



UNICAMP

EULALIA VARGAS TAPIA

“MELHORAMENTO GENÉTICO DA LEVEDURA
OLEAGINOSA *LIPOMYCES STARKEYI* POR
MUTAGÊNESE ALEATÓRIA, VISANDO A PRODUÇÃO
DE BIOCOMBUSTÍVEIS DE SEGUNDA GERAÇÃO”

CAMPINAS

2012



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

EULALIA VARGAS TAPIA

MELHORAMENTO GENÉTICO DA LEVEDURA
OLEAGINOSA *LIPOMYCES STARKEYI* POR MUTAGÊNESE
ALEATÓRIA, VISANDO A PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS
DE SEGUNDA GERAÇÃO

Orientadora: Profa Dra Telma Teixeira Franco

Co-orientadora: Dra Ana Carolina Deckmann

Tese de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestra em Engenharia Química na Área de Concentração de Desenvolvimento de Processos Químicos.

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pela aluna Eulalia Vargas Tapia e orientada pela Profa. Dra. Telma Teixeira Franco e co-orientada pela Dra. Ana Carolina Deckmann

Profª. Dra. Telma Teixeira Franco (Orientadora)

CAMPINAS

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

V426m Vargas Tapia, Eulalia, 1981-
Melhoramento genético da levedura oleaginosa
Lipomyces starkeyi por mutagênese aleatória,
visando a produção de biocombustíveis de
segunda geração / Eulalia Vargas Tapia. --
Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Telma Teixeira Franco
Coorientador: Ana Carolina Deckmann.
Dissertação de Mestrado - Universidade
Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia
Química.

1. Mutagênese. 2. Irradiação ultravioleta. 3.
Leveduras. 4. Cerulenina. I. Teixeira Franco,
Telma, 1957-. II. Deckmann, Ana Carolina. III.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia Química. IV. Título.

Título em Inglês: Genetic improvement of oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*
through random mutagenesis, order to produce of second
generation of biofuels

Palavras-chave em Inglês: Mutagenesis, UV radiation, Yeast, Cerulenin

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos

Titulação: Mestra em Engenharia Química

Banca examinadora: Helia Harumi Sato, Marta Cristina Teixeira Duarte

Data da defesa: 31-07-2012

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado apresentada a Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

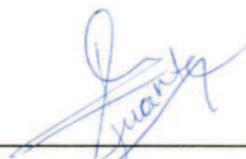
Aprovada em: 31 de Julho de 2012.



Prof^a. Dr^a. Telma Teixeira Franco (Orientadora)
Unicamp - Universidade Estadual de Campinas



Prof^a. Dr^a. Helia Harumi Sato
Unicamp - Universidade Estadual de Campinas



Dra. Marta C. Teixeira Duarte
CPQBA - Unicamp

CAMPINAS

2012

A DEUS

Que me concedeu o Dom da vida

A MEU PAI

Eduardo muito obrigado por estar presente nestes momentos, pela compreensão sempre me apoiando.

A MINHA FILHA

Agradeço a Deus por ter me dado você de presente, enchendo minha vida de alegria.

A MEUS IRMÃOS

Eufemia muito obrigado por tudo, Eufrasia, Evelio por sempre acreditarem em mim, pelo apoio, companheirismo e compreensão.

IN MEMORIAM

A minha mãe Josefina Tapia e meu irmão Daniel Vargas, que me ensinaram a lutar pelos meus sonhos, e que muitas vezes renunciaram aos seus sonhos por me ajudarem.

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora professora Dra. Telma Teixeira Franco pela oportunidade de aceitar-me em seu laboratório, por orientar-me, e principalmente pelos exemplos de dedicação ao trabalho e de profissionalismo.

À minha Coorientadora Dra. Ana Carolina Deckmann devo um agradecimento especial, pela orientação, pelo apoio, compreensão, dedicação, pelas conversas e principalmente pelo estímulo constante às minhas atividades.

À banca examinadora da qualificação e da defesa: Prof^a Dra. Helia Harumi Sato, Dra, Marta C. Teixeira Duarte, Prof^a Dra. Melissa Gurgel Adeodato Vieira, Dra. Cecilia Sulzbacher Caruso pelas observações e contribuições dadas ao trabalho.

À minha família pelo apoio incondicional nesta nova etapa da minha vida, sem vocês nada teria acontecido. Muito obrigada por se fazer presente mesmo não estando por perto. À Danielly por ter chegado a minha vida, para me dar alegrias e muito amor.

Aos integrantes do grupo LEBBPOR, pela convivência, auxílio, pelas demonstrações de carinho e por estar sempre disponíveis para me escutarem e ajudarem em momentos difíceis.

Agradecimentos à colega Andréia Anschau, pela colaboração com o trabalho e pela disponibilidade nos momentos necessários, e ao colega Fernando, pela análise de cromatografia.

Meus agradecimentos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo apoio financeiro. A Shell pelo apoio na realização deste trabalho.

À todos os amigos/as do Peru: Silvia, Lady, Rojer, Magaly, Salomón, Gladys, Yaneth, Ricardo e principalmente Luciana Hinoue e Jonathan por estarem sempre presentes me incentivando e apoiando em todos os momentos.

Agradeço a todos que estiveram ao meu lado e me ajudaram de alguma forma.

E, sobretudo a Deus que faz que tudo seja possível.

Bem-aventurado o homem que acha sabedoria, e o homem que adquire conhecimento; porque é melhor a sua mercadoria do que artigos de prata, e maior o seu lucro que o ouro mais fino. Mais preciosa é do que os rubis, e tudo o que mais possas desejar não se pode comparar a ela. Vida longa de dias está na sua mão direita; e na esquerda, riquezas e honra. Os seus caminhos são caminhos de delícias, e todas as suas veredas de paz. Provérbios 3 :13-17

Pensamento

SUMARIO

ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ÍNDICE DE TABELAS	xv
ABREVIATURAS	xvii
RESUMO	xviii
ABSTRACT	xix
I. INTRODUÇÃO	20
Objetivo geral	22
Objetivos específicos	22
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
II. 1. Biodiesel: a busca por combustíveis renováveis	23
II. 2. Lipídeos microbianos ou SCO (single-cell oil)	24
II. 3. Microrganismos oleaginosos com potencial de produção de biodiesel	26
II. 3.1. Leveduras oleaginosas	28
II.4. Composição dos ácidos graxos nas principais leveduras oleaginosas	31
II. 5. Melhoramento genético por mutagênese aleatória.	33
II. 5.1. Mutação de DNA	34
II. 5.2. Efeito mutagênico da irradiação por luz ultravioleta	36
II. 5.3. Sobrevivência e seleção de mutantes	36
II.5.4. Seleção de mutantes pela cerulenina	38
JUSTIFICATIVA	40
III. Material e métodos	42
III.1. Microrganismo	42
III.1.1. Meios de cultura	42
III.1.2. Preparo de pré-inóculo	43
III.1.3. Preparação de inóculo	43
III.1.4. Preparo do meio de fermentação	43
III. 2. Mutagênese aleatória	44

III.2.1 Irradiação UV	44
III.2.1. Seleção dos microrganismos irradiados	45
III.3. Fermentação em frascos agitados dos mutantes selecionados	46
III.3.1. Condições de cultivo	46
III.4. Fermentação da cepa mutante A1 e <i>L. starkeyi</i> DSM 70296 em biorreator.....	47
III.4.1. Condições de fermentação	47
III. 5. Metodologia analítica para estudos em frascos agitados e biorreator	48
III. 5.1. Determinação indireta de biomassa	48
III.5.2. Determinação de biomassa seca	48
III.5.3. Consumo de carboidratos	48
III.5.4. Produção de lipídeos	48
III. 5.5. Consumo de nitrogênio	49
III. 5.6. Contagem de células e morte celular	49
III. 5.7. Perfil de Ácidos graxos.....	50
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
IV.1. Mutagênese aleatória	51
IV.1.1. Irradiação UV	51
IV. 1.2. Seleção de mutantes.....	53
IV.2. Fermentação dos mutantes em frascos agitados	56
IV.2.1.Parâmetros de crescimento e consumo de nutrientes na fermentação de <i>L. starkeyi</i> e cepas mutantes em frascos agitados.....	56
IV.2.1.1. Cepas mutantes A1, A2, A3, B1, B3 e H4.	56
IV.2.1.2. Cepas mutantes A4 e B2.....	59
IV.2.2. Parâmetros de crescimento celular e produção de lipídeos na fermentação de <i>L. starkeyi</i> DSM 70296 e mutantes, em frascos agitados.....	61
IV.2.3 Parâmetros de produtividade	63
IV.2.3.1. Produtividade de biomassa (g/L.h)	63
IV.2.3.2. Produtividade de lipídeos (g/L.h)	64
IV.2.4. Composição de ácidos graxos do lipídeos dos mutantes A2, B1, B2, B3 e H4	66
IV.3. Fermentação em biorreator	70
IV.3.1. Parâmetros de crescimento	70
IV.3.3. Parâmetros de produtividade	73

IV.3.3.1. Produtividade de biomassa (g/L.h)	74
IV.3.3.2. Produtividade de lipídeos (g/L.h).....	74
IV.3.3. Composição de ácidos graxos dos lipídeos da cepa padrão <i>L. starkeyi</i> DSM 70296 e do mutante A1 cultivados em biorreator	76
CONCLUSÕES.....	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química dos triglicerídeos.....	24
Figura 2. Caixa de luz UV utilizada para a mutagênese. Esquerdo: posição da caixa dentro do fluxo laminar. Direito: posição das lâmpadas UV.	43
Figura 3. Representação esquemática do experimento de exposição UV para a determinação da sobrevivência celular.....	44
Figura 4. Representação esquemática do experimento de fermentação dos mutantes em frascos agitados.....	45
Figura 5. Unidades de colônias formadas (UFC) após a exposição UV.....	51
Figura 6. Seleção de cepas mutantes de <i>L. starkeyi</i> DSM 70296 submetidos a irradiação UV. Placas a, b, c, d colônias mutantes em meio de cultura suplementado com cerulenina (10µg/µL), Nos círculos vermelhos, algumas colônias mutantes com diâmetros ~0.5mm. Placa e. Controle positivo (colônias não irradiadas e plaqueadas me meio não suplementado por cerulenina). Placa f. controle negativo colônias não irradiadas e plaqueadas me meio suplementado com cerulenina.....	53
Figura 7. Mutantes selecionados de acordo ao critério de maior tamanho onde foram identificados como A1, A2, A3, A4, B1, B2, B3 e H4 estocados em meio sólido YPX.....	54
Figura 8. Parâmetros de crescimento e consumo de nutrientes (xilose e nitrogênio) pelas cepas mutantes (A1, A2, A3, B1, B3 e H4) e cepa padrão, (CT) cultivadas em frascos agitados durante 168 horas.....	57
Figura 9. Parâmetros de crescimento e consumo de nutrientes pelas cepas mutantes (A4 e B2), e cepa padrão, CT2) cultivadas em frascos agitados durante 217h.....	59

Figura 10. Produtividade de biomassa (g/L.h) da cepa padrão <i>L. starkeyi</i> DSM 70296 (CT) e dos mutantes A1, A2, A3, B1, B3 e H4. Letras distintas de produtividade de biomassa significam que as amostras são diferentes ($p < 0,05$).....	63
Figura 11. Produtividade de biomassa (g/L.h) da cepa padrão <i>L. starkeyi</i> DSM 70296 (CT) e dos mutantes A4 e B2. Letras distintas de produtividade de biomassa significam que as amostras são diferentes ($p < 0,05$).	64
Figura 12. Produtividade de lipídeo (g/L.h) dos mutantes A1, A2, A3, B1, B3, H4 e da cepa padrão <i>L. starkeyi</i> DSM 70296 (CT) cultivados em frascos agitados por 168h. Letras distintas significam que as amostras são diferentes ($p < 0,05$).....	64
Figura 13. Produtividade de lipídeo (g/L.h) dos mutantes B3 e A4 e da cepa padrão <i>L. starkeyi</i> DSM 70296 (CT) cultivados em frascos agitados por 217h. Letras distintas significam que as amostras são diferentes ($p < 0,05$).....	65
Figura 14. Cromatograma dos ácidos graxos dos lipídeos microbianos da cepa padrão (CT) <i>L. starkeyi</i> DSM 70296 e os mutantes H4 cultivados em frascos agitados, analisados por cromatografia gasosa.....	67
Figura 15. Perfil de crescimento obtido na fermentação do mutante A1: M1 (a) e M2 (b); e na fermentação da cepa padrão: S1 (c) e S2 (d).....	70
Figura 16. Perfil de consumo de nutrientes: xilose, glicose, acúmulo de lipídeos nas fermentações do mutante A1: M1 (a) e M2 (b) e a cepa padrão S1 (c) e S2 (d)	71
Figura 17. Produtividade de biomassa (g/L.h) na fermentação da cepa padrão <i>L. starkeyi</i> DSM 70296 (S1 e S2) e do mutante A1 (M1 e M2) e. Letras distintas significam que as amostras são diferentes ($p < 0,05$).....	73

Figura 18. Produtividade de lipídeos (g/L.h) nas fermentações da cepa padrão *L. starkeyi* DSM 70296 (S1 e S2) e do mutante A1 (M1 e M2). Letras distintas significam que as amostras são significativamente diferentes ($p < 0,05$).....

