_s^{max}) em $[g\ S.(g\ DW.h)^{-1}]$ foi obtido pela **equação 2**:

$$r_s^{max} = \mu_{\max} / Y_{X/S}^{exp} \quad (2)$$

4.9.3 Determinação da concentração da fonte de carbono

As alíquotas obtidas durante os cultivos foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (**High Performance Liquid Chromatography**, HPLC). A separação dos compostos foi obtida em coluna analítica de partição iônica moderada Aminex[®] HPX-87H (Bio-Rad, Hercules, EUA) a 30 °C. Solução de H₂SO₄ 5 mM foi usada como fase móvel, com vazão de 0,6 ml/min e tempo de corrida individual de 25 minutos.

O detector utilizado para quantificação foi o de índice de refração (**Refractive Index Detector** RID 2414, Waters, Milford, EUA) a 40 °C e sensibilidade de 64. A sensibilidade padrão utilizada é de 32, no entanto como os cultivos foram realizados em concentrações muito baixas, optou-se por aumentar a sensibilidade e consequentemente a resposta do sinal obtido pelo detector.

4.9.4 Identificação de metabólitos extracelulares

Para identificar a formação de metabólitos extracelulares, as alíquotas foram analisadas em HPLC nas mesmas configurações utilizadas para determinação da concentração da fonte de carbono.

As configurações estabelecidas pelo Grupo de Leveduras para identificação de metabólitos produzidos por *S. cerevisiae* não se aplicaram às necessidades deste projeto.

Observou-se a necessidade de alterar a temperatura da coluna, visando uma melhor separação dos ácidos orgânicos comumente observados nos cultivos de *Y. lipolytica*, i.e. ácido cítrico e isocítrico. A sensibilidade do detector foi ajustada para obtenção da melhor resposta possível do sinal elétrico, uma vez que as concentrações utilizadas nos cultivos são, comparativamente, muito inferiores.

Na tentativa de identificar os metabólitos que por ventura fossem formados, foi determinada o tempo de retenção (**Retention Time**, RT) do ácido láctico. O valor obtido foi utilizado para conversão dos valores de tempo de retenção relativas de diferentes compostos, disponíveis no manual fornecido pelo fabricante da coluna cromatográfica (*Aminex[®] HPX-87H Column, Industry Standard for HPLC Analysis of Small Molecules, US/EG Bulletin 1847*).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ensaio de diluição em série

O objetivo destes experimentos de diluição seriada em placa de Petri era determinar se as fontes de carbono glicose, sacarose, xilose, glicerol, etanol, citrato ou acetato são assimiláveis pelas linhagens estudadas neste trabalho, quais sejam *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 e *Y. lipolytica* W29. Os resultados destes experimentos norteariam os experimentos seguintes, ou seja, possibilitariam a escolha das fontes de carbono a serem empregadas nos cultivos em meio líquido, que tiveram o objetivo de fornecer dados para o cálculo de parâmetros fisiológicos como velocidades específicas e fatores de conversão para ambas as linhagens de levedura.

Mesmo que referências da literatura indiquem as fontes comumente assimiláveis pelo gênero *Yarrowia* (vide **tabela 1**), faz-se necessário corroborar essas informações com resultados empíricos para cada linhagem.

5.1.1 Resultados preliminares de cultivos em meio solidificado

As linhagens deste estudo foram testadas em meio solidificado complexo e definido (vide **figura 17** no Apêndice para detalhes sobre os meios utilizados e metodologia). Esses testes foram conduzidos em paralelo com as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-7D e *Kluyveromyces lactis* CBS 2309 para fins de comparação, tendo em vista que no nosso grupo de pesquisa outros trabalhos relacionados à fisiologia dessas leveduras já haviam sido realizados.

5.1.1.1 Determinação da temperatura de incubação

A temperatura de incubação foi determinada após ensaios de incubação a 10, 30 e 37 °C. Os resultados, não mostrados nesse trabalho, indicaram que a 10 °C, somente a linhagem *Y. lipolytica* W29 apresenta crescimento, extremamente

lento nestas condições, uma vez que colônias só puderam ser observadas após 16 dias de incubação.

A 37 °C, nenhuma das linhagens de *Y. lipolytica* foi capaz de crescer, corroborando as informações da literatura, que estabelecem limite máximo de temperatura de crescimento de 32 a 35 °C para a espécie *Yarrowia lipolytica* (HAGLER; MENDONÇA-HAGLER, 1979; KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011).

Portanto, a temperatura de incubação foi definida como sendo 30 °C para a realização dos experimentos em meio solidificado, uma vez que ambas as linhagens apresentaram crescimentos apreciável, tanto em meio complexo, quanto em meio definido, em período de 24 a 48 h.

5.1.1.2 Capacidade biossintética do gênero *Yarrowia*

Dos resultados preliminares (vide **figura 17** no Apêndice), observa-se que a adição de solução de vitaminas (D-biotina, pantotenato de cálcio, ácido nicotínico, mio-inositol, cloreto de tiamina, hidrocloreto de piridoxol e ácido 4-aminobenzóico) não é tão determinante no desenvolvimento das colônias das linhagens de *Y. lipolytica*, quando comparada à *S. cerevisiae* e à *K. lactis*.

Deve-se levar em consideração que os inóculos desta etapa foram feitos em meio YPD (discussão mais aprofundada no **item 5.2.3.2**). No entanto, fica evidente que as linhagens de *Y. lipolytica* apresentam maior capacidade biossintética em relação às outras duas espécies estudadas, i.e. necessita de menos fatores de crescimento no meio de cultivo (vide **tabela 5**). *S. cerevisiae* e *K. lactis* mostraram-se muito mais sensíveis à subtração de vitaminas do meio definido.

Estes resultados são condizentes com a formulação do meio proposta por Barth e Gaillardin (1996) para o cultivo de *Y. lipolytica* (vide **itens 3.6.2 e 4.3.2**), adotado como meio padrão para os experimentos apresentados neste trabalho. Como já descrito, esse meio sugere a adição de um único fator de crescimento, o cloreto de tiamina, tendo em mente que *Y. lipolytica* exibe auxotrofia somente a este fator.

5.1.2 Assimilação de diferentes fontes de carbono

A modificação da metodologia para preparo de inóculo conduziu a resultados muito mais precisos e coerentes com aqueles disponíveis na literatura. Isto ocorreu a partir do momento em que, em vez de realizar os inóculos em meio complexo YPD, passou-se a realizá-los no mesmo meio de cultivo a ser usado na etapa seguinte, ou seja, do cultivo propriamente dito. Por exemplo, nos ensaios preliminares de cultivo em meio solidificado (vide **figura 17** no Apêndice), ambas as linhagens de *Y. lipolytica* apresentaram crescimento, bastante significativo, em meio contendo sacarose. A incoerência desses resultados (considerando-se que não era esperado o crescimento desta espécie em sacarose como única fonte de carbono) será discutida com maior profundidade no **item 5.2.3.2 Preparação do inóculo**.

Das fontes de carbono investigadas (glicose, sacarose, xilose, glicerol, etanol, citrato ou acetato), os resultados mostram que somente glicose e glicerol são assimiláveis por ambas as linhagens como única fonte de carbono e energia (vide **tabela 7 e 8**, resultados de nº de controle 3 e 6).

Tabela 7: Resultados dos ensaios em meio solidificado (MDBS) para avaliação da capacidade de assimilação de diferentes fontes de carbono (glicose, glicerol, sacarose, xilose, citrato e acetato). Os resultados apresentados são referentes às 48 h de incubação. Não são apresentados os resultados obtidos para etanol (vide item 5.1.2.2).

Numeração de Controle	Linhagem W29	Linhagem IMUFRJ 50682
1 - CNC
2 - CNC + Tiamina
3 - CPC (Glicose + Tiamina + Elem. traço)
4 - (Glicose + Elem. traço)
5 - (Glicose + Tiamina)
6 - (Glicerol + Tiamina + Elem. traço)
7- (Glicerol+ Elem. traço)
8 - (Sacarose + Tiamina + Elem. traço)
9 - (Sacarose+ Elem. traço)
10 - (Xilose + Tiamina + Elem. traço)
11 - (Xilose + Elem. traço)
12 - (Citrato + Tiamina + Elem. traço)
13 - (Citrato + Elem. traço)
14 - (Acetato + Tiamina + Elem. traço)
15 - (Acetato + Elem. traço)

A seguir, os resultados obtidos foram convertidos em notação de símbolos e compilados em uma única tabela (vide **tabela 8**), para melhor visualização dos resultados. A sistematização utilizada para avaliação do crescimento baseia-se na que usualmente é encontrada nas referências de microbiologia para estudos similares (e.g. como em *The Yeast, a Taxonomic Study* por Kurtzman; Fell e Boekhout (2011)).

Tabela 8: Resultados compilados e classificados de acordo com o crescimento de *Y. lipolytica* observado nas fontes de carbono investigadas (glicose, glicerol, sacarose, xilose, citrato e acetato) nas diferentes composições de meio definido solidificado (MDBS).

Numeração de Controle	Linhagem W29	Linhagem IMUFRJ 50682
1 - CNC	-	-
2 - CNC + Tiamina	-	-
3 - CPC (Glicose + Tiamina + Elem. traço)	+	+
4 - (Glicose + Elem. traço)	w	w/-
5 - (Glicose + Tiamina)	+	+
6 - (Glicerol + Tiamina + Elem. traço)	+	+
7 - (Glicerol + Elem. traço)	w	w
8 - (Sacarose + Tiamina + Elem. traço)	w	w
9 - (Sacarose + Elem. traço)	w	w
10 - (Xilose + Tiamina + Elem. traço)	-	w
11 - (Xilose + Elem. traço)	-	w
12 - (Citrato + Tiamina + Elem. traço)	+	-
13 - (Citrato + Elem. traço)	+	-
14 - (Acetato + Tiamina + Elem. traço)	w	w
15 - (Acetato + Elem. traço)	w	w

Legenda: (+) apresenta crescimento; (-) não apresenta crescimento e (w) crescimento fraco (*weak*).

5.1.2.1 Glicose e glicerol, as fontes de carbono que permitiram bom crescimento de *Y. lipolytica*

Os resultados obtidos no controle negativo de crescimento (nº de controle 1-CNC), garantem que as células provenientes do inóculo não são capazes de apresentar crescimento em meio isento de uma fonte de carbono. Ficou comprovado também que o meio contendo somente tiamina (nº de controle 2) e nenhuma fonte de carbono, não é capaz de suportar crescimento celular. Os resultados do controle negativo estabeleceram o critério de definição “não apresenta crescimento”, para todas as outras fontes de carbono.

A criação desse controle fez-se necessária uma vez que foi observada a capacidade das células de *Y. lipolytica* em armazenar lipídeos como fonte de

energia ou mesmo capazes de “carregar” elementos complexos quando a preparação do inóculo era feita em meio YPD (vide **item 5.2.3.2**). Dessa forma, os resultados obtidos poderiam representar um “falso positivo”, visto que as células estariam utilizando suas reservas energéticas para o crescimento ao invés da fonte de carbono a ser testada.

O ensaio de diluição seriada permite isolar células que irão originar uma única colônia, quando são empregadas as suspensões mais diluídas (à direita na placa), permitindo uma melhor visualização e comparação dos resultados.

Analisando-se a morfologia das colônias formadas, fica clara a distinção exibida pelas células cultivadas em glicose e glicerol quando comparadas às outras fontes de carbono. O crescimento em glicose e glicerol propicia a formação de colônias protuberantes, circulares e de coloração branco-bege. Comparando-se as duas fontes de carbono, observa-se que as colônias formadas em glicerol são maiores que as formadas em glicose e que as colônias formadas em glicose e glicerol são comparativamente maiores que aquelas obtidas com outras fontes de carbono.

Mesmo que não se tenha estabelecido critérios de classificação para os diferentes tipos de crescimento obtidos, é interessante notar que ambas as fontes de carbono mencionadas anteriormente são capazes de suportar crescimento, aparentemente mais saudável, se comparadas com as demais, nas mesmas condições nutricionais.

Os resultados de nº de controle 3, 4, 5, 6 e 7 evidenciam a auxotrofia exibida por ambas as linhagens à tiamina para o crescimento em glicose e glicerol. Uma vez que a tiamina é precursora da tiamina trifosfato, molécula constituinte do complexo multienzimático piruvato desidrogenase (vide **item 3.4.2**), é possível corroborar a informação de que ambas as fontes de carbono supracitadas são processadas, via tronco da glicólise e oxidadas no CAC para geração de energia e metabólitos (vide **figura 23** em Anexo).

Cabe ressaltar ainda que o fraco crescimento exibido para os meios sem adição de tiamina (nº de controle 4 e 7) é provavelmente resultado da presença de “estoque” intracelular de tiamina, proveniente das células do inóculo, porém insuficientes para o crescimento da população.