74

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Conteúdo de lipídeos de alguns microrganismos oleaginosos (Meng et al., 2009).....	26
Tabela 2. Produção de lipídeos por microrganismos a partir de carboidratos por processos fermentativos.....	29
Tabela 3. Composição dos ácidos graxos de <i>L. starkeyi</i> cultivada em diferentes fontes de carbono.....	31
Tabela 4. Perfil de ácidos graxos de alguns lipídeos vegetais. Adaptado de Ma and Hanna, 1999.....	32
Tabela 5. Composição do meio de cultura da levedura <i>L. starkeyi</i> DSM 70296 para o seguinte estudo.....	41
Tabela 6. Resultados gerais da fermentação da cepa padrão e os mutantes A1, A2, A3, B1, B3 e H4 de <i>L. starkeyi</i> DSM 70296 (CT), obtidos pelo cultivo em frascos agitados durante 168h.....	61
Tabela 7. Resultados gerais da fermentação da cepa padrão e dos mutantes A4 e B2 de <i>L. starkeyi</i> DSM 70296 (CT2), obtidos pelo cultivo em frascos agitados durante 217h.....	61

Tabela 8. Composição de ácidos graxos dos lipídeos produzidos pelos mutantes (A2, B1, B3 e H4) e cepa padrão <i>L. starkeyi</i> DSM 70296 (CT) estudados em frascos agitados.....	68
Tabela 9. Resultados gerais da fermentação da cepa padrão <i>L. starkeyi</i> DSM 70296 (S1 e S2) e do mutante A1 (M1 e M2) em biorreator.....	72
Tabela 10. Composição de ácidos graxos dos lipídeos da cepa padrão <i>L. starkeyi</i> DSM 70296 e do mutante A1 cultivados em batelada alimentada.....	75

ABREVIATURAS

X	Xilose
C/N	Carbono/nitrogênio
AM	meio de adaptação
SM	Meio de seleção
XAM	Meio de adaptação com xilose
XSM	Meio de seleção com xilose
YPX	Yeast peptone xylose
UV	Ultravioleta
CT	Controle
FAS	Fatty acid synthase
M	Mutante
S	Padrão

RESUMO

Neste trabalho foram desenvolvidos estudos visando o melhoramento genético da linhagem de levedura *Lipomyces starkeyi* DSM 70296, visando sua utilização na biossíntese de precursores de biocombustíveis a partir de fontes renováveis. Inicialmente foram verificados os parâmetros de mutagênese. O melhoramento genético foi conduzido por mutagênese aleatória de DNA por irradiação ultravioleta. O tempo de exposição foi ajustado de forma a assegurar uma taxa de sobrevivência celular não superior a 5%, para obter indivíduos contendo elevado acúmulo de mutações no DNA. Os mutantes foram selecionados com o uso da cerulenina agente interferente ao metabolismo de interesse, de forma que fossem identificados os mutantes cujas alterações genéticas pudessem estar promovendo efeitos sobre este metabolismo. Os mutantes que demonstraram crescimento normal em meio de cultura suplementado com cerulenina foram considerados bons candidatos para estudos aprofundados. Nesta etapa foram selecionados 90 mutantes, dos quais foram selecionados os oito melhores candidatos para estudo através de fermentação em frascos agitados. A avaliação de desempenho fermentativo foi conduzida a partir da avaliação dos índices de crescimento e produtividade de lipídeo utilizando meio de cultura contendo xilose como única fonte de carbono. A fermentação da cepa padrão foi conduzida nas mesmas condições para permitir uma análise comparativa. Os resultados obtidos mostraram que um dos mutantes (identificado como A1) apresentou aumento significativo nos índices de produtividade de biomassa e lipídeo em relação à cepa padrão (teste de Tukey com 95% de significância). Este mutante foi então selecionado para estudo aprofundado através da fermentação em biorreator utilizando a mesma composição de açúcares observada em bagaço de cana-de-açúcar (30% glicose: 70% xilose), conforme determinado em outros estudos conduzidos em nosso laboratório. Novamente, a fermentação da cepa padrão foi conduzida nas mesmas condições para permitir a análise comparativa. Os resultados confirmaram que o mutante A1 apresenta maior produtividade tanto em biomassa (88 g/L) quanto em fração de lipídeo (54,6%), em comparação à cepa padrão (76 g/L e 47,5%, respectivamente). Estes resultados indicam a viabilidade da estratégia de mutagênese aleatória aliadas à seleção de mutantes por cerulenina para o melhoramento genético desta levedura oleaginosa, visando sua aplicação no processo de biossíntese de precursores de biocombustíveis de segunda geração.

Palavras-chave: *Lipomyces starkeyi* DSM 70296, mutagênese aleatória, irradiação ultravioleta, levedura oleaginosa, cerulenina, lipídeos microbianos, biocombustíveis.

ABSTRACT

In this work it were performed studies aiming the genetic improvement of the yeast *Lipomyces starkeyi* strain DSM 70296 for its utilization in the biosynthesis of biofuels' precursors from renewable sources (sugarcane bagasse). Initially, we defined the parameters of mutagenesis. The genetic breeding was carried out by random mutagenesis of DNA by ultraviolet irradiation. The exposure time was adjusted to ensure a cell survival rate not exceeding 5%, in order to obtaining individuals presenting high rates of DNA mutations. The mutants were selected by using cerulenin, an compound displaying effects on the metabolism of interest (biosynthesis of lipids). Thus, the selected mutants are potentially carriers of genetic alterations in this particular metabolism. The mutants demonstrating normal growth in culture medium supplemented with cerulenin were considered good candidates for in-depth studies. In this step we selected 90 mutants, of which eight were considered the best candidates for further studies by fermentation in shake flasks. The evaluation of fermentative performance was carried out based on growth and lipid productivity rates using culture medium containing xylose as sole carbon source. The fermentation of the wild-type strain was conducted under the same conditions to allow a comparative analysis. The results showed that the mutant identified as A1 presented a significant increase in the productivity rates of both biomass and lipid in comparison to wild-type strain (Tukey test with 95% significance). This mutant was then selected for detailed study by fermentation in bioreactor using the same carbohydrate composition observed in sugarcane bagasse (30% glucose: 70% xylose), as previously determined by other studies in our laboratory. Again, fermentation of the wild-type and the mutant A1 was performed under the same conditions in order to allow a comparative analysis. The results confirmed that the A1 mutant presents an increased productivity of both biomass (88 g/L) and lipids (54.6%) when compared to the wild-type strain (76 g/L and 47.5%, respectively). These results indicate the feasibility of random mutagenesis strategy coupled with mutant selection employing cerulenin for the genetic improvement of the oleaginous yeast *L. starkeyi*, focusing its use in the biosynthesis of precursors of second generation biofuels.

Keywords: *Lipomyces starkeyi* DSM 70296, random mutagenesis, ultraviolet irradiation, oleaginous yeast, cerulenin, microbial lipids, biofuels.

I. INTRODUÇÃO

Com o aumento do preço do petróleo bruto e a crescente preocupação com o esgotamento dos derivados fósseis, vem se estabelecendo uma grande demanda por fontes renováveis para a produção de combustíveis. Nos últimos anos, as indústrias deste setor têm voltado seu foco para a exploração de recursos que utilizem tais fontes como substrato e baseiem-se em processos limpos, isto é, com baixo índice de emissão de gases (CO_2 , CH_4 e NO_2).

Entre os principais combustíveis alternativos está o biodiesel produzido a partir de óleos vegetais (palma, colza e soja), gordura animal e óleo residual de cozinha. São os chamados 'biocombustíveis de primeira geração'. No entanto, todos estes recursos requerem energia e áreas de cultivo para sua produção em larga escala, competindo diretamente por áreas de plantio e por recursos energéticos com as culturas agropecuárias (Meng et al., 2009, Vicente et al., 2009).

Assim, apesar dos impactos favoráveis que sua comercialização pode oferecer, os aspectos econômicos envolvidos na produção do biodiesel de primeira geração têm sido um fator limitante a sua ampla utilização. Sendo assim, têm-se buscado fontes renováveis que não concorram por áreas de plantio com outros setores: são estes os chamados 'biocombustíveis de segunda geração'.

Dentre os principais recursos disponíveis para a produção de biocombustíveis da segunda geração, a biomassa lignocelulósica assume posição de destaque não apenas pela sua abundância no planeta, como também por constituir material de resíduo de diversos setores industriais. No caso da biomassa vegetal, apontam-se ainda vantagens ecológicas dado que seu uso contribui com o balanço de carbono: o CO_2 emitido pela indústria é recapturado via fotossíntese pelas plantas que lhe servem de matéria-prima. O desafio atual é o desenvolvimento de processos competitivos para a obtenção de biocombustíveis a partir desta biomassa, viabilizando a produção em larga escala e a custos acessíveis de forma a permitir a substituição dos combustíveis fósseis pelos biocombustíveis.

A conversão da biomassa lignocelulósica em biodiesel supõe a transformação dos açúcares complexos que compõem a estrutura vegetal (celulose e hemicelulose) em lipídeos com composição e em quantidades adequadas à demanda industrial. Neste

contexto, os microrganismos com capacidade de produzir quantidades significativas de lipídeos, os chamados microrganismos oleaginosos ou SCO (Single Cell Oil), despontam como uma interessante ferramenta para a produção de biodiesel a partir dos resíduos lignocelulósicos uma vez que existem diversas linhagens naturalmente capazes de metabolizar os açúcares complexos presentes na biomassa vegetal, como algumas espécies de leveduras, bactérias e fungos, entre outros.

Entretanto, mesmo entre os microrganismos mais eficientes em realizar tal bioconversão, ainda existe uma grande distância entre a produtividade 'natural' das cepas e a produtividade requerida para atender as demandas do processo em escala industrial. Neste sentido, é fundamental o desenvolvimento de novas estratégias que permitam aumentar a produtividade do processo de transformação da biomassa lignocelulósica em energia. Entre tais estratégias sobressaem-se as ferramentas da biologia molecular e engenharia genética, visando direcionar o metabolismo das células para um melhor aproveitamento do substrato e aumento da sua capacidade biossintética.

Neste contexto, o projeto em questão se propôs a aplicar uma metodologia de manipulação genética da levedura oleaginosa *Lipomyces starkeyi* DSM 70296, previamente selecionada por outro trabalho em nosso grupo por apresentar grande potencial de uso na produção de biocombustíveis de segunda geração a partir de biomassa vegetal. A manipulação genética foi conduzida com a finalidade de aumentar sua produtividade natural no processo de fermentação.

OBJETIVO GERAL

Utilizar mutagênese aleatória do DNA da *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 para obtenção de microrganismos com maior produtividade de bioconversão de xilose, em lipídeos.

Objetivos específicos

1. Padronização da metodologia de mutagênese aleatória por irradiação ultravioleta, através de (curvas dose-resposta) para acessar níveis de sobrevivência celular entre 1-5%.
2. Seleção dos mutantes candidatos por plaqueamento em meio seletivo contendo cerulenina, um inibidor da atividade da enzima ácido graxo sintase.
3. Estudo dos melhores mutantes candidatos em frascos agitados, acompanhando seu crescimento e acúmulo de lipídeos, utilizando xilose como fonte de carbono e usando a cepa padrão como controle.
4. Estudar o desempenho dos mutantes selecionados em biorreator utilizando os mesmos parâmetros de fermentação estabelecidos para a cepa padrão, de forma a avaliar o potencial de utilização em maior escala.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II. 1. Biodiesel: a busca por combustíveis renováveis.

Preocupações sobre segurança energética, alterações climáticas e o preço do petróleo estão impulsionando a busca de fontes alternativas de energia que permitam reduzir a dependência dos produtos fósseis. Neste sentido os combustíveis derivados de recursos renováveis vêm sendo considerados uma das melhores opções no curto prazo (Zhao et al., 2008, Ma and Hanna, 1999, Meng et al., 2009, Azevedo, 1998, Peng and Chen, 2012)

Uma das mais importantes fontes de energia renovável é o biodiesel, produzido a partir de óleos, gordura animal e biomassa vegetal, onde os triglicerídeos são convertidos em ésteres monoalquílicos de ácidos graxos de cadeia longa (Lang et al., 2001, Vicente et al., 2004, Meng et al., 2009).

Para a produção de biodiesel, vários lipídeos renováveis têm sido escolhidos, como: óleos de vegetais, gorduras animais e óleo residual de cozinha. No Sudeste Asiático, Europa, Estados Unidos e China, o óleo de palma, óleo de colza ou canola, a soja transgênica e o óleo de cozinha residual estão sendo utilizadas para produzir biodiesel, respectivamente (Aggelis et al., 1995, Vicente et al., 2004, Caldeira, 2011). As principais vantagens do biodiesel incluem o fato de constituir um recurso renovável de fácil fabricação (Sheehan et al., 1998) e com baixo teor de enxofre (Antolin et al., 2002, Vicente et al., 2004).