Fica evidente ainda que a adição de tiamina é fator preponderante, quando comparada à adição de elementos traço, uma vez que o resultado de nº de controle 5 (somente com glicose e tiamina) apresenta crescimento idêntico ao meio contendo glicose, elementos traço e tiamina (nº de controle 3 - CPC)⁸. No entanto, deve-se levar em consideração que o crescimento apresentado nos *spots* é muito menor, quantitativamente, daquele que normalmente ocorre em meio líquido, por limitações difusionais, por exemplo. Em meio líquido, em que as células têm acesso a todos os nutrientes disponíveis, os elementos traço iriam ser limitantes do crescimento, em alguma etapa do cultivo.

5.1.2.2 Etanol

Os resultados para o teste de assimilação de etanol em meio solidificado não foram bem sucedidos, e portanto não foram incluídos na tabela de resultados.

Durante a realização dos ensaios com etanol, observava-se que após a adição de etanol na preparação dos meios, este não formava uma mistura homogênea durante a solidificação. A maior parte do etanol adicionado permanecia na superfície do meio, tornando o crescimento celular impróprio nesta região após a inoculação (formação dos *spots*).

Testes foram realizados posteriormente em meio líquido, e ficou comprovado que somente a linhagem W29 apresenta crescimento, porém muito lento, em etanol. Para mais detalhes sobre o metabolismo de etanol em *Y. lipolytica* vide **itens 3.4.5 e 5.1.2.6** (detalhes sobre os ensaios com etanol, vide **tabela 13** no Apêndice).

5.1.2.3 Sacarose

Para sacarose, os resultados mostram pouquíssimo crescimento (vide **tabela 7 e 8**, de nº de controle 8 e 9) para ambas as linhagens, diferente daqueles obtidos anteriormente (vide **figura 17** no Apêndice).

⁸ Cabe ressaltar que a água utilizada em todos os ensaios, incluindo este, é primeiramente destilada e posteriormente deionizada via sistema *Milli-Q*, cujas sucessivas etapas de filtração em resina e deionização garantem ausência de minerais provenientes do sistema público de abastecimento de água (*Type 1 ultrapure water*, ASTM (D1193-91)).

No entanto, mesmo este crescimento é surpreendente. Algo que chama a atenção é a insensibilidade desse crescimento à subtração de tiamina. Era de se esperar que, caso ocorresse crescimento, este fosse resultante da assimilação da glicose e/ou frutose, provenientes da hidrólise da sacarose, e portanto auxotrófico à tiamina.

Para analisar melhor a questão, a ferramenta de bioinformática BLAST[®] foi utilizada na tentativa de se determinar a existência do gene codificador de uma invertase em *Y. lipolytica* (vide **item 4.4**).

Para tal, a sequência de nucleotídeos que codificam a invertase (β -frutofuranosidase) produzida por *S. cerevisiae* 288c (linhagem de laboratório bastante conhecida, caracterizada e cujo genoma foi completamente sequenciado) foi submetida na ferramenta de pesquisa BLAST[®]. O gene *SUC2*, responsável por codificar a invertase, possui sequência de 1599 nucleotídeos. Foi possível identificar no genoma da *Yarrowia lipolytica* CLIB122 uma sequência equivalente, em tamanho, a 99% da original (1589 bases), com 100% de identidade. O resultado indica que existe no genoma da *Y. lipolytica* um gene codificador de invertase e que portanto a incapacidade de esta levedura crescer (ou sua baixíssima capacidade de crescimento) em sacarose não é devida à ausência do gene da invertase.

A literatura reporta, extensamente e detalhadamente, a espécie *Y. lipolytica* como sendo incapaz de assimilar sacarose (vide **tabela 1**) (BARTH; GAILLARDIN, 1997; FÖRSTER et al., 2007a). Uma hipótese para esta observação seria a incapacidade de *Y. lipolytica* em expressar e secretar a enzima invertase para o periplasma, com o objetivo de hidrolisar a sacarose, assim como ocorre em *S. cerevisiae*.

Sabe-se que linhagens modificadas geneticamente com a adição do gene *ScSUC2* (que codifica a invertase em *S. cerevisiae*) sob promotor *XPR2*⁹ de *Y. lipolytica* são capazes de assimilar sacarose para produção de ácido cítrico (FÖRSTER et al., 2007a). Tendo como base essa informação, é possível levantar a hipótese de que o gene nativo de *Y. lipolytica* não é expresso de forma suficiente e que não possui sequência sinalizadora necessária para o transporte dessa enzima para o espaço periplasmático (mecanismo presente em *S. cerevisiae*) ou para o

⁹ Promotor cuja indução é dependente do pH do meio de cultivo e da adição de peptona.

meio extracelular (mecanismo típico de secreção de enzimas, i.e. lipases, proteases etc., em *Y. lipolytica*).

Carlson; Osmond e Botstein (1981) desenvolveram mutantes de *S. cerevisiae* incapazes de assimilar sacarose. Esse estudo tinha como objetivo avaliar os mecanismos envolvidos na expressão da enzima invertase, sendo identificado o locus *SNF1* (**S**acarose **N**on **F**ermenting) como responsável por conferir a inabilidade aos mutantes em assimilar sacarose para fermentação. Os mutantes desenvolvidos eram capazes de produzir, constitutivamente, a invertase não-glicosilada, geralmente encontrada no citoplasma (e portanto dependente do transporte ativo de sacarose para o interior da célula). No entanto, eram incapazes de produzir a forma glicosilada da invertase, passível de repressão por altas concentrações de glicose, secretada para a o periplasma, cuja função metabólica é mais expressiva uma vez que realiza a hidrólise da sacarose extracelular. Esse achado sugere que este locus (*SNF1*) é responsável por regular a expressão da invertase, por meio de mecanismo que envolve a capacidade da célula em identificar concentrações de glicose.

Estudos mais aprofundados sobre o assunto identificaram outros loci responsáveis pela regulação do gene *SUC2* via repressão por glicose, nomeados *SNF2*, *SNF3*, *SNF4*, *SNF5* e *SNF6* (NEIGEBOERN; CARLSON, 1984).

Como já mencionado, *Snf3p* pertence a uma classe de transportadores não usuais de glicose (vide **item 3.4.1**), uma vez que os principais compreendem os do tipo *Hxtp* (*Snf3p* apresenta certas similaridades estruturais com os do grupo *Hxtp*).

Mais recentemente, foi comprovada a atuação principal da proteína *Snf3p* como sinalizador para a transcrição dos genes que codificam os transportadores de alta afinidade *HXT2*, *HXT3* e *HXT4*, atuando, essencialmente, como sensor extracelular biológico para glicose (ROLLAND; WINDERICKX; THEVELEIN, 2002).

A ferramenta BLAST[®] foi utilizada novamente para tentar identificar os genes *SNF1* e *SNF3* em *Y. lipolytica*, sendo encontrada baixíssima identidade. Para *SNF1*, com uma sequência de 1902 nucleotídeos, foi encontrada uma sequência, equivalente à 35% da original, com 75% de identidade. Para *SNF3*, com uma sequência de 2655 nucleotídeos, foi encontrada uma sequência, equivalente à 3% da original, com 72% de identidade.

Como já reportado por Does e Bisson (1989), os transportadores de glicose em *Y. lipolytica*, aparentemente, são insensíveis à concentração de glicose,

prevalecendo o transportador de alta afinidade. Isso significa que os transportadores de glicose são expressos constitutivamente, independente da concentração de glicose, não sendo passíveis de mecanismo de regulação gênica via repressão ou indução por glicose, evidenciando ausência de mecanismo regulatório a nível genético para esta fonte de carbono.

A partir de todos esses resultados, pode-se levantar a hipótese de que a incapacidade de assimilar sacarose por *Y. lipolytica* deve-se à ausência dos mecanismos de indução da expressão do gene *SUC2* nativo, possivelmente mediados pela presença de glicose, para secreção adequada de invertase. Isso explicaria o fraco crescimento apresentado, uma vez que a invertase expressa constitutivamente no citoplasma (cuja expressão independe da presença de glicose), poderia ser responsável pela hidrólise da sacarose transportada via difusão facilitada para o interior das células. Possivelmente, o fato de *Y. lipolytica* ter se especializado na assimilação de outros substratos (i.e. lipídeos, proteínas etc.), acarretou na perda da capacidade de assimilar sacarose.

Um raciocínio semelhante pode ser aplicado à *S. cerevisiae*, ou seja, esta levedura especializou-se na assimilação de açúcares (em detrimento da assimilação de outras fontes de carbono) para o estabelecimento de vantagem competitiva perante outros microrganismos em seu habitat. É notório neste microrganismo o complexo mecanismo regulatório envolvido na expressão dos diferentes tipos de transportadores de glicose, na expressão e transporte de invertase para o periplasma, no efeito *Crabtree* que acarreta no favorecimento da fermentação em detrimento da respiração (assimilação mais rápida do substrato e geração de etanol para criação de meio desfavorável ao desenvolvimento de outros microrganismos), osmotolerância para desenvolvimento em meios com alta concentração de açúcares etc. No entanto, *S. cerevisiae* não é capaz de assimilar n-alcanos, proteínas e outras fontes de carbono assimiláveis por *Y. lipolytica*.

É interessante notar ainda que com o sequenciamento do genoma de *Y. lipolytica*, as informações obtidas permitiram entender melhor o processo evolutivo das diferentes espécies de levedura. Casaregola; Neuvéglise e Lépine (2000) concluíram que *Y. lipolytica* encontra-se filogeneticamente mais próxima dos eucariotos superiores, indicando uma clara divergência evolutiva com as outras espécies de leveduras cujos genomas já foram sequenciados.

5.1.2.4 Xilose

Somente a linhagem IMUFRJ 50682 apresentou fraco crescimento em xilose (vide **tabelas 7 e 8**, resultados de nº de controle 10 e 11). Empregou-se novamente a ferramenta BLAST® na tentativa de identificar em *Y. lipolytica* os genes responsáveis por codificar as enzimas responsáveis pelo metabolismo de xilose, i.e. xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH), usando-se as sequencias de *Scheffersomyces stipitis* como entradas de busca (vide **item 3.4.4.1**).

O gene *XYL1* (codifica a enzima XR) possui sequência de 2052 nucleotídeos, para os quais foi identificada em *Y. lipolytica* uma sequência equivalente a 13% da original com 71% de identidade. Para o gene *XYL2* (codifica a enzima XDH) que possui sequência de 1963 nucleotídeos, foram identificadas quatro sequências equivalentes em tamanho a 5% da original, com 89% de identidade.

O resultado indica uma baixíssima identidade com os genes que codificam XR e XDH em *S. stipitis*, ou seja, que não há homólogos para estes genes em *Y. lipolytica* (o que significa dizer que, se houver genes que codificam estas enzimas em *Y. lipolytica*, os mesmos não são filogeneticamente relacionados aos da levedura *S. stipitis*), corroborando a informação de que a espécie *Y. lipolytica* é incapaz de assimilar xilose, dada a incapacidade de expressar as enzimas necessárias ao estabelecimento da via catabólica desta fonte de carbono.

Atualmente, com as informações disponíveis para a linhagem *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682, não é possível criar uma hipótese plausível para o fraco crescimento apresentado em xilose, já que este crescimento não era esperado.

De maneira geral, os resultados obtidos neste trabalho para as fontes de carbono sacarose e xilose, assim como para o meio de cultura contendo glicose, mas sem os elementos traço, indicam que estes experimentos de diluição seriada em placa devem ser sempre analisados com cautela. Apesar do cuidado tomado ao eliminar a etapa de pré-cultivo em meio complexo YPD (o que acarretaria num arraste de componentes desta etapa para a etapa seguinte do experimento), fica-se com a impressão de que falsos positivos podem ser obtidos, ou seja, observa-se crescimento, ainda que fraco, em situações nas quais não deveria haver crescimento do microrganismo. Conforme mencionado acima, fazemos a hipótese

de que isto pode ser causado pela existência de uma reserva de vários destes componentes no interior das células. Como o crescimento em placa é limitado por questões de acesso das células aos nutrientes (pois elas estão imobilizadas no meio solidificado), uma limitação nutricional por estes componentes do meio (sacarose, xilose ou elementos traço) pode eventualmente não ocorrer da mesma forma com que ocorreria num meio de cultura líquido, no qual, através da agitação, as células microbianas são colocadas em contato com todos os nutrientes disponíveis no meio de cultura.

5.1.2.5 Citrato

Por se tratar de um intermediário do Ciclo do Ácido Cítrico (CAC), era esperado que citrato fosse uma fonte de carbono assimilável por ambas as linhagens. No entanto, conforme pode ser observado nas **tabelas 7 e 8**, nº de controle 12 e 13, somente a linhagem W29 apresentou crescimento nesta fonte de carbono.

Como era esperado, a ausência de tiamina não influenciou no crescimento da linhagem W29, tendo em vista que citrato é um intermediário do CAC, portanto não sendo necessária a ação do complexo multienzimático piruvato desidrogenase (dependente de tiamina) no catabolismo desta fonte de carbono.

Por se tratar de um intermediário do CAC, essencial à respiração celular, levantar a hipótese de que a linhagem IMUFRJ 50682 não expressa as enzimas necessárias ao metabolismo desta fonte de carbono não faria sentido. Além disso, em leveduras oleaginosas, o metabolismo de citrato está intimamente relacionado à biossíntese de lipídeos (vide **item 3.5.7**), uma vez que a enzima ATP-citrato liase só é encontrada em leveduras consideradas oleaginosas e fungos filamentosos, também conhecidos como bolores (EVANS; SCRAGG; RATLEDGE, 1983).