Entretanto, o biodiesel derivado de plantas oleaginosas ou gorduras animais substitui só uma pequena fração do total demandado pelo setor sem comprometer áreas de cultivo utilizadas para culturas alimentícias (Chisti, 2007, Meng et al., 2009). O biodiesel produzido a partir de óleos vegetais requer vastas áreas cultivadas para sua produção em larga escala, enquanto a utilização de óleos provenientes de gordura animal prevê imensos gastos com a criação e alimentação dos animais (Meng et al., 2009).

Assim, apesar do impacto favorável que a comercialização do biodiesel de primeira geração oferece, sua produção tem sido insuficiente para substituir o diesel derivado de fontes fósseis (Lang et al., 2001, Vicente et al., 2004, Meng et al., 2009). Neste sentido, o combustível alternativo não só deve ter melhores benefícios ambientais como também deve ser economicamente competitivo e produzido em quantidades suficientes para causar impacto significativo na demanda de energia (Meng et al., 2009).

Neste contexto, a produção de biodiesel a partir de resíduos lignocelulósicos provenientes dos setores agroflorestais sobrevém como uma alternativa viável para substituir o combustível fóssil. Existe um crescente interesse na identificação de microrganismos capazes de converter os açúcares complexos presentes na biomassa lignocelulósica em moléculas combustíveis, como etanol e ácidos graxos. No caso de biodiesel, os microrganismos oleaginosos têm sido muito estudados como alternativa à origem agrícola e animal, por apresentarem ciclo curto de produção, demandarem pouco espaço físico e não estarem sujeitos aos efeitos de sazonalidade (Meng et al., 2009).

Além disso, os lipídeos produzidos por microrganismos oleaginosos apresentam composição de ácidos graxos semelhante à de óleos vegetais (Huang et al. 2009), sendo ricos em ácidos graxos poli-insaturados (Ratledge and Wynn, 2002, Ratledge, 2002, Garzón, 2009, Francisco, 2010)

II. 2. Lipídeos microbianos ou SCO (*SINGLE-CELL OIL*)

Referem-se a lipídeos microbianos às gorduras e/ou óleos produzidos por processos fermentativos usando algas, fungos filamentosos, bactérias e leveduras. Os triglicerídeos são os principais componentes lipídicos encontrados nestes microrganismos (Ratledge, 1991). Triglicerídeos constituem cadeias de ácidos graxos entre 14 e 20 carbonos (Zhao et al., 2008), o que lhes provêem atrativas características industriais. A Figura 1 mostra a estrutura primária de um triglicerídeo.

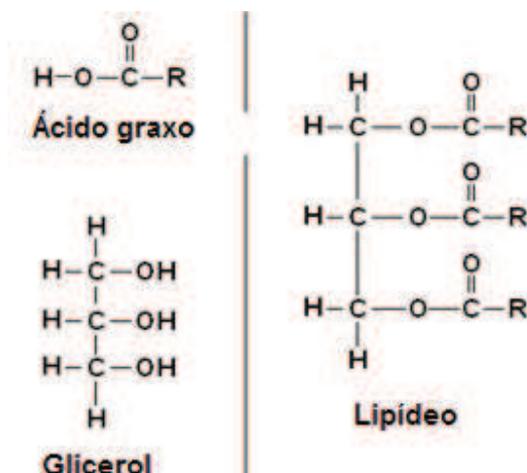


Figura 1. Estrutura química dos triglicerídeos.

SCO ou *Single-cell oil* é o termo adotado pela comunidade científica para denominar os lipídeos e, particularmente, os triglicerídeos produzidos por microrganismos (Aggelis and Komaitis, 1999). Os SCO são potencialmente comercializáveis. Devido ao elevado conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA), os produzidos por fungos e algas têm usos como nutracêuticos, farmacêuticos e como suplemento agropecuário (Ratledge, 1993, Lewis et al., 2000). Enormes avanços foram obtidos quanto à aplicação dos SCO de levedura na indústria oleoquímica e, particularmente, na produção de biodiesel, graças à semelhança química com os óleos vegetais (Xue et al., 2006, Dai et al., 2007, Liu and Zhao, 2007, Zhao et al., 2008, Peng and Chen, 2008, Ratledge and Cohen, 2008, Angerbauer et al., 2008, Xiong et al., 2008, Karatay and Donmez, 2010, Hong et al., 2011).

Diferentes microrganismos, como microalgas (Chisti, 2007, Francisco, 2010, Brennan and Owende, 2010), bacilos e fungos (bolores e leveduras), pertencentes a diversas famílias, possuem a capacidade de produzir e acumular uma grande fração de lipídeos em relação à sua massa seca (Alvarez and Steinbüchel, 2003, Ageitos et al., 2011). Aqueles com teor de lipídeo igual ou maior a 20% de massa seca são classificados como oleaginosos (Ratledge and Wynn, 2002, Karatay and Donmez, 2010).

As melhores condições para a produção de lipídeos microbianos incluem condições de limitação de nitrogênio na presença de excesso de carbono (Ratledge,

2004, Karatay and Donmez, 2010). As leveduras oleaginosas apresentam propriedades metabólicas que permitem a continuação do consumo de substrato, que é convertido em lipídeo e armazenado como reservas de energia dentro da célula (Ratledge, 1991, Ratledge and Cohen, 2008). Os níveis de rendimento de lipídeos ($Y_{L/S}$) atingem de 15-20% de massa seca (Ratledge, 1991), sendo o máximo teórico entre 32 a 33% de massa seca (Moreton, 1987, Ratledge and Cohen, 2008).

A maior barreira para a comercialização dos SCO é o alto custo de produção, sendo que atualmente só são considerados economicamente viáveis quando empregado na produção de nutracêuticos (Ratledge, 2004, Liu and Zhao, 2007). Assim como na maioria dos processos de produção por fermentação, em que o maior impacto no custo é o preço da matéria-prima, os lipídeos produzidos por leveduras apresentam a mesma dificuldade (Garzón, 2009). Apesar desta limitação, as leveduras oleaginosas são considerados microrganismos favoráveis para a produção de biodiesel (Li et al., 2008, Beopoulos et al., 2009, Meng et al., 2009, Karatay and Donmez, 2010, Ageitos et al., 2011, Faife et al., 2011, Peng and Chen, 2012).

II. 3. Microrganismos oleaginosos com potencial de produção de biodiesel

Nos últimos anos, muitos microrganismos têm sido estudados como potenciais produtores de lipídeos para biodiesel, dentre os quais destacam-se as bactérias, leveduras e fungos (Li et al., 2008, Meng et al., 2009, Saenge et al., 2011, Papanikolaou and Aggelis, 2011b). Nestes microrganismos, o acúmulo de lipídeo varia entre as espécies e as cepas individuais, e depende das diferentes fontes de substrato e condições de cultura, como temperatura, pH, tempo de cultivo, entre outros (Papanikolaou and Aggelis, 2011b).

Na Tabela 1 estão listados os microrganismos com potencial para a produção de lipídeos.

Tabela 1. Conteúdo de lipídeos de alguns microrganismos oleaginosos (Meng et al., 2009).

Microrganismos	Conteúdo de lipídeo (% massa seca)
Bactéria	
<i>Arthrobacter sp.</i>	>40
<i>Rhodococcus opacus</i>	24–25
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	27–38
<i>Bacillus alcalophilus</i>	18–24
Levedura	
<i>Candida curvata</i>	58
<i>Cryptococcus albidus</i>	65
<i>Lipomyces starkeyi</i>	64
<i>Rhodotorula glutinis</i>	72
Fungos	
<i>Aspergillus oryzae</i>	57
<i>Mortierella isabellina</i>	86
<i>Humicola lanuginose</i>	75
<i>Mortierella vinacea</i>	66

As bactérias têm uma vantagem para uso na produção de óleo em larga escala devido a sua maior velocidade de crescimento, necessitando apenas de cerca de 12 a 24 horas para atingir a fase estacionária. Nas bactérias, especialmente no grupo dos actinomicetos (*Mycobacterium*, *Streptomyces*, *Rhodococcus* e *Nocardia*), o acúmulo de lipídeos é bastante expressivo (até 70% de biomassa seca), especialmente quando são utilizadas fontes de carbono simples como glicose (Alvarez and Steinbüchel, 2003). No entanto, os lipídeos são acumulados na forma de polihidroxicanoatos, os quais são incorporados à membrana externa da célula, dificultando sua extração (Meng et al., 2009).

As leveduras e, especialmente, os fungos são considerados microrganismos oleaginosos desde 1980 (Ratledge, 1993, Papanikolaou and Aggelis, 2011a). Algumas cepas de levedura, como *Rhodosporium sp.*, *Rhodotorula sp.* e *Lipomyces starkeyi* são capazes de acumular lipídeo intracelularmente em até 70% de biomassa seca (Meng et al., 2009). Estes lipídeos são armazenados em vesículas intracelulares, os chamados

corpos lipídicos, facilitando sua extração em comparação às bactérias. Por isto, apesar de sua velocidade de crescimento ser inferior à das bactérias, as leveduras e fungos são considerados altamente promissores para a produção de biodiesel.

II. 3.1. Leveduras oleaginosas

As leveduras são microrganismos predominantemente unicelulares, amplamente distribuídos na natureza e pertencentes ao Reino Fungi (Madigan, 2004). Entre as principais características incluem-se: presença de parede celular são heterotróficas, ausência de motilidade, reprodução sexuada através de células especializadas denominadas esporos, entre outros. São capazes de crescimento aeróbio ou anaeróbio facultativo, o que os torna capazes de sobreviver em diferentes condições ambientais (Madigan, 2004).

Quanto à composição química, as leveduras são constituídas por 68%-83% de água, além de substâncias nitrogenadas, carboidratos, lipídeos, vitaminas e minerais, entre outros (Guimarães, 2005).

Por serem heterotróficas, as leveduras dependem de fontes de carbono orgânico para seu crescimento e obtenção de energia, sendo os carboidratos os nutrientes de maior importância (Madigan, 2004). Alguns açúcares simples, como a glicose, frutose e manose, são assimiladas pela maioria das espécies; já as fontes de carbono mais complexas, como oligossacarídeos, polissacarídeos, alcoóis primários, polióis, ácidos orgânicos, pentoses, tetrosses, hidrocarbonetos e lipídeos são utilizados seletivamente por algumas espécies (Guimarães, 2005).

Em condições normais, os esqueletos de carbono provenientes da assimilação dos açúcares são utilizados nos metabolismos intracelulares e na divisão celular, permitindo o crescimento da população de leveduras. Quando as fontes de carbono se esgotam, a população atinge a fase estacionária, em que a divisão celular é drasticamente reduzida.

Entretanto, no caso de ocorrer privação de nutrientes importantes aos processos celulares e constituição de novas células, pode ocorrer o desvio destes esqueletos de

carbono para outro metabolismo, como a síntese de ácidos graxos. Assim, ao considerar os açúcares como fonte de carbono, é importante lembrar a diferença que existe entre a capacidade de uma levedura em assimilar o açúcar (metabolismo oxidativo, em que o açúcar é completamente convertido em energia e CO₂) e sua capacidade de fermentá-lo em um produto intermediário, como etanol, lactato e ácidos graxos (metabolismo fermentativo) (Madigan, 2004).

As leveduras podem produzir lipídeo a partir de diferentes fontes de carbono, inclusive a partir de lipídeos presentes nos meios de cultura (Ageitos et al., 2011). Elas podem variar sua composição lipídica, substituindo os ácidos graxos dos triglicerídeos por aqueles presentes no meio de cultura (Iassonova et al., 2008)

Alguns autores demonstram que, entre 600 espécies de leveduras investigadas, apenas 30 foram capazes de acumular lipídeo em mais de 25% de seu peso seco (Beopoulos et al., 2008, Ageitos et al., 2011). Dentre elas, citam-se os gêneros *Yarrowia*, *Cryptococcus*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Trichosporon* e *Lipomyces* (Li et al., 2008) e, mais especificamente, as espécies *Lipomyces starkeyi*, *Rhodospiridium toruloides*, *Rhodotorula glutinis* e *Yarrowia lipolytica* (Ageitos et al., 2011). Estas espécies podem acumular lipídeos na proporção de até 80% do seu peso seco (Pan et al., 2009).

Assim as leveduras têm sido consideradas de alto interesse para a produção de lipídeo em escala industrial (Ratledge, 2004, Angerbauer et al., 2008, Li et al., 2008). A tabela 2 mostra algumas outras espécies de leveduras de interesse para a produção de lipídeos.

Tabela 2. Produção de lipídeos por microrganismos a partir de carboidratos por processos fermentativos

Microrganismos	Biomassa (g/L)	Lipídeo (%)	Temperatura (°C)	tempo (h)	pH	Fonte de Carbono	Modo de Cultivo	Autor
<i>L. starkeyi</i> DSM 70296	13,8	24,3	28	120	6	Xilose	F	(Garzón, 2009)
<i>L. starkeyi</i>	20,5	61,5	30	120	6	Glicose + Xilose	F	(Zhao et al., 2008)
<i>L. starkeyi</i> DSM 70295	13,3	56,3	30	220	5	Glicose	F	(Angerbauer et al., 2008)
	9,00	72,3	30	220	5	Glicose	F	
<i>L. starkeyi</i> AS 2. 1390	18	30	28	96	5,8	Glicose	F	(Li et al., 2005)
	20,9	20,5	28	96	5,8	Xilose	F	
	14	24,9	28	96	5,8	L-arabinose	F	
<i>R. toruloides</i>	18,2	76,1	30	120	6	Glicose	F	(Zhao et al., 2008)
<i>R. toruloides</i> Y4	151,5	48	30	600	5,6	Glicose	f F-b	(Li et al., 2007)
	106,5	67,5	30	134	5,6	Glicose	F F-b	
<i>R. toruloides</i> AS 2. 1389	6,9	42	28	96	5,8	Glicose	F	(Li et al., 2005)
	7,2	26,8	28	96	5,8	Xilose	F	
	4,8	16,8	28	96	5,8	L-arabinose	F	
<i>R. toruloides</i> Y4	127,4	61,8	30	140	5,6	Glicose	F F-b	(Zhao et al., 2010)
<i>Rodotorula glutinis</i> IIP-30	22,3	66	30	120	4	Glicose	F	(Jacob, 1992)
<i>R. glutinis</i> AS 2. 703	5	30,2	28	96	5,8	Glicose	F	(Li et al., 2005)
	6,9	12	28	96	5,8	Xilose	F	
	4,3	4,9	28	96	5,8	L-arabinose	F	
<i>R. minuta</i> IIP-33	15	48	30	80	4,5	Glicose	F F-b	(Saxena, 2008)
<i>Trichosporon cutaneum</i>	3,2	65,6	28	96	5,8	Glicose	f	(Li et al., 2005)

f: frasco agitado, F: Fermentador, F-b: batelada alimentada

Conforme podemos verificar nos estudos listados na Tabela 2, a produção de lipídeos por leveduras oleaginosas foi estudada em processos de batelada, batelada alimentada e contínuos (Papanikolaou and Aggelis, 2011b). Os dois últimos processos parecem ser os mais apropriados para maximizar a produção de lipídeos já que é possível ajustar a relação C/N para obter inicialmente alta concentração celular e depois estimar a produção de lipídeos (Garzón, 2009).

Estudos anteriores realizados em nosso laboratório indicam que a levedura *L. starkeyi* DSM 70296 apresenta boa capacidade de assimilação de xilose, velocidade específica de crescimento (0.087 h^{-1}) e bom teor de lipídeos (20-30%) (Garzón, 2009). Outras pesquisas feitas com a mesma linhagem também demonstraram o potencial dessa levedura, uma vez que, quando cultivada em determinadas condições de cultura, sua capacidade de acumular lipídeo poderia superar 70% de lipídeo em relação a sua biomassa (Ratledge, 1991, Li et al., 2008, Ageitos et al., 2011).

II.4. Composição dos ácidos graxos nas principais leveduras oleaginosas

Os principais ácidos graxos produzidos por leveduras são o ácido mirístico (cadeias contendo 14 carbonos e nenhuma insaturação, C14:0), palmítico (cadeias contendo 16 carbonos e nenhuma insaturação, C16:0), esteárico (cadeias contendo 18 carbonos e nenhuma insaturação, C18:0), oléico (cadeias contendo 18 carbonos com 1 insaturação, C18:1), linoléico (cadeias contendo 18 carbonos, com 2 insaturações, C18:2) e linolênico (cadeias contendo 18 carbonos, com 3 insaturações, C18:3) (Li et al., 2007, Liu and Zhao, 2007). Estudos realizados com as seguintes leveduras mostraram as seguintes composições de ácidos graxos nos lipídeos produzidos:

Cryptococcus curvatus: esta levedura pode crescer em glicerol como fonte de carbono, atingindo concentração celular de 118 g/L, e acúmulo de lipídeo em torno de 69%, com composição típica de lipídeos: ácido palmítico (C16:0) = 28%; ácido esteárico (C18:0) = 15% e ácido oléico (C18:1) = 48% (Iassonova et al., 2008).

Rhodosporidium toruloides é um basidiomiceto, capaz de acumular lipídeo em até 76% de sua massa seca, e apresenta um perfil lipídico de ácido palmítico (C16:0) = 24% e ácido oléico (C18:1) = 55% (Li et al., 2008).

Yarrowia lipolytica tem um perfil de lipídeos de C16:0 = 11%, C18:0 = 28% e C18:2 = 51% (Beopoulos et al., 2008). Sua produção de ácidos poliinsaturados do tipo C22:6 (ácido docosahexanóico) pode ser alcançado através de manipulação genética (Beopoulos et al., 2008).

Lipomyces starkeyi: sua fração lipídica é composta principalmente por ácido láurico (C12:0), palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oléico (C18:1) e linoléico (C18:2). Destes, os ácidos palmítico e oléico são os mais abundantes. Considerando os componentes saturados e insaturados, cerca de 30 a 45% correspondem a ácidos graxos saturados, e 50-55% são insaturados (Pruvost et al. 2009).

Em estudo do perfil lipídico de *L. starkeyi* (Tabela 3), Angerbauer et. al. (2008) demonstraram que o perfil de ácidos graxos desta espécie sofre alterações ao longo da fermentação: enquanto as frações de ácido palmítico (C16:0) e oléico (C18:1) aumentam, as frações de ácido esteárico (C18:0) e linoléico (C18:2) reduzem com o tempo. A fração de ácido palmitoléico (C16:1) permaneceu inalterada.

Tabela 3. Composição dos ácidos graxos de *L. starkeyi* cultivada em diferentes fontes de carbono

Fonte de carbono	Ácido palmítico C16:0	Ácido palmitoléico C16:1	Ácido esteárico C18:0	Ácido oléico C18:1	Ácido linoléico C18:2	Referência
Fécula de batata	39,0	3,0	3,0	55,0	n.d.	(Wild et al., 2010)
Lodo	55,9	1,8	13,8	25,8	0,1	(Angerbauer et al., 2008)
Glicose	33,0	4,8	4,7	55,1	1,6	(Li et al., 2007)
Xilose	20,4	n.d.	10,8	56,1	12,0	(Garzón, 2009)

Se observarmos a composição de ácidos graxos de alguns óleos vegetais (Tabela 4), podemos notar que o lipídeo produzido pela levedura *L. starkeyi* parece ser bastante semelhante aos óleos vegetais, principalmente ao óleo de palma. Como resultado, a qualidade do biodiesel produzindo a partir de *L. starkeyi* deve ser semelhante ao que é produzido a partir de óleo de palma (Angerbauer et al., 2008)

Tabela 4. Perfil de ácidos graxos de alguns lipídeos vegetais. Adaptado de Ma and Hanna, 1999.

Substrato	Ácido palmítico C16:0	Ácido esteárico C18:0	Acido Oléico C18:1	Acido linoléico C18:2	Acido linolénico C18:3
Óleo de Palma	30,00	2,00	45,00	11,00	2,00
Óleo de Milho	11,67	1,85	25,16	60,6	0,48
Óleo de Soja	11,75	3,15	23,26	55,53	6,31
Óleo de Girassol	6,08	3,26	16,93	73,73	n.d.

Apesar do potencial de uso das leveduras oleaginosas para a produção de lipídeos em escala industrial, são necessárias medidas que aumentem a produtividade das cepas padrões para tornar o processo economicamente viável. Entre as medidas mais comuns para incrementar o rendimento do processo de bioconversão de interesse, estão o melhoramento genético (Meng et al., 2009) e a otimização das condições ambientais de produção (nutrientes, aeração, pH e temperatura) (Papanikolaou and Aggelis, 2011b).

No caso de microrganismos, os esforços de melhoramento genético repousam sobre duas principais metodologias: a engenharia genética convencional e, no caso de linhagens de difícil manipulação de DNA, a mutagênese aleatória.

II. 5. Melhoramento genético por mutagênese aleatória.

A mutação aleatória é uma técnica muito empregada para o melhoramento genético de linhagens com interesse industrial; na realidade, poucas indústrias utilizam cepas selvagens em seus processos de produção (Contado, 1998). A modificação do material genético pode ser feita de duas formas: através da ação de agentes

mutagênicos ou da produção de DNA recombinante. A mutagênese de um microrganismo permite a criação de genótipos diferentes da célula original através da alteração aleatória dos genes (Contado, 1998).

As técnicas genéticas disponíveis hoje permitem modificar o perfil genético de um microrganismo para que ele possa ser utilizado mais eficientemente, ou ainda, para fabricar determinados produtos que não poderiam ser obtidos a partir de seu metabolismo original. Produção de enzimas, antibióticos, proteínas, aminoácidos, lipídeos, entre outros, servem para ilustrar as enormes potencialidades do melhoramento genético como ferramentas valiosas na indústria das fermentações (Contado, 1998).

Os problemas principais da mutagênese aleatória são: avaliação da dose ótima do agente mutagênico a ser usado e a manutenção da viabilidade deste novo material biológico. O desejável é que a mutação resulte somente em aumento da produção do metabólito desejado sem alterar as características gerais do microrganismo (Ball, 1985).

A estratégia de mutagênese aleatória para obtenção de ganho de produtividade foi reportada por Wang e colegas (2009), em estudo utilizando a levedura *Rhodotorula glutinis* AY 91015. A levedura foi irradiada com íons de carbono visando a obtenção de mutantes apresentando maior acúmulo de lipídeos. Os autores reportam a identificação de um aumento de quase duas vezes na fração lipídica dos mutantes em relação à cepa padrão.

Da mesma forma, He e colegas (He et al., 2012) estudaram a levedura *Rhodotorula glutinis* aplicando a irradiação UV para obter uma cepa mutante com alto rendimento de lipídeos, isolando 29 mutantes para estudo detalhado. Os resultados revelaram 5 cepas apresentando aumento na produtividade de biomassa e lipídeo em relação à cepa padrão.

II. 5.1. Mutação de DNA

A informação genética dos microrganismos depende da ordem precisa dos nucleotídeos presentes no DNA e essa ordem não deve ser alterada significativamente para uma adequada manutenção da estabilidade genética. No entanto, muitas vezes

ocorrem mudanças no código genético, gerando fenótipos variados e que acabam contribuindo para o processo evolutivo (Keller et al., 2004).

A mutação em microrganismos é de extrema importância para a pesquisa, pois permite a obtenção de cepas com características diversas daquelas apresentadas pelas cepas padrões. As mutações acarretam mudanças na bioquímica da célula, sendo que as de maior impacto são aquelas que culminam na inativação da expressão de uma enzima importante à determinada via, promovendo profundas alterações no metabolismo celular.

As mutações podem envolver um cromossomo inteiro ou parte dele, constituindo uma mutação cromossomal, ou podem ocorrer de forma pontual, envolvendo alterações mínimas na composição dos ácidos nucleicos (Contado, 1998). Pode-se gerar mutações espontaneamente e por indução. As mutações espontâneas são aquelas geradas aleatoriamente na natureza e que acabam sendo selecionadas pelas pressões ambientais. Todos os organismos sofrem mutações espontâneas devido a agentes físicos e químicos presentes no ambiente em que as células se encontram. As mutações podem ocorrer também devidas a erros de reparos do DNA após a replicação (Contado, 1998). A mutação induzida é aquela onde se emprega um agente mutagênico, em doses que aumentam as taxas de mutação.

Através da combinação desses dois fatores, espontâneo e induzido, pode-se fazer uma mutação dirigida no microrganismo (Menezes 1989). Um dos agentes físicos que provocam mutações é a radiação, a qual pode ser de duas formas: ionizante e excitante ou não ionizante.

A radiação ionizante consiste nos raios-x alfa, beta e gama. A taxa de mutação é geralmente proporcional à dosagem de radiação (Griffiths et al., 2004). Já a radiação não ionizante consiste no aumento do nível de energia do átomo, tornando-o menos estável. Um exemplo é a radiação ultravioleta (Keller et al., 2004, Wang et al., 2009)

II. 5.2. Efeito mutagênico da irradiação por luz ultravioleta

A radiação ultravioleta cobre uma região do espectro eletromagnético situada entre 100 nm e 400 nm. Esta faixa é particularmente indicada para a inativação de microrganismos, uma vez que a energia associada pode atingir importantes agrupamentos bioquímicos, provocando danos irreversíveis e incompatíveis com a sobrevivência. Em 260 nm, seu efeito germicida alcança eficiência máxima, atuando principalmente na dimerização de bases nitrogenadas nos ácidos desoxirribonucléicos (DNA) e ribonucléicos (RNA) (Pigatto, 2008).