A única hipótese plausível para explicar os resultados diferentes entre as duas linhagens parece residir na incapacidade da linhagem IMUFRJ 50682 em transportar o citrato para o interior das células, o que resultaria na sua inabilidade em utilizar citrato extracelular como fonte de carbono e energia.

5.1.2.6 A relação entre os metabolismos de acetato e etanol

O metabolismo de etanol e acetato estão relacionados entre si (vide **item 3.4.5**) e associados ao Ciclo do Glioxilato (CG) (vide **item 3.4.3** e **figura 23** em Anexo). Acetil-CoA proveniente do metabolismo de etanol e acetato pode ser direcionado, via CG, para a síntese de glicose (gliconeogênese) ou ser prontamente utilizado como fonte de energia, via CAC.

Como já foi descrito, a deleção do gene responsável por codificar a enzima isocitrato liase (*ICL1*) em *Y. lipolytica* gera mutantes incapazes de assimilar etanol, acetato, ácidos carboxílicos e possivelmente glicose (BARTH; SCHEUBER, 1993). Nesse mesmo estudo, as células, quando cultivadas em glicose, e posteriormente inoculadas em meio contendo acetato ou etanol, apresentavam período de adaptação do maquinário enzimático, em especial das enzimas do CG, para metabolizar, efetivamente, as novas fontes de carbono.

Como nos ensaios do presente trabalho os inóculos dos experimentos foram todos preparados em glicose, o fraco crescimento apresentado pelas linhagens em etanol ou acetato pode ser decorrente deste período de adaptação. Pode-se assumir que o período de acompanhamento do crescimento de 48 h não foi suficiente para permitir o pleno desenvolvimento das colônias.

5.1.3 *Tolerância ao estresse salino (halotolerância)*

Como já mencionado, espécies do gênero *Yarrowia* são comumente isoladas de ambientes ricos em lipídeos e proteínas (FICKERS et al., 2005b). No entanto, algumas espécies já foram isoladas de ambientes salinos, em especial biomas marinhos com alta carga de matéria orgânica e/ou poluição.

Y. lipolytica IMUFRJ 50682 foi isolada por Hagler e Mendonça-Hagler (1979) em um estuário na Baía da Guanabara. Espera-se que essa linhagem exiba halotolerância superior à *Y. lipolytica* W29, que, de acordo com informações contidas no site da ATCC¹⁰, foi isolada do solo (outras fontes indicam que foi isolada, originalmente, do sistema fluvial de uma cidade francesa, ou seja, de água doce).

¹⁰ ATCC é uma organização privada norte americana sediada em Manassas, Virginia, EUA. Organiza-se como centro de recursos biológicos e de pesquisa sem carácter lucrativo, cujos objetivos são

O experimento realizado neste trabalho para avaliar a tolerância das linhagens de *Y. lipolytica* ao estresse salino foi adaptado do trabalho desenvolvido por Della-Bianca e Gombert (2013) para avaliação da resposta de diferentes linhagens de *S. cerevisiae* a fatores de estresse comumente encontrados nos processos de produção de etanol (i.e. estresse osmótico, oxidativos, térmico e etanólico).

De acordo com os resultados obtidos (vide **tabela 9**), é possível concluir que a linhagem *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 é de fato mais halotolerante que *Y. lipolytica* W29.

Tabela 9: Resultados das diluições em série para avaliação da resposta ao estresse salino no crescimento das linhagens. Fotografias retiradas após 48 h de incubação a 30 °C. YPD representa o controle positivo do crescimento, no qual não houve adição de NaCl. A concentração de 0,6 M de NaCl representa a salinidade média absoluta dos oceanos.

	W29	IMUFRJ 50682
YPD
YPD + 0,3 M NaCl
YPD + 0,6 M NaCl
YPD + 1,0 M NaCl
YPD + 1,5 M NaCl
YPD + 2,0 M NaCl

Embora ambas as linhagens apresentem crescimento fraco a 1,5 M e ausência de crescimento a partir de 2,0 M, fica evidente a diminuição no formato, coloração e tamanho das colônias da linhagem W29 a partir de 0,3 M, progressivamente, até 1,5 M, condição na qual o crescimento é bastante afetado.

Em contrapartida, a linhagem IMUFRJ 50682 aparenta não ter o crescimento afetado até 0,6 M. A partir de 1,0 M, nota-se uma leve alteração na morfologia das

colônias formadas. Se comparada à W29 na mesma concentração, fica claro que seu crescimento é menos afetado pelo aumento da concentração de NaCl.

Linhagens de *S. cerevisiae* apresentaram redução no tamanho das colônias formadas a partir de 0,5 M de NaCl. Outras linhagens apresentaram crescimento completamente inibido a partir de 1,0 M, comprovando que *S. cerevisiae* apresenta menor halotolerância se comparada à *Y. lipolytica* (DELLA-BIANCA; GOMBERT, 2013).

O experimento foi concebido de forma a cobrir uma ampla faixa de salinidade, de modo que 0,6 M de NaCl (equivalente a aproximadamente 3,5% p/v ou 35 g.l⁻¹) representa a salinidade absoluta média dos oceanos (PAWLOWICZ, 2013). Em estudo abrangente sobre a diversidade de leveduras em ambientes hipersalinos, Butinar et al. (2005) foram capazes de isolar uma linhagem de *Y. lipolytica* nas Salinas de Eilat, no Mar Morto, cujas piscinas de evaporação podem atingir valores de salinidade de 25% (250 g.l⁻¹ de NaCl).

Até o momento, o mecanismo comumente aceito como resposta ao estresse osmótico em microrganismos é a produção e acúmulo intracelular de moléculas de baixo peso molecular que atuam como solutos compatíveis à manutenção do maquinário celular. Em leveduras, glicerol é a principal molécula produzida, transportada e acumulada para efeito de proteção celular contra estresse osmótico, sendo sua produção proporcional ao estresse ao qual as células são submetidas durante o crescimento (LAGES; SILVA-GRAÇA; LUCAS, 1999). *S. cerevisiae* quando submetidas somente a estresse salino, observa-se que o valor máximo tolerável é de 2,5 M de NaCl, ponto esse em que o crescimento é bastante prejudicado pelo desvio de carbono para formação de glicerol, como forma de proteção celular (BLOMBERG, 1997).

Analisando a relação entre o transporte de glicerol e o efeito da halotolerância em leveduras, Lages; Silva-Graça e Lucas (1999) observaram que leveduras tolerantes a concentrações de 1 e 2 M de NaCl apresentam evidências de presença de mecanismo de transporte ativo de glicerol (Na⁺/glicerol e H⁺/glicerol simporte). Como conclusão, o mesmo estudo sugere ainda que os mecanismos de transporte ativo de glicerol estão associados à halotolerância exibida pelas leveduras estudadas, uma vez que permitem manter uma concentração intracelular

favorável de glicerol em condições adversas, bem como utilizá-lo como fonte de carbono e energia.

É interessante notar que, mesmo não sendo considerada um organismo extremófilo, linhagens de *Y. lipolytica*, como já mencionado, foram isoladas de ambientes hipersalinos, e sua capacidade em assimilar ácidos graxos pode representar uma vantagem evolutiva para desenvolver-se nesses biótopos¹¹, uma vez que do metabolismo de gorduras tem-se a formação de glicerol como subproduto.

Os resultados obtidos levantam a hipótese de que a halotolerância exibida por *Y. lipolytica* está relacionada a sua distinta capacidade de assimilar ácidos graxos. Linhagens de *Y. lipolytica* que exibem alta tolerância ao estresse salino, possivelmente surgiram através de processo de seleção natural de indivíduos da espécie portadores de características que favorecessem a assimilação e o metabolismo de glicerol.

5.2 Ensaios quantitativos em meio líquido

5.2.1 Considerações preliminares sobre o cultivo de *Y. lipolytica* em meio líquido

Por se tratar do primeiro trabalho no Grupo de Engenharia de Bioprocessos (GEnBio) envolvendo *Y. lipolytica*, uma das atividades mais importantes deste projeto consistiu na adaptação das metodologias de cultivo anteriormente estabelecidas no laboratório para *S. cerevisiae* para a nova levedura.

Como descrito na introdução do trabalho intitulado “O crescimento de culturas de bactérias” por Jacques Monod:

O estudo do crescimento de culturas de bactérias não se configura como uma disciplina especializada ou um ramo de pesquisa: trata-se do método básico da Microbiologia. Seria uma empreitada tola e condenada ao fiasco a tentativa de revisar brevemente tal “disciplina” que atualmente cobre todo nosso estudo. A não ser, é claro, que consideremos somente as leis formais do crescimento, cuja aplicabilidade tem se mostrado, repetidamente, estéril. Na presente revisão, iremos considerar o crescimento bacteriano como uma forma de estudo da fisiologia e bioquímica de bactérias (MONOD, 1949).

¹¹ Equivale à menor parcela de um habitat, discernível geograficamente.

Desse estudo, tido como um dos mais importantes na microbiologia, muitas informações mostraram-se ainda valiosas e atuais por estabelecer os critérios científicos mais básicos e fundamentais no cultivo de microrganismos, os quais muitas vezes são negligenciados, para obtenção de parâmetros fisiológicos associados ao crescimento.

Como via de regra, os seguintes critérios foram seguidos na implementação das metodologias de cultivo de *Y. lipolytica*:

- Garantir meio de cultivo plenamente agitado e homogeneizado, em equilíbrio com a fase gasosa;
- Garantir que o meio de cultivo permaneça com suas propriedades minimamente alteradas ao longo dos cultivos;
- Realizar os experimentos nas menores concentrações celulares possíveis (o que depende basicamente de limitações relacionadas à metodologia analítica de medida da concentração celular);
- Estabelecer um único fator que será limitante do crescimento, a partir do instante em que as células saem da fase exponencial de crescimento (a limitação deste fator deve também ser a única causa para que as células saiam da fase exponencial). No caso deste trabalho, este fator foi sempre a fonte de carbono;
- Acompanhar a eventual formação de metabólitos e, se possível, eliminar ou limitar a sua formação;
- Realizar os cultivos em meio capaz de manter o pH o mais constante possível, eliminando assim possíveis alterações no equilíbrio iônico celular que podem ocorrer pela variação do pH.

Realizar cultivos em meio definido para determinação dos parâmetros cinéticos e fisiológicos permitiram que os critérios citados acima fossem cumpridos, uma vez que conhecer exatamente a composição do meio empregado possibilita realizar alterações sempre que necessárias, além de simplificar o acompanhamento da formação de metabólitos ao longo dos cultivos.

5.2.2 Teste de diferentes meios de cultivo

Diferentes meios de cultivo foram testados inicialmente. A princípio, não encontramos na literatura a descrição de um meio definido formulado especificamente para o cultivo de *Y. lipolytica*. Assim, o primeiro meio definido testado foi aquele formulado para o cultivo de *S. cerevisiae* e descrito por Verduyn et al. (1992) para análises fisiológicas e metabólicas em quimiostato. Testou-se também o meio descrito por Papanikolaou et al. (2002) para o cultivo de *Y. lipolytica* visando a produção de ácido cítrico a partir de glicerol. Cabe ressaltar que o meio prevê a adição de extrato de levedura como promotor de crescimento, tornando-o assim um meio complexo. Nicaud et al. (2002) descrevem um meio definido, formulado especialmente para linhagens produtoras de proteínas heterólogas. Na composição deste meio, aparecem altas concentrações de vitaminas e de elementos traço. Cultivos nos meios tradicionalmente utilizados para o cultivo de leveduras em laboratório, como o YPD e o YNB (vide **itens 3.6.1, 4.3.1 e 3.6.2**), também foram realizados.

A avaliação dos meios de cultivo baseou-se nas velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) apresentadas por *Y. lipolytica* W29, com glicose como única fonte de carbono. Os meios que suportaram crescimento desta levedura com os maiores valores de $\mu_{\text{máx}}$ foram os complexos (YPD e o descrito por Papanikolaou et al. (2002)). Em meio YPD foi possível obter $\mu_{\text{máx}}$ de $0,49 \text{ h}^{-1}$ para a linhagem W29 e $0,51 \text{ h}^{-1}$ para IMUFRJ 50682¹². Nos outros meios testados foram obtidos valores de $\mu_{\text{máx}}$ entre $0,33$ e $0,25 \text{ h}^{-1}$ (para detalhes sobre os ensaios realizados vide **tabela 13** no Apêndice). O meio que levou ao crescimento da levedura com o menor valor de $\mu_{\text{máx}}$, dentre os meios estudados neste trabalho, foi aquele descrito por Nicaud et al. (2002), indicando que concentrações mais altas de vitaminas e elementos traço não são fatores que contribuem para um aumento na velocidade específica de crescimento. Sabe-se que esse meio foi formulado especialmente para linhagens produtoras de proteínas heterólogas. É possível que,

¹² As cinéticas quando realizadas em meio YPD formavam muita espuma, devido a agitação em frascos com deflectores, o que acabava por interferir na transferência eficiente de oxigênio para o meio líquido (vide **item 5.2.3.3**). No entanto, os resultados são apresentados para fim de comparação.

nessas condições específicas, a adição de maiores quantidades de vitaminas e elementos traço seja intencional e necessária.