A luz ultravioleta (UV) induz mutações nos quadros de leitura do DNA pela substituição de pares de bases. Nucleotídeos e seus constituintes, como purinas e pirimidinas, sofrem reações envolvendo a alteração espontânea da sua estrutura covalente. Essas reações apresentam velocidades geralmente lentas, porém são fisiologicamente significantes por acumularem alterações na informação genética, podendo ser transmitidas à geração seguinte (Nelson and Cox, 2002)

Quando as bases são mutadas, a formação de ligações de hidrogênio no filamento oposto é prejudicada. A transcrição do DNA e a replicação são, em consequência, afetadas, comprometendo a função celular e, frequentemente, conduzindo à morte celular (Pigatto, 2008). Assim, a luz ultravioleta é utilizada amplamente como agente antimicrobiano, incluindo a desinfecção de água, ar e de superfícies de preparo alimentício (Miller et al., 1999, Da Silva, 2007).

No campo do melhoramento genético, a luz ultravioleta é capaz de gerar cepas apresentando melhor desempenho industrial do que as células parentais não-mutagenizadas dependendo da forma de seleção das células sobreviventes após a exposição ao agente mutagênico.

II. 5.3. Sobrevivência e seleção de mutantes

A utilização de agentes mutagênicos pode servir como atalho interessante para o melhoramento genético das cepas padrões. De modo geral, as mutações são em sua maioria deletérias e não aumentam o rendimento biossintético das células. Porém, há

uma minoria de indivíduos que apresentam uma produtividade muito maior que a cepa padrão. Essas células favorecidas devem ser separadas das demais por métodos específicos de seleção de mutantes (Ball, 1985).

Tais métodos são normalmente baseados no cultivo na presença ou ausência de compostos que permitam identificar o fenótipo de interesse como, por exemplo, o aumento na biossíntese de determinado produto (Contado, 1998)

Aguilar e Rodriguez (1996) e Pigato (2008) observaram o efeito da irradiação provocada por luz ultravioleta durante 60 segundos no microrganismo *Xantomonas campestris pv. campestris*. Os resultados obtidos apresentaram queda drástica no número de colônias. De 14.000 colônias originais, sobreviveram apenas 42 após a irradiação, indicando uma morte celular de 99,7%. Os mutantes sobreviventes apresentaram diferenças significativas em relação ao microrganismo não irradiado (Ball, 1985).

O processo de seleção de mutantes é muito semelhante ao isolamento de microrganismos do meio ambiente. Muitas vezes o tipo de mutação ocorrida possibilita a visualização direta da característica como, por exemplo, nas mutações ocorridas na morfologia, que podem ser diferenciadas através de uma simples observação das células ou do tipo de colônia. A detecção de mutantes auxotróficos pode ser feita pela observação de ausência de crescimento em meio mínimo, mas ocorre o crescimento em meio complementado (Ball, 1985, Contado, 1998).

Entretanto, formas mais elaboradas para a seleção de mutantes devem ser aplicadas para a identificação de efeitos fenotípicos que não necessariamente alteram a morfologia das células e/ou colônias como, por exemplo, alterações em processos intracelulares. Neste caso, a seleção requer avaliações indiretas, como a habilidade em consumir e/ou crescer na presença de determinados suplementos nutricionais, inibidores do crescimento, indutores de respostas, além de métodos para estimar a produção de metabólitos, como testes de alteração do pH do meio, formação de halos de inibição, conversão de marcadores colorimétricos, entre outros (Wang et al., 2009, Azevedo, 1998).

II.5.4. Seleção de mutantes pela cerulenina

A seleção de mutantes normalmente se baseia no cultivo em uma condição que induza algum tipo de estresse à cepa microbiana (p. exemplo, deficiências nutricionais, resistência a antibióticos, presença de inibidores metabólicos, etc); assim, os mutantes contendo alterações de interesse são identificados através de maior/menor tolerância a estes estresses (Contado, 1998). No contexto do nosso estudo, que visa a seleção de mutantes apresentando maior capacidade de acumular lipídeos, um composto interessante é a cerulenina.

A cerulenina ou (2*R*, 3*S*) –2,3 epoxi-1-oxo-7, 10 trans, transdodecadienamida é um produto natural do fungo *Cephalosporium caerulens* (Guo et al., 2003). Foi descoberta por Hata e colegas (1960) tendo sido originalmente descrita por suas propriedades antifúngicas. Estudos sobre o seu modo de ação revelaram que inibe especificamente a biossíntese dos ácidos graxos e esteróis (Cronan Jr, 1975, Satoshi, 1976), o que rapidamente ampliou seu emprego em pesquisas de diversas áreas da bioquímica como inibidor da atividade da enzima ácido graxo sintase (FAS, do inglês *fatty acid synthase*), responsável pela síntese de lipídeos através da condensação dos substratos acetil-CoA e malonil-CoA (Kuhajda, 2000, Guo et al., 2003).

A cerulenina foi amplamente utilizada em estudos de metabolismo e da síntese dos ácidos graxos nas bactérias e leveduras (Satoshi, 1976). Pesquisas mostram a capacidade inibitória desta substância nos microrganismos, permitindo a formulação de um meio seletivo capaz de evidenciar mutantes com maior potencial de síntese de ácidos graxos (Wang et al., 2009).

Estudo realizado por Wang e colegas (2009) utilizando a levedura *Rhodotorula glutinis* AY91015 e o método de mutagenização aleatória por radiação ionizante (íons de carbono de 80 MeV/u), foi conseguida melhora em relação à produção de lipídeos. A cepa padrão e o mutante M16 apresentaram 24,57 e 42,38 % de lipídeo em massa seca, visualizando claramente uma diferença de 17% entre ambas as cepas.

A lógica desta estratégia reside no fato de que a síntese de lipídeos é um metabolismo essencial ao crescimento celular, uma vez que está envolvido com a

síntese de membranas celulares. Assim, a presença da cerulenina determina uma inibição no crescimento das células, desencadeando um efeito morfológico de fácil identificação: uma nítida redução do diâmetro das colônias nas placas de cultura. Assim, a ocorrência de colônias de tamanho maior dentre os mutantes sugere que estes possuem alterações na síntese de lipídeos, o que pode significar uma maior eficiência deste metabolismo nestas células.

JUSTIFICATIVA

Diante da crescente busca por reduzir a dependência energética mundial dos derivados fósseis e sua substituição por alternativas limpas, renováveis e economicamente viáveis, muitos estudos tem sido conduzidos na tentativa de desenvolver metodologias e processos para a obtenção de biocombustíveis a partir de biomassa, incluindo o desenvolvimento de novas rotas para sua transformação em energia.

Entre as fontes de biomassa para uso em substituição parcial das fontes fósseis, as de origem vegetal sobressaem-se uma vez que são abundantes e permitem equilibrar o balanço de emissão de carbono. Entretanto, ao se utilizar partes nobres dos vegetais como fonte de biomassa para abastecer o setor energético, concorre-se com outros setores fundamentais à atividade humana, como a indústria têxtil e alimentícia.

Assim, existe uma enorme demanda por desenvolver processos capazes de utilizar não as partes nobres, mas sim os resíduos vegetais provenientes destes outros setores, como palhas e bagaços. Porém, a dificuldade de se estabelecer um processo viável reside no fato de que resíduos vegetais são compostos lignocelulósicos altamente complexos e heterogêneos, necessitando serem convertidos em material mais simples e homogêneo antes de sua utilização na produção de biocombustíveis.

A bioconversão de biomassa vegetal através da ação de microrganismos se sobressai como uma grande alternativa, uma vez que também constitui um processo limpo e renovável. Assim, existe um grande interesse em identificar linhagens microbianas capazes de fermentar o complexo material lignocelulósico e produzir moléculas de interesse ao setor energético, como etanol e óleo.

Neste contexto, são fundamentais os estudos visando desenvolver metodologias para o melhoramento genético de microrganismos, uma vez que, mesmo após identificar cepas capazes de realizar naturalmente o processo de interesse, é importante adequá-las à escala deste processo pela indústria, incluindo ajustes em sua produtividade.

Assim, dado o potencial de uso da levedura *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 para uso na conversão de carboidratos derivados da biomassa vegetal em lipídeos para a

produção de biodiesel, este trabalho teve por objetivo aplicar método de melhoramento genético visando o aumento dos parâmetros associados com sua produtividade. Para isto utilizamos mutagênese aleatória por luz ultravioleta, seleção de mutantes por cerulenina e ensaios em frascos agitados e biorreator utilizando meio de cultura com composição semelhante à obtida em resíduos lignocelulósicos.

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.1. Microrganismo

Neste estudo foi utilizado *L. starkeyi* DSM 70296. O mesmo foi preservado em placas de meio de cultura sólido a 4°C até seu uso. Os repiques foram feitos a cada dois meses.

III.1.1. Meios de cultura

Os microrganismos foram cultivados em meio de cultura líquidos contendo xilose (X) como única fonte de carbono, foram utilizados meios de adaptação (AM) e meios de seleção (SM) respectivamente. Foram cultivados em meio cuja composição foi definida a fim de garantir uma relação mássica de C/N = 50. No cálculo de relação C/N foi incluso o aporte do nitrogênio orgânico proveniente do extrato de levedura.

A solução de xilose foi esterilizada em autoclave separadamente dos demais nutrientes para evitar degradação e escurecimento, e adicionada assepticamente ao meio com os demais reagentes no fluxo laminar. A composição dos três meios está descrita na Tabela 5.

Tabela 5. Composição do meio de cultura da levedura *L. starkeyi* DSM 70296 para o seguinte estudo.

Composição	YPX (g/L)	XAM (g/L)	XSM (g/L)
Xilose	10	20	30
Extrato de levedura	3	2	1
Peptona	5	-	-
Sulfato de amônio ((NH ₄) ₂ SO ₄)	-	1	0,7
Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄)	-	3,5	3,5
Fosfato de sódio dibásico (Na ₂ HPO ₄)	-	1	1
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ . 7H ₂ O)	-	1,5	0,4
Cloreto de cálcio (CaCl ₂ . 6H ₂ O)	-	0,2	0,2
Sulfato de zinco (ZnSO ₄ .7H ₂ O)	-	-	0,008
Sulfato de cobre (CuSO ₂ .6H ₂ O)	-	-	0,001
Cloreto de cobalto (CoCl ₂ .6 H ₂ O)	-	-	0,001
Molibdato de amônio ((NH ₄) ₂ . Mg ₂ O ₇ . 4 H ₂ O) -	-	-	0,001
Sulfato de manganês (MnSO ₄ . H ₂ O)	-	-	0,005

Para a seleção de mutantes, o meio foi adicionado com 20g/L de agar e suplementado por cerulenina (Sigma Aldrich) em uma dosagem de 10µg/µL, conforme descrito por (Wang et al., 2009).

Os reagentes utilizados no preparo dos meios foram de grau P.A. Os meios foram esterilizados em autoclave a 121°C durante 20 min.

III.1.2. Preparo de pré-inóculo

O pré-inóculo foi preparado em frascos Erlenmeyer de 250 mL, usando 1/5 do volume total. A partir da cultura armazenada a 4 °C, uma alça de massa celular foi transferida assepticamente a 30 mL de meio de cultura. Os frascos foram mantidos em incubadora orbital a 150 rpm, 28°C, até atingir absorvância de 0,1 a 600 nm (aproximadamente 48 horas), conforme leitura em leitora de placas (Multilabel Plate Reader VICTOR X4).

III.1.3. Preparação de inóculo

O preparo do inóculo foi realizado em frascos Erlenmeyer de 250 mL de volume total, sendo 50 mL o volume total e trabalho para a fermentação em frascos agitados e frascos Erlenmeyer de 500 mL de volume total, contendo 250 mL de meio para a fermentação em biorreator.

Os frascos foram incubados em agitador orbital a 28°C e 150 rpm de agitação. Os frascos foram cultivados até atingir leituras no espectrofotometro de 0.4-0.6 numa diluição de 10x. Após atingir a absorvância desejada, o meio de inóculo foi trasferido ao meio de fermentação em frascos agitados e/ou dorna de fermetação.

III.1.4. Preparo do meio de fermentação

O meio de fermentação foi preparado contendo: 60g/L de glicose+xilose (70%+30%); extrato de levedura 1,92 g/L; sulfato de amônio 1,36g/L; fosfato de potássio monobásico 3,5 g/L; fosfato de sódio dibásico 1 g/L; sulfato de magnésio 0,4 g/L; cloreto de cálcio 0,04 g/L; 0,08 g/L sulfato de zinco, 0,001 g/L sulfato de cobre, 0,001 g/L cloreto

de cobalto, 0,001 g/L molibdato de amônio, 0,005 g/L sulfato de manganês. O cultivo foi feito com relação de C/N=50 conforme anteriormente definido por Garzón (2009).