5.2.3 *Seleção do meio de cultivo definido e estabelecimento da metodologias de cultivo*

Durante a etapa de teste dos diferentes meios de cultivo, foi possível adaptar as metodologias de cultivo pré-estabelecidas no laboratório para *S. cerevisiae*, ao cultivo de *Y. lipolytica*. Nesta fase, a metodologia de preparo do inóculo foi estabelecida, a concentração inicial da fonte de carbono foi definida e alguns testes com antiespumantes foram realizados.

5.2.3.1 Meio de cultivo definido para o cultivo de *Y. lipolytica* em frasco agitado

Conforme mencionado acima, não foi encontrado inicialmente na literatura científica uma composição de meio de cultivo totalmente definido para a levedura *Y. lipolytica*. Mais tarde, encontramos tal meio no trabalho de Barth e Gaillardin (1996), que se trata de uma publicação do tipo livro, mais dificilmente acessível, se comparada às publicações do tipo artigos em revistas científicas. Os autores o descrevem como meio mínimo com tiamina (*Minimal Medium with Thiamine*). Sua composição é extremamente básica, contendo alguns sais inorgânicos, uma fonte de nitrogênio, tiamina e elementos traço (vide **item 4.3.2**).

Além disso, os autores fazem considerações gerais sobre as concentrações toleráveis das fontes de carbono usualmente assimiláveis pela levedura e o pH ideal do meio de cultivo, para cada tipo de substrato. Por exemplo, recomenda 6,7 g.l⁻¹ de YNB, 10-20 g.l⁻¹ de glicose (até concentração de 100 g.l⁻¹), 4 g.l⁻¹ de acetato (indica que acima de 10 g.l⁻¹ é tóxico às células) e até 3% de etanol. Ácidos graxos, gorduras, e n-alcanos não apresentam valores de concentrações tóxicas. Indica que para a maioria dos cultivos, o pH igual a 6 é o ideal. No entanto, quando utilizado acetato ou ácidos graxos como fonte de carbono, o pH deve ser ajustado para 4 ou fortemente tamponado com fosfato a 6.

Os primeiros cultivos realizados com este meio de cultivo continham 20 g.l⁻¹ iniciais de glicose ou glicerol, pois era este o valor usualmente empregado no grupo

de pesquisa para os cultivos com *S. cerevisiae*. No entanto, como *Y. lipolytica* é estritamente aeróbia, a velocidade específica de consumo de substrato é muito inferior àquela exibida por *S. cerevisiae*, a qual, por ser uma levedura *Crabtree*-positiva, quando exposta a açúcares, usa o metabolismo fermentativo mesmo na presença de oxigênio, o que resulta em maiores velocidades específicas de consumo da fonte de carbono, se comparadas a uma situação de metabolismo respiratório.

Portanto, com esta quantidade inicial de fonte de carbono, os cultivos ficavam muito longos (mais de 24 h) e a formação de metabólitos e a acidificação excessiva do meio faziam com que as células saíssem da fase de crescimento exponencial antes do consumo de toda a fonte de carbono. Ou seja, a limitação pela fonte de carbono não era o fator que determinava a saída das células da fase exponencial de crescimento.

A acidificação do meio ocorre principalmente quando a fonte de nitrogênio utilizada é um sal de amônio. A levedura exporta cátions H^+ para o meio extracelular, via $[H^+]ATPase$, visando criar um potencial na membrana celular que favoreça o transporte de moléculas de amônio para dentro da célula (PEÑA; PARDO; RAMÍREZ, 1987).

Uma cinética de crescimento típica, em meio contendo $2,5\text{ g.l}^{-1}$ iniciais de glicose e $3,0\text{ g.l}^{-1}$ iniciais de sulfato de amônio, é apresentada na **figura 8**. Nesse caso específico, o pH chega a um patamar mínimo de 3,0. No entanto, foi observado que cultivos em frasco podem atingir pH de 2 quando a concentração inicial de fonte de carbono é maior que $2,5\text{ g.l}^{-1}$, ponto este no qual o crescimento parece começar a ser prejudicado.

Fica clara a relação (inversa) entre a variação do pH e o crescimento celular, ao longo do tempo, durante os cultivos com amônio como fonte de nitrogênio. Desta forma, o simples acompanhamento do pH nestes cultivos serve para indicar quando as células param de crescer.

Figura 8: Cinética de crescimento para as linhagens *Y. lipolytica* W29 e IMUFRJ 50682 em MDB contendo sulfato de amônio como fonte de nitrogênio e glicose como fonte de carbono. Para fins ilustrativos, são apresentados somente os dados de uma das duas repetições realizadas.

Com o objetivo de evitar a acidificação excessiva durante os cultivos, o meio definido originalmente proposto (MDB) foi modificado, substituindo-se a fonte de nitrogênio, sulfato de amônio, por ureia, obtendo-se o MDBU (Meio Definido Barth com Ureia) (vide item 4.3.3). Em *S. cerevisiae*, o transporte de ureia ocorre via difusão simples e facilitada (COOPER; SUMRADA, 1975). Ao entrar na célula, ureia é convertida a duas moléculas de amônia e monóxido de carbono. Amônia (forma aquosa da amônia) é então convertida a glutamina e/ou glutamato, cuja função é atuar como principais doadores de nitrogênio no maquinário biossintético celular (SCHURE; RIEL; VERRIPS, 2000).

5.2.3.2 Preparação do inóculo

Os cultivos com *S. cerevisiae* usualmente realizados no nosso grupo de pesquisa seguem a seguinte metodologia de preparação de inóculo: partindo-se do

estoque congelado a -80°C , colônias são isoladas em placa YPD, para então uma colônia ser utilizada na inoculação do meio definido, que é incubado *overnight*. Esta metodologia tem como objetivo selecionar um único *pool* genético, uma vez que uma colônia é originada de uma única célula.

Esta metodologia, quando aplicada à *Y. lipolytica*, resultava em inóculos que precisavam ser incubados por mais de 48 h para obtenção de células para inoculação, isto quando ocorria crescimento. Houve então a tentativa de fazer os inóculos em meio YPD (em vez de fazê-los em meio definido, conforme acima), uma vez que este meio proporciona a formação de uma quantidade de células adequada para inoculação, num período de incubação de somente 8 a 12 h (*overnight*).

No entanto, observavam-se variações nos parâmetros cinéticos obtidos para os cultivos cujos inóculos haviam sido realizados em YPD (ou seja, havia baixa reprodutibilidade entre ensaios nas mesmas condições). Analisando visualmente as suspensões de células obtidas em meio YPD e MDB, é possível notar a diferença na coloração da massa celular (*pellet*) obtida, conforme ilustrado na **figura 9**, mesmo após etapa de ressuspensão em água (lavagem). A coloração do *pellet* de células cultivadas em meio YPD é muito semelhante à coloração do meio YPD e a coloração do *pellet* do MDB é branco-bege, semelhante à coloração das colônias obtidas nos meios solidificados (YPDS e MDBS).

Assumiu-se então a hipótese de que as células de *Y. lipolytica*, dada a sua afinidade e especialização na assimilação de substratos hidrofóbicos, carregavam consigo, na sua parede celular (ou internamente), alguns dos componentes constituintes do meio complexo (YPD), influenciando, positivamente, o crescimento na etapa posterior em meio definido, visto que foi comprovado em ensaios anteriores que adição de extrato de levedura é forte promotor do crescimento celular. A adição não controlada de elementos complexos através do inóculo pode ser uma explicação para a baixa reprodutibilidade experimental inicialmente observada.

Essa hipótese foi corroborada ao buscar referências na literatura sobre a utilização de substratos hidrofóbicos por *Y. lipolytica*. Fickers et al. (2005b) descrevem duas hipóteses para a interação entre o substrato hidrofóbico (SH) e a parede celular da levedura, etapa tida como crucial para o transporte do SH do meio líquido para o interior da célula. A primeira hipótese faz referência à solubilização (ou pseudo-solubilização) na presença de compostos ativos de superfície ou seja, um

transporte mediado por um surfactante (sabe-se que a *Y. lipolytica* é capaz de produzir um tipo de surfactante, *Yansan*, cuja produção é induzida pela presença de SH). A segunda hipótese diz respeito a uma interação direta entre a superfície celular e o SH, mediado por micro protrusões que conectariam a superfície ao interior celular, alterando de forma significativa a polaridade da superfície da célula e portanto, sua afinidade por diferentes substratos.

Os referidos autores fazem referência ainda que estes mecanismos, de um ponto de vista biotecnológico, podem ser menos significativos que a interação interfacial de superfície entre SH e o meio aquoso (hidrofobicidade). No entanto, citam evidências de que as propriedades de superfície celular podem ter um impacto na emulsificação desses substratos.

Em testes realizados em meio definido (MDB) contendo ácido hexanóico, não descritos nesse estudo, ficava claro que a adição de ácido hexanóico formava duas fases no meio de cultivo. No entanto, após a inoculação com células de *Y. lipolytica*, era evidente a mudança de coloração do meio (turbamento), evidenciando alguma forma de emulsificação somente com a adição das células do inóculo.

Figura 9: Diferença na coloração dos *pellets* de células obtidos do cultivo da linhagem *Y. lipolytica* W29 em meio complexo YPD (esquerda) e meio definido (direita), ambas após sucessivas ressuspensões em água destilada (lavagem), sugerindo que células de *Y. lipolytica* são capazes de aderir alguns componentes complexos do meio YPD.

Nesses ensaios iniciais (vide **figura 17** no Apêndice para mais detalhes), foi possível observar crescimento significativo da *Y. lipolytica* W29 e IMUFRJ 50682 em sacarose. No entanto, como nessa etapa os inóculos eram preparados em YPD, o

crescimento observado pode ser atribuído às fontes de carbono aderidas na superfície das células, provenientes do inóculo. É possível observar também que ambas as linhagens de *Y. lipolytica* são capazes de crescer em meio YPD, ou seja, sem a fonte de carbono glicose, indicando sua capacidade de assimilar lipídeos e proteínas como forma eficiente de obtenção de carbono e energia.

Por esse motivo, a metodologia descrita no **item 4.6** detalha a preparação do pré-inóculo, em YPD e do inóculo propriamente dito, em meio definido, ou seja, foi incluída uma etapa adicional de crescimento entre o estoque de células e o cultivo usado para acompanhamento da cinética de crescimento. Dadas as características do meio YPD, a etapa de pré-inóculo pode ser entendida como “despertar” das células do congelamento.

De fato, o crescimento observado em meio YPD foi aquele que ocorreu com maior valor de $\mu_{\text{máx}}$, dentre todos os meios testados neste trabalho. Nesta situação, a morfologia das células é leveduriforme, com aspecto saudável, conforme ilustrado na **figura 10**.

Figura 10: Imagens obtidas com lente objetiva de imersão em óleo de 100x. À esquerda, células da linhagem IMUFRJ 50682 e, à direita, células da linhagem W29, todas cultivadas em meio YPD por 12 h.

As características morfológicas observadas para as células cultivadas em YPD são indicativas de desenvolvimento adequado, e que podem ser observadas nitidamente na **figura 10**: formato leveduriforme (prevalência da forma unicelular), presença de divisão celular (brotamento), ausência de agrupamento celular (floculação) e ausência de transição morfológica para formação de hifas.

Por apresentar dimorfismo celular (levedura e hifas), fatores de estresse (e.g. estresse oxidativo e térmico), pode desencadear em *Y. lipolytica* processo de

transição do estado morfológico leveduriforme para o filamentoso (KAWASSE et al., 2003). Ruiz-Herrera e Sentandreu (2002) identificaram que fatores como exaustão da fonte de carbono, o tipos de fonte de nitrogênio disponível nos cultivos e o pH são fatores que também influenciam na formação de micélios (hifas) em *Y. lipolytica*. É interessante ressaltar que nesse mesmo estudo, os autores observaram que para a linhagem *Y. lipolytica* W29, cultivos com pH neutro favoreciam mais a formação de hifas em contrapartida a cultivos realizados em pH ácido (valores de pH de 3 e 4). No entanto, os exatos mecanismos envolvidos na transição morfológica em leveduras ainda não é bem compreendido, dado os diferentes fatores observados como desencadeadores deste processo para as espécies consideradas dimórficas.

Na **figura 11** é possível observar nitidamente a transição morfológica entre as células no formato leveduriforme para a formação de pseudo-hifas e hifas.

Figura 11: Imagens obtidas com lente objetiva de imersão em óleo de 100x. À esquerda, células da linhagem W29 cultivadas em meio MDBU com glicose e à direita em glicerol. A primeira etapa do cultivo foi realizado em MDBU com 20 g.l⁻¹ de glicose, para obtenção de células, que foram centrifugadas e ressuspensas em MDBU com 20 g.l⁻¹ glicose ou glicerol sem adição de tiamina para incubação por 72 h.