No preparo dos meios (pré-inóculo, inóculo e fermentação), as soluções de açúcares foram esterilizadas separadamente dos demais reagentes, para evitar a caramelização e a reação de Maillard do carboidrato. Todos os reagentes utilizados foram de grau P.A. O pH dos meios foi ajustado para 5.5 através da adição de HCL (2M). Todos os meios foram esterilizados em autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

III. 2. Mutagênese aleatória

III.2.1 Irradiação UV

Para a irradiação UV foi utilizada uma caixa escura de 51 cm x 22 cm x 24,5 cm (comprimento x largura x altura), contendo duas lâmpadas UV (15W/cada), posicionadas na parte interna superior da caixa. A energia emitida foi estimada em $27 \text{ mJ}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. (Figura 2)



Figura 2. Caixa de luz UV utilizada para a mutagênese. **Esquerdo:** posição da caixa dentro do fluxo laminar. **Direito:** posição das lâmpadas UV.

No fluxo laminar 30 mL de inóculo foi transferido para uma placa de Petri estéril, na concentração celular de 1.55×10^7 células/mL. A placa foi posicionada dentro da caixa a uma distancia de 22.5 cm de altura das lâmpadas de UV e submetida à irradiação nos tempos de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 min. Em todos os tempos, a cada 10 min, a placa contendo o meio irradiado foi agitada manualmente para promover a homogeneização da cultura. Para o ensaio de dose-resposta, alíquotas de 1 mL foram retiradas nos

tempos indicados anteriormente, e uma alíquota de 1mL não irradiada (tempo zero) foi utilizada como controle (CT). Para os demais ensaios de mutagênese, apenas o período de tempo em que foi obtida uma taxa de sobrevivência na faixa de 1-5% foi utilizado para a irradiação.

O experimento de mutagênese por luz UV foi feito de acordo com esquema da Figura 3. O número total de células do inóculo com 48 horas de crescimento foi determinado por contagem em câmara de Neubauer e o crescimento celular determinado pela absorbância a 600nm, garantindo que a cultura estivesse na fase logarítmica.

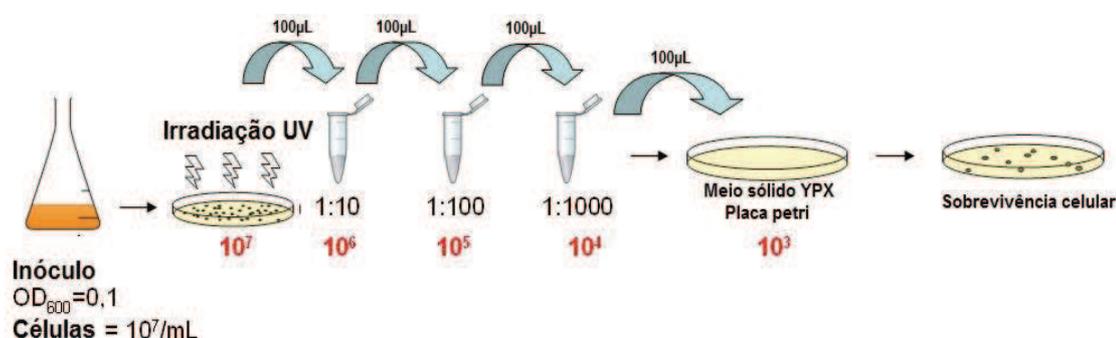


Figura 3. Representação esquemática do experimento de exposição UV para a determinação da sobrevivência celular

III.2.1. Seleção dos microrganismos irradiados

As alíquotas da cultura irradiada foram plaqueadas em meio sólido (YPX) para o ensaio de dose-resposta, e em meio sólido YPX suplementado por cerulenina para a seleção dos mutantes. Previamente ao plaqueamento, as alíquotas foram diluídas (diluição seriada de 1000x), de forma a facilitar a contagem de colônias. Para o ensaio dose-resposta, o plaqueamento foi feito em 3 placas para cada tempo. Para os demais experimentos de mutagênese, foram preparadas cerca de 10-15 placas para cada ensaio, para permitir uma ampla seleção de mutantes.

As placas foram incubadas em estufa a 28 °C durante tempo suficiente para detectar o crescimento de colônias. No experimento dose-resposta, as colônias foram contadas para permitir identificar a fração de sobrevivência. Nos experimentos para

seleção de mutantes, as colônias foram isoladas quanto ao diâmetro, e este comparado com o diâmetro das colônias na placa controle.

III.3. Fermentação em frascos agitados dos mutantes selecionados

Após a mutagênese e seleção de mutantes, os mesmos foram fermentados em frascos agitados para avaliação mais cuidadosa de crescimento e consumo de nutrientes (açúcar e nitrogênio), em triplicata. A Figura 4 mostra o esquema do desenho experimental.

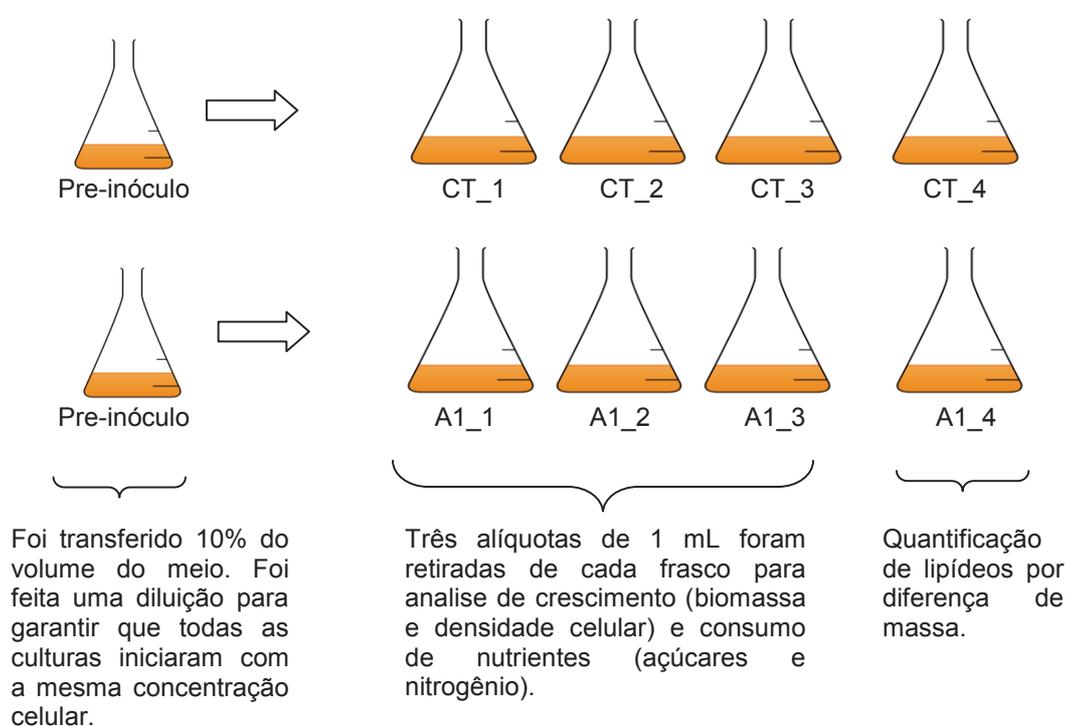


Figura 4. Representação esquemática do experimento de fermentação dos mutantes em frascos agitados.

III.3.1. Condições de cultivo

As condições de fermentação foram agitação de 150 rpm, 28 °C, volume de cultivo 50 mL em frascos de 250 mL. Amostras foram coletadas periodicamente para determinação de biomassa, concentração celular, acúmulo de lipídeos e consumo de nutrientes (açúcar e nitrogênio).

Para iniciar a fermentação, a cepa padrão e os mutantes foram inoculados frascos erlenmeyer de 250mL contendo 50 mL de meios YPX, a 150 rpm e 28 °C. O perfil de crescimento foi acompanhado de leituras a 600nm e contagem de células, de forma a estimar o número de células a serem transferidas para o meio de inóculo. Após 48 horas do início do cultivo de pré-inóculo, 10 % do volume do meio de todas as amostras foram transferidas para frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de seleção xilose-XSM (relação C/N=50)

III.4. Fermentação da cepa mutante A1 e *L. starkeyi* DSM 70296 em biorreator

Para aprofundar o estudo do desempenho fermentativo do mutante A1 selecionado nos experimentos realizados em frascos agitados, foram realizados experimentos em batelada alimentada em biorreator Sartorius com 2 L de volume de trabalho.

Para permitir a avaliação do desempenho do mutante em relação à cepa padrão, ambos foram estudados nas mesmas condições de fermentação. A partir do inóculo, foi introduzida na dorna uma massa celular suficiente para uma concentração inicial de 3 g/L no início da fermentação.

III.4.1. Condições de fermentação

Foram feitas quatro fermentações, sendo duas utilizando a cepa mutante A1 (duplicatas M1 e M2) e duas como a cepa padrão *L. starkeyi* DSM 70296 (duplicatas S1 e S2). As condições adotadas para cada uma destas fermentações foram idênticas e seguiram os procedimentos detalhados abaixo.

As condições no processo foram: 400 rpm (com duas turbinas Rushton) e 1 v.v.m (volume de ar por volume de meio por minuto), pH 5.5 ajustado por adição de NaOH (2M). A fermentação totalizou 143 horas. Amostras foram coletadas regularmente para determinação de biomassa, concentração celular, acúmulo de lipídio e consumo de nutrientes (açúcar e nitrogênio). O volume inicial da fermentação foi de 1,2 L.

Foram feitos três pulsos de alimentação com soluções contendo glicose/xilose na proporção (30%:70%) e uma solução contendo nitrogênio e micronutrientes. As alimentações com ambas as soluções foram feitas quando o nível de açúcar alcançou

cerca de 5g/L, conforme identificado por reação de Somogy-Nelson. Em todas as alimentações, as soluções foram acrescentadas em proporções suficientes para manter uma relação de C/N=50, para favorecer o acúmulo de lipídeos pelas células.

As fermentações com o mutante A1 e a cepa padrão foram feitas em duplicata (M1 e M2 para o mutante; S1 e S2 para a cepa padrão).

III. 5. Metodologia analítica para estudos em frascos agitados e biorreator

III. 5.1. Determinação indireta de biomassa

Para avaliar a curva de crescimento dos microrganismos, a biomassa foi avaliada por leituras de absorbância a 600 nm numa faixa de 0.1 a 0.6 utilizando leitora de placas (Multilabel Plate Reader VICTOR X4). Uma curva padrão foi construída utilizando concentrações conhecidas de biomassa. Todas as leituras de absorbância foram realizadas em triplicata.

III.5.2. Determinação de biomassa seca

Para a determinação de biomassa seca alíquotas de 3 mL foram coletas em tubos falcon de 10mL, lavadas com água destilada, centrifugada e congelada a -80°C por 24 horas e seca por liofilização a uma temperatura média de -34°C, pressão de vácuo de 50 µm de Hg durante 24 horas.

III.5.3. Consumo de carboidratos

Durante a fermentação, a concentração de açúcar foi acompanhada pelo método colorimétrico de Somogy-Nelson (Nelson, 1944, Somogyi, 1945). Amostras foram coletadas periodicamente, as quais foram filtradas e estocadas no freezer para posterior análise de consumo de açúcar por cromatografia de íons em um sistema Metrohm (coluna: poliestireno/divinilbenzeno; eluente: NaOH 0,1mM/L; vazão: 1mL/min; temperatura do detector: 30°C).

III.5.4. Produção de lipídeos

A extração de lipídeos foi baseada no método gravimétrico de Bligh & Dyer, (1959) modificado por Manirakiza e colaboradores (Manirakiza et al., 2001), por extração

dos lipídeos polares e não-polares da biomassa liofilizada utilizando a mistura de metanol e clorofórmio.

A extração foi realizada a partir de 300 mg de biomassa liofilizada, adicionada de 6 mL de uma solução metanol:clorofórmio (2:1 v/v). A suspensão foi homogeneizada em agitador vórtex por 2 minutos. A seguir, foram adicionados 2 mL de clorofórmio e agitado por 2 minutos. Para gerar um sistema de duas fases líquidas, 3,6 mL de água foram adicionados e o sistema foi agitado novamente por 2 minutos. As fases foram separadas por centrifugação por 10 minutos a 2000 rpm. A fase inferior foi transferida a um balão de 25 mL usando seringa ou pipeta Pasteur. Uma segunda extração foi realizada utilizando 4 mL de uma solução 10% (v/v) de metanol em clorofórmio em agitador vórtex por 2 minutos. Após centrifugação, a fase de clorofórmio foi adicionada ao primeiro extrato. O clorofórmio foi evaporado em rota-evaporador e a amostra então foi mantida em estufa a 60 °C por 24 horas. O lipídeo obtido foi estimado gravimetricamente. O ensaio foi realizado em triplicata.