5.2.3.3 Formação de espuma e adição de antiespumante

Nos cultivos realizados em MDB com 20 g.l⁻¹ iniciais de fonte de carbono, além da diminuição excessiva do pH, como já descrito, havia formação excessiva de espuma, uma vez que era necessário manter agitação vigorosa, de forma a garantir transferência adequada de oxigênio para o meio líquido. No entanto, o acúmulo de espuma na superfície, acabava por acarretava na interferência deste processo (vide **figura 12**).

Figura 12: Formação de espuma em cultivo de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 em MDBU com 20 g.l⁻¹ iniciais de glicose sem adição de antiespumante. Foto retirada após 24 h de incubação em *shaker* rotativo a 28 °C e 200 rpm.

A adição de diferentes concentrações de antiespumante (*Antifoam-C*, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) mostrou-se eficaz em prevenir a formação de espuma, sem interferência negativa no crescimento. Testes foram realizados nas concentrações recomendadas pelo próprio fabricante, bem como em concentrações superiores (vide **tabela 13** no Apêndice para informações relativas aos cultivos com antiespumante).

No entanto, nos cultivos que passaram a ser realizados com 2,5 g.l⁻¹ iniciais de fonte de carbono, ficou claro que a formação de espuma não era tão pronunciada, a ponto de interferir na transferência de oxigênio. Portanto, para estes ensaios, optou-se por não utilizar mais antiespumante.

A diminuição da concentração inicial da fonte de carbono, na realidade, solucionou, de uma única vez, os vários problemas enfrentados nos cultivos de *Y. lipolytica*, a citar a queda excessiva do pH, a formação excessiva de espuma e, eventualmente, a limitação na transferência de oxigênio.

Diferentes velocidades de rotação do incubador foram testadas para os cultivos em meio MDBU. Inicialmente, procurando garantir o máximo de agitação possível, os cultivos eram realizados a 250-300 rpm. Nesta situação, a formação de espuma e a agitação excessivas faziam com que células ficassem “grudadas” ao longo da superfície interior dos frascos. Com a redução da concentração inicial da fonte de carbono, observou-se que a agitação de 200 rpm era mais do que suficiente

para garantir uma agitação vigorosa e uniforme, sem a produção em excesso de espumas e “respingos” no interior do frasco.

Cabe ressaltar aqui a opção por realizar as cinéticas em volume de meio de no máximo 100 ml, bem como o uso de frascos com deflectores, visando aumentar a transferência de oxigênio para a fase líquida.

5.2.4 Cinética de crescimento em glicose e glicerol

Após todas as etapas de adaptação e revisão das metodologias experimentais, foi possível realizar cultivos em MDBU para as fontes de carbono glicose e glicerol, ambas na concentração inicial de $2,5 \text{ g.l}^{-1}$. Ao trabalhar com esta concentração, os cultivos não ultrapassavam 12 h, sendo possível realizar amostragens a cada uma (1) hora. O pH inicial, sempre em torno de 6, permanecia constante até o final dos cultivos.

Com os dados dos cultivos, foi possível calcular os parâmetros cinéticos e fisiológicos (vide **tabela 10**) relacionados às fontes de carbono glicose e glicerol. Além disso, foi possível construir os perfis de consumo de substrato e formação de biomassa (vide **figuras 13 e 15**).

Ao final de cada cultivo, uma amostra era sempre retirada para análise das células por microscopia (vide **figuras 14 e 16**), de forma a avaliar a morfologia das células, bem como garantir que não houvesse ocorrido qualquer tipo de contaminação.

Figura 13: Perfis de consumo de glicose [W29 ($\blacktriangle$) e IMUFRJ 50682 ($\blacktriangledown$)] e geração de biomassa [W29 ($\bullet$) e IMUFRJ 50682 ($\blacksquare$)] proveniente dos cultivos em frasco agitado a 200 rpm e 28 °C, realizados em MDBU até a exaustão da fonte de carbono glicose. Amostras foram retiradas a cada hora para quantificação da concentração celular e de substrato (vide Item 4.9). Os dados obtidos neste cultivo foram utilizados na determinação dos parâmetros $\mu_{\max}$ e $Y_{X/S}^{exp}$ (vide figuras 19 e 20 no Apêndice). Para fins ilustrativos, são apresentados somente os dados de uma das três repetições realizadas. Para os dados utilizados na obtenção das curvas, vide tabela 11.

Figura 14: Imagens obtidas com objetiva de imersão em óleo de 100x. À esquerda, células da linhagem W29 e à direita IMUFRJ 50682 cultivadas em MDBU com glicose. Fotos retiradas ao final do cultivo, após 12 h da inoculação (referentes aos dados apresentados na figura 13).

Figura 15: Perfis de consumo de glicerol [W29 ($\blacktriangle$) e IMUFRJ 50682 ($\blacktriangledown$)] e geração de biomassa [W29 ($\bullet$) e IMUFRJ 50682 ($\blacksquare$)] proveniente dos cultivos em frasco agitado a 200 rpm e 28 °C, realizados em MDBU até a exaustão da fonte de carbono glicerol. Amostras foram retiradas a cada hora para quantificação da concentração celular e de substrato (vide Item 4.9). Os dados obtidos neste cultivo foram utilizados na determinação dos parâmetros $\mu_{\max}$ e $Y_{X/S}^{exp}$ (vide figuras 21 e 22 no Apêndice). Para fins ilustrativos, são apresentados somente os dados de uma das três repetições realizadas. Para os dados utilizados na obtenção das curvas, vide tabela 12.

Figura 16: Imagens obtidas com objetiva de imersão em óleo de 100x. À esquerda, células da linhagem W29 e à direita IMUFRJ 50682 cultivadas em MDBU com glicerol. Fotos retiradas ao final do cultivo, após 10 h da inoculação (referentes aos dados apresentados na figura 15).

É interessante notar que os valores obtidos de velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) durante os cultivos com glicerol são maiores, para ambas as linhagens, se comparados aos valores obtidos em glicose. No entanto, as velocidades específicas máximas de consumo (r_S^{max}) de glicerol aparentemente são inferiores àsquelas obtidas para glicose (vide **tabela 10**).

Comparando-se os $\mu_{\text{máx}}$ obtidos em glicose, é possível observar que o valor obtido para IMUFRJ 50682 é 30% maior daquele obtido para W29, enquanto em glicerol, o valor de $\mu_{\text{máx}}$ é 27%. De modo geral, IMUFRJ 50682 apresenta velocidades específicas máximas de crescimento cerca de 30% superiores para ambas as fontes de carbono analisadas.

Tabela 10: Parâmetros cinéticos e fisiológicos para os cultivos realizados em MDBU para as fontes de carbono glicose e glicerol. Os dados apresentados são equivalentes às médias obtidas para as triplicatas, juntamente com o erro associado (SEM).

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

A mesma relação é observada para as velocidades específicas máximas de consumo de substrato (r_S^{max}). IMUFRJ 50682 apresenta r_S^{max} de glicose 45% maior daquele calculado para W29, enquanto em glicerol, apresenta r_S^{max} 35% maior. No entanto, o rendimento celular de IMUFRJ 50682 é cerca de 10% inferior ao observados pela linhagem W29, tanto em glicose quanto em glicerol.

É curioso notar que a diferença nos valores de $\mu_{\text{máx}}$ para a mesma linhagem, em diferentes fontes de carbono, é praticamente idêntica à diferença observada entre as linhagens para as mesmas fontes de carbono, ou seja, cerca de 30%. Comparando os valores calculados de r_S^{max} para as linhagens em diferentes fontes

de carbono, é possível observar que os valores são próximos (em glicerol os valores são menores), indicando semelhança na capacidade de assimilação de ambas as fontes de carbono.

Resumindo, a linhagem IMUFRJ 50682 apresenta velocidades específicas máximas ($\mu_{\text{máx}}$) superiores às apresentadas pela linhagem W29 (**tabela 10**). Em glicerol, o $\mu_{\text{máx}}$ de $0,46 \text{ h}^{-1}$ apresentado pela linhagem IMUFRJ 50682 aproxima-se do valor observado em meio YPD para as linhagens W29 e IMUFRJ 50682 ($0,49 \text{ h}^{-1}$ e $0,51 \text{ h}^{-1}$, respectivamente).

Os resultados são condizentes com as conclusões obtidas para os testes de tolerância ao estresse salino (halotolerância) em meio solidificado (vide **item 5.1.3**), onde se discorre sobre a relação entre halotolerância em leveduras e o metabolismo de glicerol proposto por Lages; Silva-Graça e Lucas (1999). Além disso, corrobora a hipótese proposta nesse estudo de que em leveduras halotolerantes, a semelhança entre a capacidade de assimilação de glicerol, se comparada a outros açúcares, como por exemplo a glicose, são indicativos da presença de mecanismo de transporte ativo para assimilação do glicerol como forma de proteção celular e como fonte de carbono e energia. E de fato, a linhagem IMUFRJ 50682, mais halotolerante se comparada à W29, apresentasse r_s^{max} e $\mu_{\text{máx}}$ em glicerol superiores à W29.

Estudos similares ao proposto neste trabalho para avaliação da fisiologia quantitativa de *Y. lipolytica* são inexistentes na literatura aberta. Nas referências encontradas, todos os cultivos empregam extrato de levedura como promotor do crescimento celular, tendo em vista a aplicabilidade aos processos industriais. Uma vez que a adição de extrato de levedura torna o meio complexo, a comparação com esses resultados deve ser feita com cautela.

Papanikolaou et al. (2002) em estudo sobre produção de ácido cítrico pela linhagem *Y. lipolytica* LGAM S(7)1 obteve em glicose $\mu_{\text{máx}}$ de $0,25 \text{ h}^{-1}$ e rendimento celular de $0,19 \text{ g g}^{-1}$ em cultivos em frascos agitado, meio tamponado, adicionado de extrato de levedura (promotor de crescimento) a 28°C e 200 rpm. O valor de $\mu_{\text{máx}}$ obtido nesse estudo aproxima-se do calculado para W29. No entanto, possivelmente em função do metabolismo de ácido cítrico, o valor de rendimento celular é bem inferior ao observado para W29. Nesse mesmo estudo, para as mesmas condições e linhagem, os autores descrevem $\mu_{\text{máx}}$ de $0,2 \text{ h}^{-1}$ em glicerol e rendimento celular de

0,24 g g⁻¹, valores esses, novamente, muito inferiores aos observados neste trabalho.

Juszczyk et al. (2013) estudaram a formação de biomassa para 8 diferentes linhagens de *Y. lipolytica* (S5, S6, S9, S10, S11, S12, S17 e S21) cultivadas em biorreator com meio complexo de cultivo e glicerol puro como fonte de carbono, obtendo rendimento celulares de 0,28 a 0,56 g g⁻¹.

Em análise fisiológica e genética de 4 linhagens de *S. cerevisiae*, van Dijken et al. (2000) compilaram informações fisiológicas para o cultivo dessa levedura em frasco agitado a 30 °C com meio YNB (sem adição de aminoácidos). Para as 4 linhagens, CBS8066, BAY.17, X2180 e CEN.PK122, os valores obtidos de $\mu_{\text{máx}}$ foram de 0,44 h⁻¹, 0,42 h⁻¹, 0,34 h⁻¹ e 0,41 h⁻¹, respectivamente, em glicose. Todas as linhagem apresentaram rendimento celular de 0,11 - 0,12 g g⁻¹ em aerobiose e 0,09 - 0,1 g g⁻¹ em anaerobiose, para os cultivos em batelada. No entanto, em quimiostato com taxa de diluição de 0,1 h⁻¹, o valor de rendimento celular em aerobiose obtido foi de 0,50 - 0,51 g g⁻¹ e em anaerobiose, 0,10 - 0,11 g g⁻¹.

Ao final dos cultivos, foi observado que as células da linhagem W29 apresentavam formato alongado, indicando início da transição para formação de pseudo-hifas, possivelmente em decorrência da exaustão da fonte de carbono. No entanto, tem-se anotada a preferência da linhagem W29 em formar hifas quando cultivada em meio com pH próximos ao neutro (neste caso, o pH mantinha-se até o final do cultivo em 6) (RUIZ-HERRERA; SENTANDREU, 2002).

5.2.5 Formação de metabólitos extracelulares

Durante os cultivos, não foi possível identificar formação relevante de metabólitos extracelulares. Como amostras foram retiradas ao longo de todos os cultivos, sempre era notável um pico inicial, referente à fonte de carbono, que desaparecia ao final do cultivo, não sendo possível identificar a formação de outro pico, que poderia indicar a formação de algum metabólito extracelular.

Dado o fato de que a formação de metabólitos extracelulares, i.e. ácido cítrico, isocítrico etc., está associado a cultivos com limitações nutricionais, conclui-se que os cultivos realizados foram capazes de suprir, completamente, os requerimentos nutricionais de ambas as linhagens, para ambas as fontes de carbono

empregadas (i.e. glicose e glicerol) utilizadas na determinação dos parâmetros cinéticos e fisiológicos. Além disto, o fato de o pH ter permanecido constante nos cultivos realizados com ureia como fonte de nitrogênio, é também um forte indicativo de que não ocorreu formação de ácidos orgânicos nestes cultivos.

6 CONCLUSÕES

Dos objetivos traçados inicialmente para este trabalho, foi possível concluir todos com sucesso. As dificuldades iniciais no cultivo de *Yarrowia lipolytica* fizeram com que fosse necessário investigar a fundo na literatura, meios e técnicas de cultivo adequados ao cumprimento das metas propostas. Durante esta etapa exploratória, diferentes metodologias de cultivo implementadas para outras leveduras foram adaptadas com sucesso para serem aplicadas ao cultivo de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682.

Das etapas de cultivo em meio definido solidificado, foi possível determinar que a linhagem IMUFRJ 50682 apresenta fraco ou nenhum crescimento para as fontes de carbono sacarose, xilose, citrato e acetato. Nesta etapa, não foi possível avaliar a capacidade desta levedura em assimilar etanol. No entanto, em ensaios posteriores em meio líquido, ficou claro que a linhagem IMUFRJ 50682 não é capaz de crescer em meio definido contendo etanol (2,5 g.l⁻¹ ou 0,25%) como única fonte de carbono e energia. Ficou claro que para *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682, tiamina é o principal fator de crescimento, indispensável à assimilação adequada das fontes de carbono glicose e glicerol. Com as informações obtidas nessa etapa, foi possível discorrer sobre as possíveis relações entre as características fisiológicas observadas e as informações metabólicas e genômicas disponíveis para a própria espécie *Y. lipolytica*, bem como para outras leveduras.

Nos ensaios de tolerância ao estresse salino, foi possível estabelecer uma possível relação entre halotolerância e o transporte e catabolismo de glicerol para ambas as linhagens de *Y. lipolytica*. E como era esperado, a linhagem IMUFRJ 50682 apresentou maior halotolerância se comparada à W29 e à *S. cerevisiae*, por tratar-se de uma espécie/linhagem isolada de ambiente marinho, apresentando crescimento significativo em meio solidificado complexo com concentração de até 1,0 M de NaCl. No entanto, não é possível caracterizá-la como uma linhagem extremófila, mesmo que já tenham sido relatadas linhagens de *Y. lipolytica* consideradas como tal, indicando a alta capacidade adaptativa da espécie aos diferentes habitats naturais em que são encontradas.

A seleção e adaptação de um meio definido, capaz de suportar crescimento adequado e manter o pH estável em cultivos em frasco agitado com meio líquido,

permitiram determinar os parâmetros fisiológicos para ambas as linhagens, para as fontes de carbono glicose e glicerol, selecionadas da etapa de ensaios em meio solidificado. Os critérios observados na realização dos experimentos desta etapa foram aqueles descritos por Monod (1949) para o estudo do crescimento de bactérias de forma possibilitar o estabelecimento de relações fisiológicas e bioquímicas com os parâmetros obtidos no cultivo de microrganismos.

Nesta etapa, as velocidades específicas máximas obtidas para a linhagem IMUFRJ 50682 foram de $0,35 \text{ h}^{-1}$ em glicose e $0,46 \text{ h}^{-1}$ em glicerol. Para os mesmos ensaios, os fatores de conversão de substrato a células, durante a fase exponencial de crescimento, foram $0,32 \text{ g}$ de massa seca de células/g glicose e $0,48 \text{ g}$ de massa seca de células/g glicerol.

Nos cultivos em meio líquido, realizados a 28°C e 200 rotações por minuto em incubador rotativo, empregando frascos do tipo erlenmeyer com deflectores fechados com algodão e um quinto do volume ocupado com meio líquido e $2,5 \text{ g.l}^{-1}$ iniciais da fonte de carbono, não foi observada a formação de nenhum metabólito extracelular, o que é indicativo de um metabolismo energético puramente respiratório. Nestas condições, usando-se ureia como fonte de nitrogênio, o pH permaneceu estável do início ao final dos cultivos. Observou-se também que a levedura estudada não é capaz de crescer em pH menor que 2,0.

De modo geral, tem-se estabelecidas as metodologias para avaliação da capacidade de assimilação de fontes de carbono e obtenção dos parâmetros fisiológicos para a espécie de levedura oleaginosa, não-convencional *Y. lipolytica*.

Espera-se que os resultados obtidos neste trabalho possam servir como referência para outras linhagens de *Y. lipolytica*, bem como de outras leveduras similares e que as metodologias desenvolvidas possam ser aplicadas nos estudos fisiológicos das linhagens mutantes que estão sendo desenvolvidas neste processo colaborativo de investigação dos potenciais biotecnológicos de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682.

7 BIBLIOGRAFIA

AMARAL, P. F. F. **Produção de lipase de *Yarrowia lipolytica* em biorreator multifásico**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.

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.

BARTH, G.; GAILLARDIN, C. *Yarrowia lipolytica*. In: WOLF, K. (Ed.). **Nonconvention Yeast in Biotechnology: A Handbook**. Berlin: Springer, 1996. p. 313–388.

BARTH, G.; GAILLARDIN, C. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. **FEMS microbiology reviews**, p. 1–19, 1997.

BARTH, G.; SCHEUBER, T. Cloning of the isocitrate lyase gene (ICL1) from *Yarrowia lipolytica* and characterization of the deduced protein. **Molecular & general genetics : MGG**, v. 241, n. 3-4, p. 422–30, nov. 1993.

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

BILLARD, P. et al. Isolation and characterization of the gene encoding xylose reductase from *Kluyveromyces lactis*. **Gene**, v. 162, n. 1, p. 93–7, 30 ago. 1995.

BLOMBERG, A. The osmotic hypersensitivity of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is strain and growth media dependent: quantitative aspects of the phenomenon. **Yeast (Chichester, England)**, v. 13, n. 6, p. 529–39, maio 1997.

BUTINAR, L. et al. Yeast diversity in hypersaline habitats. **FEMS microbiology letters**, v. 244, n. 2, p. 229–34, 15 mar. 2005.

CARLSON, M.; OSMOND, B.; BOTSTEIN, D. Mutants of yeast defective in sucrose utilization. **Genetics**, 1981.

CASAREGOLA, S.; NEUVÉGLISE, C.; LÉPINGLE, A. Genomic Exploration of the Hemiascomycetous Yeasts: 17. *Yarrowia lipolytica*. **FEBS letters**, v. 487, 2000.

CAVALIER-SMITH, T. Protist phylogeny and the high-level classification of Protozoa. **European Journal of Protistology**, v. 39, n. 4, p. 338–348, jan. 2003.

COOPER, T.; SUMRADA, R. Urea transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of bacteriology**, v. 121, n. 2, 1975.

DELLA-BIANCA, B. E.; GOMBERT, A K. Stress tolerance and growth physiology of yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 104, n. 6, p. 1083–95, dez. 2013.

DENIS, C. L.; FERGUSON, J.; YOUNG, E. T. mRNA levels for the fermentative alcohol dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae* decrease upon growth on a nonfermentable carbon source. **The Journal of biological chemistry**, v. 258, n. 2, p. 1165–71, 25 jan. 1983.

DOES, A L.; BISSON, L. F. Comparison of glucose uptake kinetics in different yeasts. **Journal of bacteriology**, v. 171, n. 3, p. 1303–8, mar. 1989.

DUJON, B. et al. Genome evolution in yeasts. **Nature**, v. 430, n. 6995, p. 35–44, 1 jul. 2004.

DUJON, B. Yeast evolutionary genomics. **Nature reviews. Genetics**, v. 11, n. 7, p. 512–24, jul. 2010.

EVANS, C. T.; SCRAGG, A H.; RATLEDGE, C. Regulation of citrate efflux from mitochondria of oleaginous and non-oleaginous yeasts by adenine nucleotides. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 132, n. 3, p. 609–15, maio 1983.

FICKERS, P. et al. Selection of new over-producing derivatives for the improvement of extracellular lipase production by the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*. **Journal of biotechnology**, v. 115, n. 4, p. 379–86, 23 fev. 2005a.

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. 2005b.

FINOGENOVA, T. V et al. Organic Acid Production by the Yeast *Yarrowia lipolytica* : A Review of Prospects. **Text**, v. 41, n. 5, p. 418–425, 2005.

FLORES, C. L. et al. Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. **FEMS microbiology reviews**, v. 24, n. 4, p. 507–29, out. 2000.

FLURY, U.; HEER, B.; FIECHTER, A. REGULATORY AND PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF TWO ISO- ENZYMES OF MALATE DEHYDROGENASE FROM *SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- ...**, v. 341, p. 465–483, 1974.

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. 1409–17, jul. 2007a.

FÖRSTER, A. et al. Overexpression of the ICL1 gene changes the product ratio of citric acid production by *Yarrowia lipolytica*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 77, n. 4, p. 861–9, dez. 2007b.

GANCEDO, C.; GANCEDO, J. M.; SOLS, A. Glycerol metabolism in yeasts: Pathways of utilization and production. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 5, n. 2, p. 165–72, jul. 1968.

GANCEDO, J.; LAGUNAS, R. Contribution of the pentose phosphate pathway to glucose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: a critical analysis on the use of labelled glucose. **Plant Science Letters**, v. 1, p. 193–200, 1973.

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 and environmental microbiology**, v. 41, n. 1, p. 173–8, jan. 1981.

HAGLER, A. N.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. *Candida lipolytica* isolated from guanabara bay and its ability to grow in marine and estuarine conditions. **Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas**, v. 12(4-5), p. 273–277, 1979.

HIRAI, M. et al. Glucose-phosphorylating enzymes of *Candida* yeasts and their regulation in vivo. **Biochimica et biophysica acta**, v. 480, n. 2, p. 357–66, 9 fev. 1977.

HYNES, M. J.; MURRAY, S. L. ATP-citrate lyase is required for production of cytosolic acetyl coenzyme A and development in *Aspergillus nidulans*. **Eukaryotic cell**, v. 9, n. 7, p. 1039–48, jul. 2010.

JUSZCZYK, P. et al. Biomass production by novel strains of *Yarrowia lipolytica* using raw glycerol, derived from biodiesel production. **Bioresource technology**, v. 137, n. 00, p. 124–31, jun. 2013.

KAWASSE, F. M. et al. Morphological analysis of *Yarrowia lipolytica* under stress conditions through image processing. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 25, n. 6, p. 371–5, jul. 2003.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts: A Taxonomic Study**. Fifth ed. Amsterdam: Elsevier, 2011. p. 927–929

LAGES, F.; SILVA-GRAÇA, M.; LUCAS, C. Active glycerol uptake is a mechanism underlying halotolerance in yeasts: a study of 42 species. **Microbiology (Reading, England)**, v. 145 (Pt 9, p. 2577–85, set. 1999.

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 & Biotechnology**, v. 84, n. 4, p. 533–537, abr. 2009.

LORENZ, M.; FINK, G. Life and Death in a Macrophage : Role of the Glyoxylate Cycle in Virulence. **Eukaryotic cell**, v. 1, n. 5, 2002.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 1160

MONOD, J. The growth of bacterial cultures. **Annual Reviews in Microbiology**, n. 3, p. 371–394, 1949.

NEIGEBORN, L.; CARLSON, M. Genes affecting the regulation of SUC2 gene expression by glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, p. 845–858, 1984.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5. ed. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. p. 1274

NICAUD, J.-M. et al. Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*. **FEMS yeast research**, v. 2, n. 3, p. 371–9, ago. 2002.

ÖZCAN, S.; JOHNSTON, M. Function and Regulation of Yeast Hexose Transporters. **Microbiology and Molecular Biology ...**, v. 63, n. 3, 1999.

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

PAWLOWICZ, R. Key Physical Variables in the Ocean: Temperature, Salinity, and Density. **Nature Education Knowledge**, p. 1–11, 2013.

PEÑA, A.; PARDO, J.; RAMÍREZ, J. Early metabolic effects and mechanism of ammonium transport in yeast. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 253, n. 2, p. 431–438, 1987.

PETIT, T.; GANCEDO, C. Molecular cloning and characterization of the gene HXK1 encoding the hexokinase from *Yarrowia lipolytica*. **Yeast (Chichester, England)**, v. 15, n. 15, p. 1573–84, nov. 1999.

PIGNÈDE, G. et al. Characterization of an extracellular lipase encoded by LIP2 in *Yarrowia lipolytica*. **Journal of bacteriology**, v. 182, n. 10, p. 2802–10, maio 2000.

ROLLAND, F.; WINDERICKX, J.; THEVELEIN, J. M. Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. **FEMS yeast research**, v. 2, n. 2, p. 183–201, maio 2002.

RUIZ-HERRERA, J.; SENTANDREU, R. Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*. **Archives of microbiology**, v. 178, n. 6, p. 477–83, dez. 2002.

RYWIŃSKA, A. et al. Chemostat study of citric acid production from glycerol by *Yarrowia lipolytica*. **Journal of biotechnology**, v. 152, n. 1-2, p. 54–7, 10 mar. 2011.

SAUER, M. et al. Microbial production of organic acids: expanding the markets. **Trends in biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 100–8, fev. 2008.

SCHURE, E.; RIEL, N.; VERRIPS, C. The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS microbiology ...**, v. 24, n. 1, p. 67–83, jan. 2000.