III. 5.5. Consumo de nitrogênio

O consumo de nitrogênio durante a fermentação foi determinado pela reação de Berthelot, de acordo com o descrito por Srienc e colaboradores (Srienc et al., 1984). Neste método, 50 µL de amostra previamente diluída em água deionizada foi misturada com 1 mL de solução A (10 g/L fenol, 10 mg/L nitroprussiato de sódio) e 1 mL de solução B (35.7 g/L Na₂HPO₄, 6 g/L NaOH e 10 mg/L NaOCl). Esta solução foi incubada por 30 minutos a 37 °C, e a absorbância lida a 630nm na leitora de placas (Multilabel Plate Reader VICTOR X4). A curva padrão foi preparada utilizando soluções com diferentes concentrações de sulfato de amônio (0-20 mg/L).

III. 5.6. Contagem de células e morte celular

A concentração de células foi determinada durante a fermentação por contagem em câmara de Neubauer. A proporção entre células vivas e mortas foi determinada pelo uso do corante azul de metileno (0,0025% p/v).

III. 5.7. Perfil de Ácidos graxos

Para determinar a composição de ácidos graxos foi feita transesterificação direta da biomassa liofilizada (Lewis et al., 2000), seguida de análise por cromatografia gasosa. Vinte miligramas de biomassa liofilizada foram transferidas para tubo contendo 3 mL de uma solução de metanol/ácido clorídrico/clorofórmio (10;10:1, em volume) e incubados a 90 °C durante 1 hora. Os ésteres produzidos foram extraídos três vezes utilizando 2 mL de uma solução de hexano/clorofórmio (4:1, v/v) e 1 mL de água. A solução foi centrifugada a 4500 rpm por 10 minutos para completa separação das fases. A fase leve (hexano contendo ésteres metílicos) foi separada, seca sobre sulfato de sódio anidro e filtrada com membranas de 0.45 µm. As amostras foram mantidas a -20 °C até injeção no cromatógrafo.

A análise cromatográfica foi feita utilizando um sistema (Varian Star 3600 CX) com detector de ionização de chama (FID) e coluna DB-23, 30m x 0.53 mm da J&W Scientific. Como fase móvel usou-se Hélio (15 psi, split 1/100) com temperaturas no injetor e no detector de 250 °C e 300 °C. A programação da rampa de temperatura para a coluna foi: temperatura inicial de 50 °C durante 2 min gradiente de 10 °C/min até 180 °C com um tempo de espera de 5 min, gradiente de 5 °C/min até atingir temperatura final de 240 °C. O tempo total da corrida foi de 32 minutos. O volume de injeção foi de 1 µL. A identificação dos ésteres metílicos foi feita mediante comparação do tempo de retenção com padrões previamente injetados (Supelco 37 FAME mix). A quantificação foi feita mediante a técnica do padrão externo.

Foi usado o Software Statistic 7.0 para a análise estatística. Para o comparativo das médias foi utilizado o Teste de Tukey com 95 % de significância. O programa empregado para a análise e obtenção de gráficos foi OriginPro 8.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1. Mutagênese aleatória

IV.1.1. Irradiação UV

Nesta seção descreve-se a mutagênese aleatória utilizando irradiação ultravioleta. Resumidamente, foi empregada uma caixa contendo duas lâmpadas UV em condição asséptica em fluxo laminar. Uma placa de Petri estéril de vidro contendo o inóculo com concentração celular de 1.55×10^7 células/mL foi irradiada nos tempos 10, 20, 30, 40, 50 e 60 min. A placa foi agitada manualmente em intervalos de 10 min para homogeneização das células.

Nos tempos indicados, alíquotas foram retiradas para acompanhamento da sobrevivência celular. Uma alíquota foi retirada antes do início da irradiação e definida como a amostra controle. Com este experimento foi possível construir uma curva de dose-resposta, de forma a estabelecer o tempo ótimo de irradiação para obter fração de sobrevivência entre 1-5%.

Após definido o tempo ideal de irradiação, os mutantes foram selecionados através da suplementação das placas com um inibidor da síntese de ácidos graxos, a cerulenina. A seleção dos mutantes baseou-se no diâmetro das colônias, de acordo com a premissa descrita na seção III. 2.1.

Após a exposição à radiação UV, as alíquotas retiradas nos períodos de 0 (controle), 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos foram diluídas seriadamente para que fossem plaqueadas 10^3 células por placa. A sobrevivência celular foi determinada por contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) formadas após a incubação a 28 °C. O experimento foi realizado em duplicata, a Figura 5 ilustra os resultados.

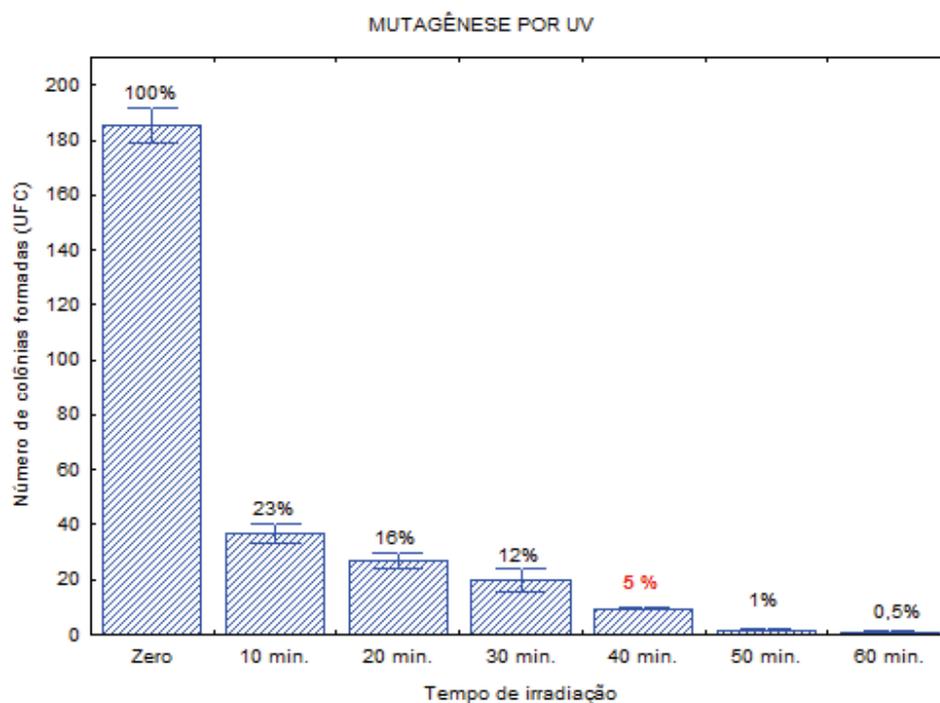


Figura 5. Unidades de colônias formadas (UFC) após a exposição UV.

Na Figura 5 mostra que houve aumento da morte celular de acordo com o tempo de irradiação. Assim aos 40 minutos, a fração de sobrevivência de células atingiu 5% e, aos 50 minutos, foi reduzida para aproximadamente 1%. Através dos resultados apresentados nota-se que a irradiação ultravioleta afetou a sobrevivência da levedura, pois a porcentagem de sobrevivência celular diminuiu proporcionalmente com o aumento do tempo de exposição (Keller et al., 2004).

A redução de células vivas após exposição à luz UV decorre de seu efeito mutagenizante sobre o DNA, principalmente causado pela formação de dímeros de timina e consequente efeito sobre o código genético (Wang et al., 2009). Por ocorrer aleatoriamente no genoma, muitas mutações são silenciosas e/ou não causam efeitos deletérios sobre a função celular, enquanto outras ocorrem em genes essenciais à vida.

Assim, admite-se que a fração de células sobreviventes apresenta um acúmulo de mutações não-letais mas que possivelmente determinam alterações significativas em seu metabolismo. Os agentes mutagênicos empregados muitas vezes podem ser muito drásticos, assim é importante realizar uma curva de sobrevivência de células variando as

doses de agente mutagênico (Kava - Cordeiro et al., 1995). Assim, inicialmente realizamos a padronização dos tempos de exposição à irradiação ultravioleta através do estudo de curvas de dose-resposta. Buscou-se atingir níveis de sobrevivência celular entre 1-5%, de forma a garantir um expressivo acúmulo de mutações no DNA.

Para obter um maior número e diversidade de mutantes preferiu-se utilizar as condições de obtenção de 5% de sobrevivência ao invés de 1%, para aumentar a quantidade de colônias para as etapas posteriores de seleção.

Portanto, estabeleceu-se 40 minutos de exposição, correspondente a uma sobrevivência celular de 5% para os ensaios posteriores. Nesta faixa garantimos um maior número de mutantes de forma a permitir uma boa representação de colônias para a fase de seleção de mutantes (Azevedo, 1998)

IV. 1.2. Seleção de mutantes

Após os procedimentos de mutagênese, as células foram cultivadas em meio sólido YPX suplementado por cerulenina (Wang et al., 2009). O objetivo da avaliação dos diâmetros das colônias se deve ao fato da cerulenina inibir a síntese de lipídeos e, portanto, interferir no crescimento normal das células. A ocorrência de colônias de tamanho maior dentre os mutantes sugere um efeito compensatório na síntese de lipídeos, podendo significar uma maior eficiência deste metabolismo nestas células. Neste caso, é esperada obtenção de mutantes apresentando maior produtividade de lipídeo do que a observada na cepa padrão *L. starkeyi* DSM 70296.

Após 8 dias, foram contadas as colônias formadas nas placas e selecionadas aquelas que apresentaram maior tamanho em relação às demais. A Figura 6 ilustra alguns resultados obtidos.

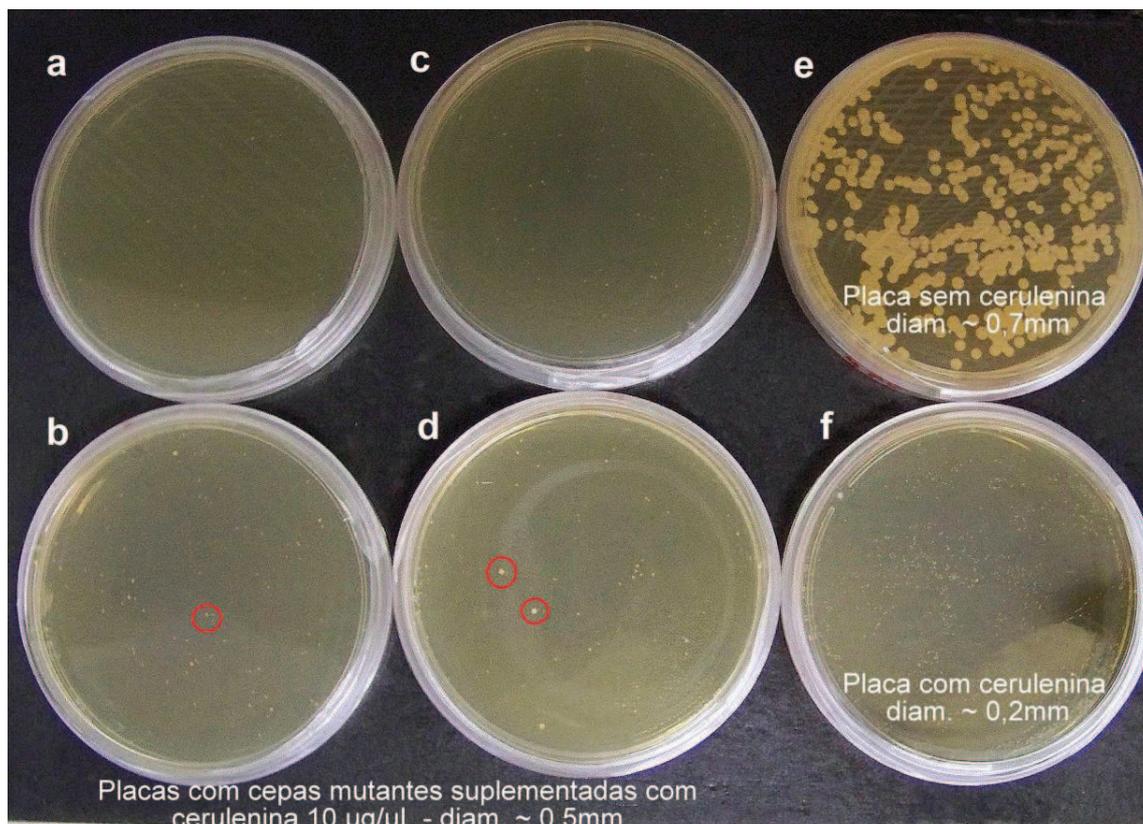


Figura 6. Seleção de cepas mutantes de *L. starkeyi* DSM 70296 submetidos a irradiação UV. Placas a, b, c, d colônias mutantes em meio de cultura suplementado com cerulenina (10µg/µL), Nos círculos vermelhos, algumas colônias mutantes com diâmetros ~0.5mm. Placa e. Controle positivo (colônias não irradiadas e plaqueadas me meio não suplementado por cerulenina). Placa f. controle negativo colônias não irradiadas e plaqueadas me meio suplementado com cerulenina.

Conforme demonstrado na Figura 6, a suplementação por cerulenina afetou sensivelmente o crescimento de *L. starkeyi* em meio sólido. As colônias apresentaram-se bastante reduzidas (tamanhos médios de 0,2 mm), enquanto que, na ausência de cerulenina, os diâmetros médios das colônias foram de 0,7 mm.