SHIFRINE, M.; PHAFF, H. J.; DEMAİN, A. L. Determination of carbon assimilation patterns of yeasts by replica plating. **Journal of bacteriology**, v. 68, n. 1, p. 28–35, jul. 1954.

SPENCER, A. R. D. S. C. L. J. Non-conventional yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 2, p. 147–156, 1 jan. 2002.

TSIGIE, Y. A. et al. Oil Production from *Yarrowia lipolytica* Po1g Using Rice Bran Hydrolysate. **Journal of biomedicine & biotechnology**, v. 2012, p. 378384, jan. 2012.

TURKI, S. et al. A highly stable *Yarrowia lipolytica* lipase formulation for the treatment of pancreatic exocrine insufficiency. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 57, n. 4, p. 139–49, dez. 2010.

VAN DER WALT, J. P., VON ARX, J. A. The yeast genus *Yarrowia* gen. nov. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 46, p. 517–521, 1980.

VAN DIJKEN, J. et al. An interlaboratory comparison of physiological and genetic properties of four *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Enzyme and microbial technology**, v. 26, n. 9-10, p. 706–714, 1 jun. 2000.

VAN LEEUWEN, M. et al. The Hagen–Poiseuille pump for parallel fed-batch cultivations in microbioreactors. **Chemical Engineering Science**, v. 64, n. 8, p. 1877–1884, abr. 2009.

VERDUYN, C. et al. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. **Yeast**, v. 8, n. 7, 1992.

WACHÉ, Y. et al. Yeast as an efficient biocatalyst for the production of lipid-derived flavours and fragrances. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 89, n. 3-4, p. 405–16, 2006.

WALFRIDSSON, M. et al. Expression of different levels of enzymes from the *Pichia stipitis* XYL1 and XYL2 genes in *Saccharomyces cerevisiae* and its effects on

product formation during xylose utilisation. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 48, n. 2, p. 218–24, ago. 1997.

WALKER, G. M. **Yeast Physiology and Biotechnology**. [s.l.] John Willey & Sons Ltd - England, 1998.

WICKERHAM, L. J.; BURTON, K. A. Carbon Assimilation Tests for the Classification of Yeasts. **Journal of bacteriology**, v. 56, n. 3, p. 363–71, set. 1948.

WICKERHAM, L. J.; KURTZMAN, C. P.; HERMAN, A. I. Sexual reproduction in *Candida lipolytica*. **Science (New York, N.Y.)**, v. 167, n. 3921, p. 1141, 20 fev. 1970.

WOLF, K. (ED. . **Nonconventional Yeasts in Biotechnology - A Handbook**. [s.l.] Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1996.

WU, L.; GE, G.; WAN, J. Biodegradation of oil wastewater by free and immobilized *Yarrowia lipolytica* W29. **Journal of Environmental Sciences**, v. 21, n. 2, p. 237–242, jan. 2009.

YARROW, D. Four new combinations in Yeasts. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 38, n. 1 972, p. 357–360, 1972.

APÊNDICE

Figure 17: Ensaio preliminar para testar a assimilação de diferentes fontes de carbono. Para esquema de plaqueamento, vide figura acima. Os meios utilizados foram YPDA (YPD com ágar), YPA (YPDA sem adição de glicose) e MDVA (meio descrito por Verduyn et al. (1992) para o cultivo de *S. cerevisiae*, adicionado de ágar) e YNB (meio industrializado definido para o cultivo de leveduras, adicionado de ágar). Nessa etapa, os inóculos foram realizados em meio YPD, motivo pelo qual os resultados são discrepantes com os reportados na literatura.

Figura 18: Curvas de calibração para obtenção dos fatores de conversão das medidas de Abs_{600} para concentração celular em massa seca $[g.l^{-1}]$. Para linhagem W29, os fatores de conversão obtidos para cultivos em glicose foi $(0,593 \pm 0,017)$ e para glicerol $(0,751 \pm 0,014)$. Para a linhagem IMUFRJ 50682, os fatores de conversão obtidos para cultivos em glicose foi $(0,515 \pm 0,015)$ e para glicerol $(0,647 \pm 0,016)$.

Figura 19: Regressões lineares para obtenção da velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) em glicose para W29 ($0,2666 \pm 0,0063$ e $R^2 = 0,9861$) e IMUFRJ 50682 ($0,3514 \pm 0,0092$ e $R^2 = 0,9850$). Os pontos representam os valores das triplicatas e a linha tracejada ao redor da linearização representa o intervalo de confiança de 95%.

Figura 20: Regressões lineares para obtenção dos fatores de conversão do substrato glicose a biomassa seca na fase exponencial ($Y_{X/S}^{exp}$) para W29 (- 0,3418±0,013; - 0,3339±0,017; - 0,3758±0,011) e IMUFRJ 50682 (- 0,3214±0,012; - 0,3322±0,010; - 0,3129±0,012).

Figura 21: Regressões lineares para obtenção da velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) em glicerol para W29 ($0,3599 \pm 0,0097$ e $R^2 = 0,9883$) e IMUFRJ 50682 ($0,4618 \pm 0,0177$ e $R^2 = 0,9769$). Os pontos representam os valores das triplicatas e a linha tracejada ao redor da linearização representa o intervalo de confiança de 95%.

Figura 22: Regressões lineares para obtenção dos fatores de conversão do substrato glicerol a biomassa seca na fase exponencial ($Y_{X/S}^{exp}$) para W29 (- 0,5107±0,0274; - 0,5126±0,0099; - 0,5044±0,0284) e IMUFRJ 50682 (- 0,4944±0,0330; - 0,4472±0,0370; - 0,5038±0,0348).

Tabela 11: Dados referentes aos cultivos de ambas as linhagens de *Y. lipolytica* em MDBU e 2,5 g.l⁻¹ iniciais de glicose. Valores plotados no gráfico da figura 13 (mais informações relativas ao cultivo, vide figura e texto associado).

Tempo	Concentração Celular [g DW.l ⁻¹] W29			Concentração Celular [g DW.l ⁻¹] IMUFRJ 50682			Concentração Glicose [g.l ⁻¹] W29			Concentração Glicose [g.l ⁻¹] IMUFRJ 50682		
0	0,068	0,071	0,076	0,075	0,075	0,076	2,490	2,570	2,340	2,670	2,680	2,820
1	0,059	0,073	0,067	0,049	0,058	0,037	3,030	2,720	2,700	2,730	2,890	2,770
2	0,067	0,086	0,077	0,060	0,077	0,049	2,630	2,680	2,670	2,780	2,760	2,680
3	0,086	0,100	0,087	0,071	0,087	0,057	2,590	2,780	2,640	2,860	2,900	2,900
4	0,103	0,116	0,112	0,084	0,110	0,083	2,910	2,640	2,780	2,750	2,580	2,650
5	0,137	0,148	0,145	0,120	0,150	0,141	2,690	2,520	2,350	2,430	2,370	2,460
6	0,182	0,193	0,186	0,185	0,210	0,205	2,610	2,430	2,410	2,410	2,200	2,260
7	0,189	0,212	0,222	0,249	0,255	0,247	2,320	2,200	2,230	2,050	1,960	1,900
8	0,294	0,327	0,307	0,411	0,419	0,425	2,190	2,020	1,960	1,700	1,500	1,430
9	0,408	0,405	0,385	0,553	0,555	0,553	1,810	1,580	1,760	1,040	1,070	0,970
10	0,588	0,581	0,555	0,799	0,774	0,808	1,210	1,190	1,240	0,450	0,450	0,340
11	0,777	0,722	0,767	0,958	0,969	0,912	0,750	0,580	0,740	0,000	0,000	0,000
12	1,019	1,032	1,025	1,017	0,992	1,012	0,130	0,000	0,130	0,000	0,000	0,000

Tabela 12: Dados referentes aos cultivos de ambas as linhagens de *Y. lipolytica* em MDBU e 2,5 g.l⁻¹ iniciais de glicerol. Valores plotados no gráfico da figura 15 (mais informações relativas ao cultivo, vide figura e texto associado).

Tempo	Concentração Celular [g DW.l ⁻¹] W29			Concentração Celular [g DW.l ⁻¹] IMUFRJ 50682			Concentração Glicerol [g.l ⁻¹] W29			Concentração Glicerol [g.l ⁻¹] IMUFRJ 50682		
0	0,170	0,174	0,177	0,153	0,147	0,151	2,540	2,650	2,630	2,650	2,680	2,490
1	0,138	0,193	0,141	0,100	0,123	0,091	2,420	2,400	2,390	2,430	2,570	2,520
2	0,210	0,244	0,197	0,096	0,105	0,122	2,520	2,290	2,580	2,270	2,220	2,270
3	0,302	0,337	0,313	0,177	0,179	0,204	2,090	2,110	2,080	2,070	2,010	2,050
4	0,410	0,474	0,368	0,207	0,256	0,207	1,820	1,820	1,930	1,780	1,740	1,720
5	0,661	0,631	0,616	0,389	0,392	0,453	1,410	1,430	1,410	1,410	1,290	1,390
6	0,906	0,921	0,943	0,700	0,648	0,803	0,870	0,920	0,850	0,790	0,710	0,700
7	1,315	1,274	1,304	1,082	1,004	1,140	0,170	0,280	0,170	0,100	0,000	0,050
8	1,462	1,413	1,458	1,244	1,176	1,273	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
9	1,545	1,530	1,469	1,250	1,218	1,282	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
10	1,499	1,541	1,458	1,240	1,214	1,263	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Tabela 13: Relação de alguns dos experimentos realizados, incluindo os deste trabalho e os diferentes testes preliminares. Estão relacionados com os principais objetivos, as linhagens de microrganismos empregadas, as principais conclusões obtidas e se os resultados encontram-se no texto deste trabalho (com as sessões do texto indicadas). Continua nas páginas 118, 119, 120 e 121.

Breve descrição do experimento	Principais objetivos	Linhagens	Principais conclusões	No texto da dissertação ?
Ensaio em Meio Solidificado (Etapa 1): Ensaio qualitativo de crescimento em meio sólido com ambas as linhagens de <i>Y. lipolytica</i> , <i>K. lactis</i> e <i>S. cerevisiae</i> em diferentes temperaturas de incubação.	- Avaliar qualitativamente o crescimento das linhagens de <i>Y. lipolytica</i> e compará-los com as demais.	- <i>Y. lipolytica</i> W29	- Temperatura de 10°C somente W29 e <i>K. lactis</i> apresentaram crescimento após 16 dias. Sem diferença entre meio sem suplementação com vitaminas.	
	- Avaliar suplementação com vitaminas.	- <i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682	- T de 37°C= Somente <i>S. cerevisiae</i> exibiu crescimento em glicose + vitaminas e YPGA.	Entra os testes de crescimento em diferentes temperaturas (vide Item 5.1.1.1). Os outros resultados não são relevantes, visto que o teste em placas, mais completo, foi feito (Etapa Definitiva).
	- Determinar as fontes de carbono xilose e glicose são assimiláveis pelas leveduras.	- <i>K. lactis</i> CBS 2359	- T de 30°C= Todas as linhagens apresentaram crescimento em glicose. Nenhuma em xilose (exceto um crescimento discreto da IMUFRJ).	
	- Avaliar o crescimento em 3 temperaturas diferentes (10, 30 e 37°C).	- <i>S. cerevisiae</i> CEN.PK113-7D	- Foi possível notar a influência da adição de vitaminas para as linhagens <i>S. cerevisiae</i> (não cresce sem vitaminas), <i>K. lactis</i> (formação de colônias rosas com vitaminas) e <i>Y. lipolytica</i> (colônias maiores).	

Ensaios em Meio Solidificado (Etapa 2): Ensaios qualitativos de crescimento em meio sólido com ambas as linhagens de <i>Y. lipolytica</i> , <i>K. lactis</i> e <i>S. cerevisiae</i> em temperatura de incubação de 30°C.	- Avaliar qualitativamente o crescimento das linhagens de <i>Y. lipolytica</i> e compará-los com as demais.	- <i>Y. lipolytica</i> W29	- Não foi possível notar muita diferença frente a adição de vitaminas (questão do inóculo em YPD e capacidade da levedura em aderir elementos do meio complexo na sua superfície). Crescimento em sacarose das <i>Y. lipolytica</i> , que está associado à questão da preparação do inóculo em YPD.	Entra no apêndice (vide figura 17) para ressaltar a capacidade de crescimento de <i>Y. lipolytica</i> em YP e corroborar a questão com o problema nos inóculos. Não entraria no corpo da dissertação para evitar a descrição de mais uma metodologia e mais um meio (ensaios feitos em meio Verduyn solidificado).
	- Avaliar suplementação com vitaminas.	- <i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682		
	- Determinar as fontes de carbono xilose, glicose, glicerol e sacarose são assimiláveis pelas leveduras.	- <i>K. lactis</i> CBS2359 - <i>S. cerevisiae</i> CEN.PK113-7D.	- Nenhuma levedura cresceu bem em xilose (exceto <i>K. lactis</i> com fraquíssimo crescimento).	
	- Controle negativo em YPA.		- Somente as linhagens de <i>Y. lipolytica</i> apresentaram crescimento no controle negativo (YPA).	
Ensaios em Meio Solidificado (Etapa Definitiva): Ensaios qualitativos de crescimento em meio sólido com ambas as linhagens de <i>Y. lipolytica</i> em temperatura de incubação de 30°C com diluição seriada. Inóculos feito em meio definido. Teste das fontes de carbono Glicose, Glicerol, Etanol, Sacarose, Xilose, Citrato e Acetato.	- Avaliar qualitativamente o crescimento das linhagens de <i>Y. lipolytica</i> .		- Comprovação da auxotrofia por tiamina para ambas as linhagens.	SIM – (vide Itens 4.7.1 e 5.1.2).
	- Avaliar suplementação com tiamina e elementos traço.	- <i>Y. lipolytica</i> W29	- Adição de tiamina é mais importante que a adição de elementos traço.	
	- Determinar as fontes de carbono xilose, glicose, glicerol, sacarose, etanol, citrato e acetato são assimiláveis pelas leveduras	- <i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682	- Glicose e Glicerol são as únicas fontes assimiláveis por ambas as linhagens.	

Ensaio em Meio Solidificado para estresse salino: Teste de estresse salino para ambas as linhagens em meio YPDA.	<p>- Avaliar a resposta ao estresse imposto por diferentes concentrações de NaCl em meio complexo. Uma das concentrações é semelhante a concentração de NaCl de ambientes marinhos.</p> <p>- Y. lipolytica W29</p> <p>- Y. lipolytica IMUFRJ 50682</p>	SIM – (vide Itens 4.7.2 e 5.1.3).
Avaliação dos meios de cultivo encontrados na literatura: Teste dos meios Papanikolaou, Verduyn, Nicaud e YNB para cinéticas em meio líquido com 20 g.l ⁻¹ de glicose. Fonte de nitrogênio para todos foi sulfato de amônio. Primeiro teste substituindo a sulfato de amônio por ureia.	<p>- Definir qual melhor meio para o cultivo de <i>Y. lipolytica</i>.</p> <p>- Definir qual meio suporta melhor o crescimento de <i>Y. lipolytica</i>.</p> <p>- <i>Y. lipolytica</i> W29</p>	
<p>- Todos os meios definidos suportaram velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) semelhantes: Verduyn (0,28 h⁻¹); Papanikolaou sem extrato de levedura (0,28 h⁻¹) e YNB (0,27 h⁻¹).</p> <p>- Os meios complexos apresentaram os melhores resultados com $\mu_{\text{máx}}$ em YPD de 0,49 h⁻¹ e em Papanikolaou de 0,33 h⁻¹.</p> <p>- Meio Nicaud (com altas concentrações de vitaminas) foi o que apresentou menor $\mu_{\text{máx}}$ de 0,25 h⁻¹.</p> <p>- Teste mostrando que a substituição do sulfato de amônio por ureia faz com que o pH mantenha-se constante ao longo das cinéticas.</p>		NÃO entraria. Inóculos feitos em meio YPD. Resultados citados como preliminares e investigativos (vide Item 5.2.2).

	- Definir velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$)			
Cinéticas em meio definido Barth (MDBU):	- Determinar fatores de conversão. - Tentar verificar a formação de metabólitos extracelulares.	- <i>Y. lipolytica</i> W29 - <i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682	- Resultados apresentados neste trabalho.	SIM – (vide Itens 5.2.4 e figuras 13 e 15).
MDBS com 2,5 g.l⁻¹ de glicose	- Testar os cultivos com fonte de nitrogênio sulfato de amônio.	- <i>Y. lipolytica</i> W29 - <i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682	- $\mu_{\text{máx}}$ = 0,3109 (média das duplicatas) - $\mu_{\text{máx}}$ = 0,4253 (média das duplicatas)	NÃO. Resultados muito ruins para IMUFRJ (somente foi possível utilizar 4 pontos para regressão linear).
MDBS com adição de 2 ml.l⁻¹ de Antifoam (2,5 g.l⁻¹ de glicose)	- Testar os cultivos com fonte de nitrogênio sulfato de amônio. - Testar a adição de Antifoam-C	- <i>Y. lipolytica</i> W29 - <i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682	Velocidades específicas máximas muito discrepantes entre as duplicatas.	NÃO.
MDBS (G04-S) com adição de Antifoam (2,5 g.l⁻¹ de glicose).	- Teste da influência da adição de Antifoam-C	- <i>Y. lipolytica</i> W29 - <i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682	- $\mu_{\text{máx}}$ = 0,3329 ± 0,005878 e r^2 = 0,9913 - $\mu_{\text{máx}}$ = 0,3014 ± 0,02468 e r^2 = 0,8870	SIM. Demonstrar que a adição de antifoam não diminuiu as velocidades máximas específicas obtidas (vide Item 5.2.3.3).
MDBS (G04-S - Repetição) com adição de Antifoam (2,5 g.l⁻¹ de glicose)	- Teste da influência da adição de Antifoam-C	- <i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682	- $\mu_{\text{máx}}$ = 0,2759 ± 0,003516 e r^2 = 0,997	SIM. Demonstrar que a adição de antifoam não diminuiu as velocidades máximas específicas obtidas (vide Item 5.2.3.3).
MDBS (G-05-S) sem adição de Antifoam (2,5 g.l⁻¹ de glicose)	- Testar se era possível conduzir uma cinética com sulfato de amônio como fonte de nitrogênio.	- <i>Y. lipolytica</i> W29 - <i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682	- $\mu_{\text{máx}}$ = 0,3155 ± 0,005884 e r^2 = 0,9938 - $\mu_{\text{máx}}$ = 0,3138 ± 0,007863 e r^2 = 0,9901	SIM. Efeito da adição de sulfato de amônio na acidificação do meio (vide Item 5.2.3.1 e figura 8).

MDBU (G06-U) sem adição de Antifoam (2,5 g.l⁻¹ de glicose)	-Teste da substituição da fonte de nitrogênio, sulfato de amônio, por ureia.	- <i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682	- $\mu_{\text{máx}} = 0,2500 \pm 0,004339$ e $r^2 = 0,9907$	NÃO. Teste para avaliação do efeito da adição de ureia na manutenção do pH em 6,0 nos cultivos com 2,5 g.l ⁻¹ glicose. Sem dados de HPLC.
MDBU (G07-U) sem adição de Antifoam (2,5 g.l⁻¹ de glicose)	Inóculo feito em Sulfato de amônio. Início dos cultivos em alta concentração celular (Abs>= 0,2500)	- <i>Y. lipolytica</i> W29 - <i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682	- $\mu_{\text{máx}} = 0,2493 \pm 0,01290$ e $r^2 = 0,9516$ - $\mu_{\text{máx}} = 0,3253 \pm 0,01420$ e $r^2 = 0,9598$	NÃO. Metodologia não consistente com a utilizada. Feito para fins de teste.
MDBS sem Antifoam (2,5 g.l⁻¹ de etanol)	Testar o crescimento de ambas as linhagens em etanol.	- <i>Y. lipolytica</i> W29 - <i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682	- $\mu_{\text{máx}} = 0,1764 \pm 0,006144$ e $r^2 = 0,9740$ - $\mu_{\text{máx}}$ = não apresentou crescimento.	SIM. Para demonstrar que IMUFRJ não cresce em Etanol - (vide Item 5.1.2.2)
MDBS com Glicerol sem Antifoam (2,5 g.l⁻¹)	Testar o crescimento de ambas as linhagens em glicerol.	- <i>Y. lipolytica</i> W29 - <i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682	- $\mu_{\text{máx}} = 0,2891 \pm 0,007393$ e $r^2 = 0,9948$ - $\mu_{\text{máx}} = 0,3355 \pm 0,02631$ e $r^2 = 0,9702$	NÃO. No entanto, serviu para demonstrar que ambas as linhagens crescem em glicerol no meio MDBS. Foi observada a mesma queda de pH. Dados de HPLC e cinética ruins.

ANEXO

Figura 23: Esquema de uma célula genérica de levedura, com indicação das principais rotas metabólicas envolvidas no metabolismo de glicose, maltose, galactose, lactose, sacarose, frutose, manose, xilose, glicerol e etanol. Os círculos na membrana celular indicam a presença de mecanismos de transporte ou proteínas associadas a esse processo. O tronco principal, em linha destacada e com pontos, representa a via glicolítica, culminando dentro de uma mitocôndria genérica, representando as principais reações do Ciclo do Ácido Cítrico. Linhas pontilhadas representam as vias de fontes de carbono não fermentáveis. Figura reproduzida de Flores et al. (2000).

Tabela 14: Resumo das características genômicas obtidas através do sequenciamento de diferentes leveduras, apresentadas com sua nomenclatura original de publicação (novas taxonomias em parênteses). A ploidia é mostrada para as linhagens completamente sequenciadas, juntamente com o tamanho genômico (em megabases, excluindo-se o DNA ribossomal). CDS (*Coding DNA Sequence*) representa a quantidade prevista de genes codificadores de proteínas em cada espécie. Tabela adaptada de Dujon (2010).

Filo	Gênero	Espécie/Linhagem	Ploidia	Nº Crom.	Tam. Gen. (Mb)	CDS (Nº)
Saccharomycotina	Saccharomyces	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c	n	16	12,1	5.769
		<i>Saccharomyces paradoxus</i> CBS432	2n	16	12,2	-
		<i>Saccharomyces mikatae</i> IFO1815	2n	16	12,6	-
		<i>Saccharomyces kudriavzevii</i> IFO1802	-	16	11,4	-
		<i>Saccharomyces bayanus</i> CBS7001	2n	16	10,2	-
		<i>Saccharomyces exiguss</i> (<i>K. exigua</i>) CBS379	2n	-	-	-
		<i>Saccharomyces servazzii</i> CBS4311	2n	-	-	-
		<i>Saccharomyces castellii</i> CBS4309	-	9	11,4	4.700
	<i>Nakaseomyces</i>	<i>Candida glabrata</i> CBS138	n	13	12,3	5.204
	<i>Vanderwaltozyma</i>	<i>Kluyveromyces polysporus</i> (<i>V. polyspora</i>) DSMZ70294	n	13	14,7	5.652
	<i>Zygosaccharomyces</i>	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> CBS732	n	7	9,8	5.005
	<i>Lachancea</i>	<i>Kluyveromyces thermotolerans</i> (<i>L. thermot.</i>) CBS6340	2n	8	10,4	5.137
		<i>Kluyveromyces waltii</i> (<i>L. waltii</i>) NCYC2644	-	8	10,7	5.230
		<i>Saccharomyces kluyveri</i> (<i>L. kluyveri</i>) CBS3082	2n	8	11,3	5.397
	<i>Kluyveromyces</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i> CBS2329	n	6	10,7	5.108
		<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>marxianus</i> CBS712	-	-	-	-
	<i>Eremothecium</i>	<i>Ashbya gossypii</i> (<i>E. gossypii</i>) ATCC10895	n	7	8,7	4.715
	<i>Dekkera</i>	<i>Dekkera bruxellensis</i> CBS2499	n?	4-9	-	-
	<i>Ogataca</i>	<i>Hansenula polymorpha</i> (<i>O. polymorpha</i>) CBS4732	2n	6	9,5	5.933
	<i>Debaryomyces</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i> CBS767	n	7	12,2	6.397
		<i>Pichia stipitis</i> CBS6054	n	8	15,4	5.841
	<i>Clavispora</i>	<i>Pichia sorbitophila</i> CBS7064	2n	14	-	-
		<i>Pichia guilliermondii</i> ATCC6260	n	8	10,6	5.920
		<i>Clavispora lusitaniae</i> ATCC42720	n	8	12,1	5.941
	"Candida" II	<i>Candida parapsilosis</i> CDC317	2n	8	13,1	5.733
		<i>Lodderomyces elongisporus</i> CBS2605	2n	8	15,5	5.802
		<i>Candida tropicalis</i> MYA3404	2n	8	14,6	6.258
		<i>Candida albicans</i> SC5314	2n	8	14,3	6.107
		<i>Candida dubliniensis</i> CD36	2n	8	14,6	5.758
	<i>Trichomonascus</i>	<i>Arxula adeninivorans</i>	-	4	-	-
	<i>Komagataella</i>	<i>Pichia pastoris</i> (<i>K. pastoris</i>) GS115	n?	4	9,4	5.313
	<i>Yarrowia</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i> CBS7504	n	6	20,5	6.582
Taphrinomycotina		<i>Schizosaccharomyces pombe</i> 972h-	n	3	12,5	4.969
		<i>Schizosaccharomyces octosporus</i>	-	-	11,2	4.907
		<i>Schizosaccharomyces japonicus</i> yFS275	-	-	11,3	4.814
		<i>Schizosaccharomyces jsp.</i> OY26	-	-	11,5	5.057
Agaricomycotina		<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> H99	-	-	-	-
		<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> JEC21	n	14	19,0	6.572
Ustilagomycotina		<i>Malassezia globosa</i> CBS7966	n	8	8,9	4.285
		<i>Malassezia restricta</i> CBS7877	-	-	-	-