O objetivo da avaliação dos diâmetros das colônias se deve ao fato da cerulenina inibir a síntese de lipídeos e, portanto, interferir no crescimento normal das células. A ocorrência de colônias de tamanho maior dentre os mutantes sugere um efeito compensatório na síntese de lipídeos, podendo significar uma maior eficiência deste metabolismo nestas células.

Este efeito da cerulenina reside no fato que esta molécula apresenta efeito inibitório sobre a enzima ácido graxo sintase (FAS), essencial à síntese de ácidos graxos (Heath et al., 2001). Como a biossíntese de lipídeos está envolvida na formação de membranas celulares, então sua supressão gera redução acentuada nas taxas de crescimento celular. Assim, a cepa microbiana cultivada na presença da cerulenina apresenta drástica diminuição no tamanho das colônias.

Nas placas contendo cepas mutantes, algumas colônias apresentaram-se maiores que as demais, com um tamanho em torno de 0,5 mm. Oito colônias foram selecionadas por este critério. Os mutantes selecionados foram identificados por A1, A2, A3, A4, B1, B2, B3 e H4, a nomenclatura foi referente às posições das colônias nas placas de 96 poços (para onde foram transferidos para fins de organização e armazenamento). A Figura 7 apresenta os mutantes selecionados.



Figura 7. Mutantes selecionados de acordo ao critério de maior tamanho onde foram identificados como A1, A2, A3, A4, B1, B2, B3 e H4 estocados em meio sólido YPX.

Em seguida ao isolamento, estes 8 mutantes foram estudados através de fermentação em frascos agitados, conforme apresentado na seção seguinte.

IV.2. Fermentação dos mutantes em frascos agitados

Nesta seção foram desenvolvidos experimentos visando o estudo da produtividade de biomassa e lipídeos dos oito mutantes selecionados. Foram delineados experimentos de fermentação em frascos agitados, de forma a permitir a avaliação simultânea dos parâmetros de crescimento celular e acúmulo de lipídeos para os oito mutantes e a cepa padrão *L. starkeyi* DSM 70296.

O cultivo de pré-inóculo foi realizado em meio de adaptação contendo xilose (XAM) seguida por transferência para meio de fermentação (XSM), garantindo uma concentração inicial de 1g/L de células. Cada mutante foi estudado em quadruplicata (3 frascos para a retirada das alíquotas e 1 frasco para a quantificação de lipídeos por gravimetria).

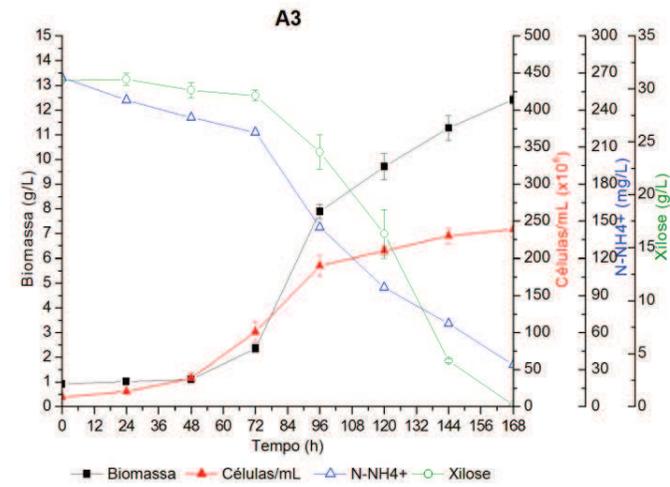
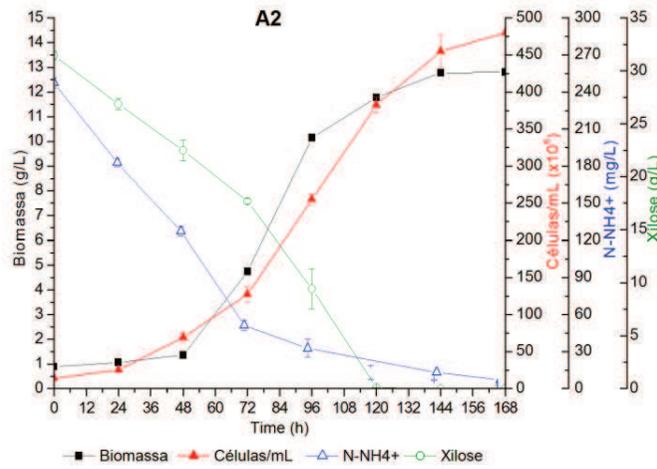
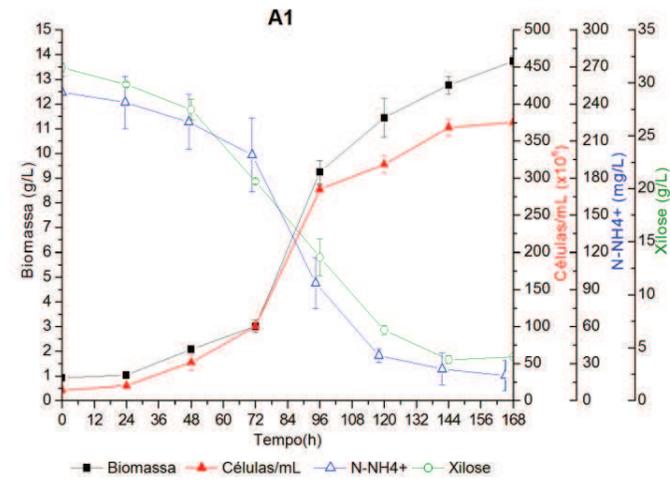
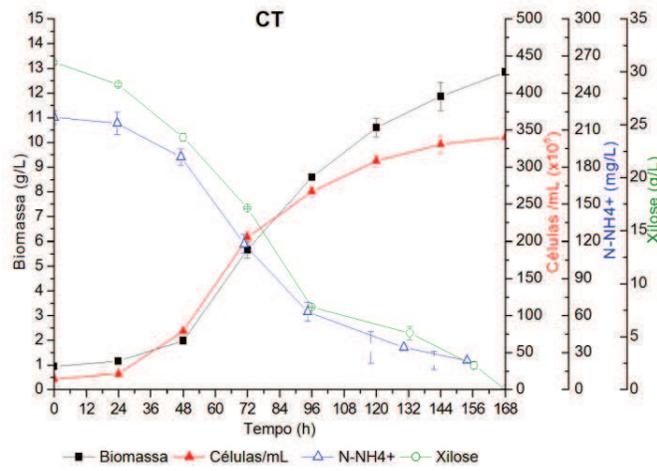
Para facilitar a tomada de amostras e garantir a qualidade das replicatas, estudo dos oito mutantes foi realizado através de três ensaios distintos, seguindo as mesmas condições de fermentação. Os resultados estão apresentados nas seções a seguir.

IV.2.1. Parâmetros de crescimento e consumo de nutrientes na fermentação de *L. starkeyi* e cepas mutantes em frascos agitados.

IV.2.1.1. Cepas mutantes A1, A2, A3, B1, B3 e H4.

As cepas foram pré-inoculadas em meio YPX e mantidas a 150 rpm, 28°C. Após 48 horas de cultivo, as amostras foram inoculadas no meio de fermentação XSM.

A Figura 8 ilustra o crescimento celular, biomassa (g/L) e número de células/mL, consumo de nutrientes (xilose e nitrogênio) na fermentação da cepa padrão (CT) e mutantes (A1, A2, A3, B1, B3 e H4) em frascos agitados contendo meio YPX, incubados a 28°C e a 150 rpm.



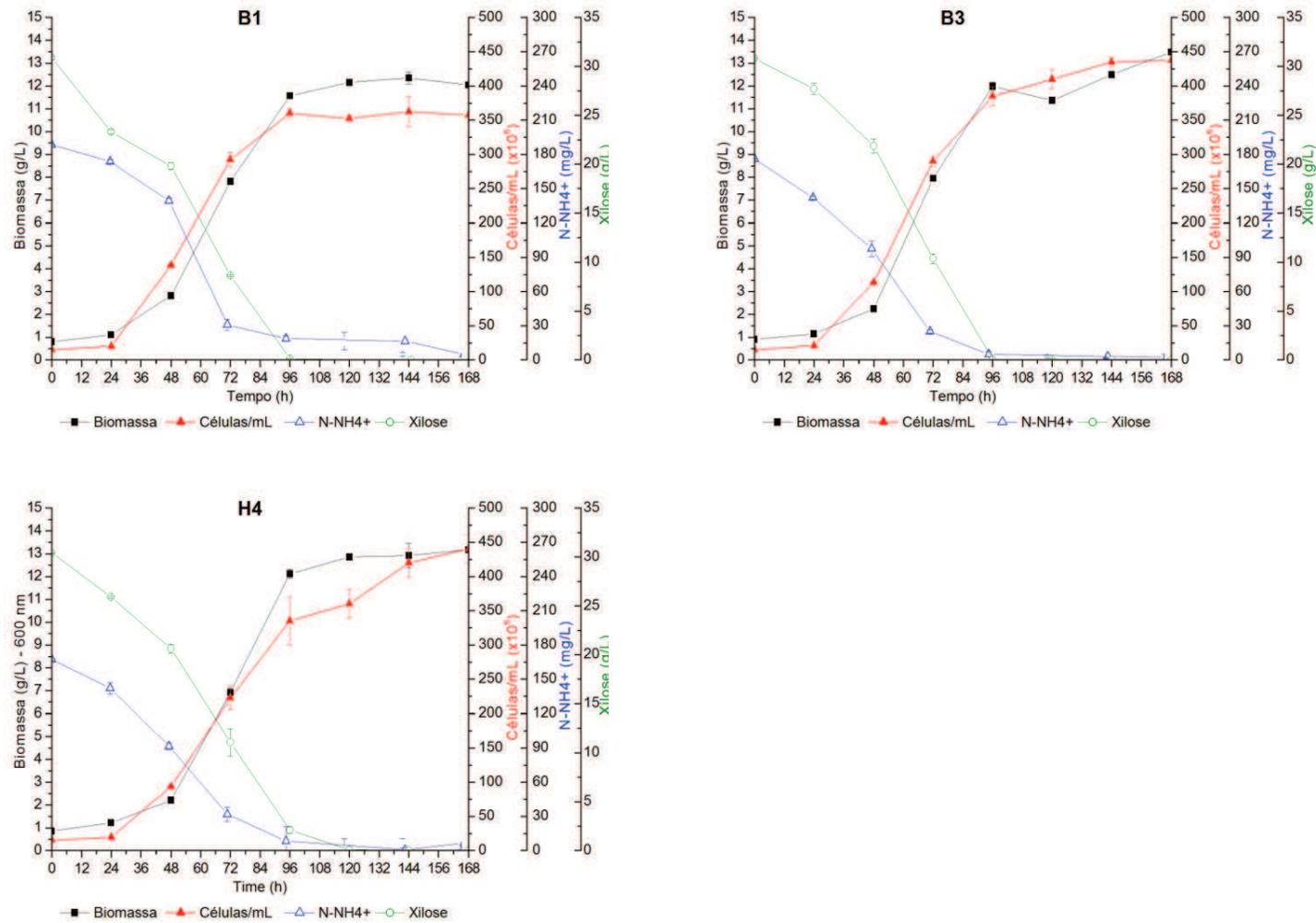


Figura 8. Parâmetros de crescimento e consumo de nutrientes pelas cepas mutantes (A1, A2, A3, B1, B3 e H4) e a cepa padrão, (CT) cultivadas em frascos agitados por 168 horas.

Os resultados da fermentação dos mutantes A1, A2, A3, B1, B3 e H4, quando comparados com a cepa padrão, indicaram perfis de crescimento semelhantes. Em cada cultura, o número máximo de células atingido foi de $2,6 \times 10^8$ células/mL para cepa padrão (96h), $3,7 \times 10^8$ células/mL para o mutante A1 (144h), $1,4 \times 10^8$ células/mL para o mutante A2 (96h) e $2,3 \times 10^8$ células/mL para o mutante A3 (144h) para o mutante B1 (142h), $4,3 \times 10^8$ células/mL para o mutante B3 (168h) e $4,4 \times 10^8$ células/mL para o mutante H4.

De acordo com os gráficos de consumo de xilose e nitrogênio, não houve diferença significativa entre os mutantes e cepa padrão. Apenas os mutantes B3 e H4 parecem ter depletado todo o nitrogênio presente no meio, porém em todos os casos toda a xilose foi consumida até o final da fermentação (168 horas).

IV.2.1.2. Cepas mutantes A4 e B2

O segundo lote foi iniciada com três amostras: a cepa padrão (CT) e dois mutantes (A4, B2). Para iniciar a fermentação, a cepa padrão e os mutantes foram inoculados em meios YPX, e incubados a 28°C e a 150rpm. A Figura 9 ilustra os resultados obtidos.

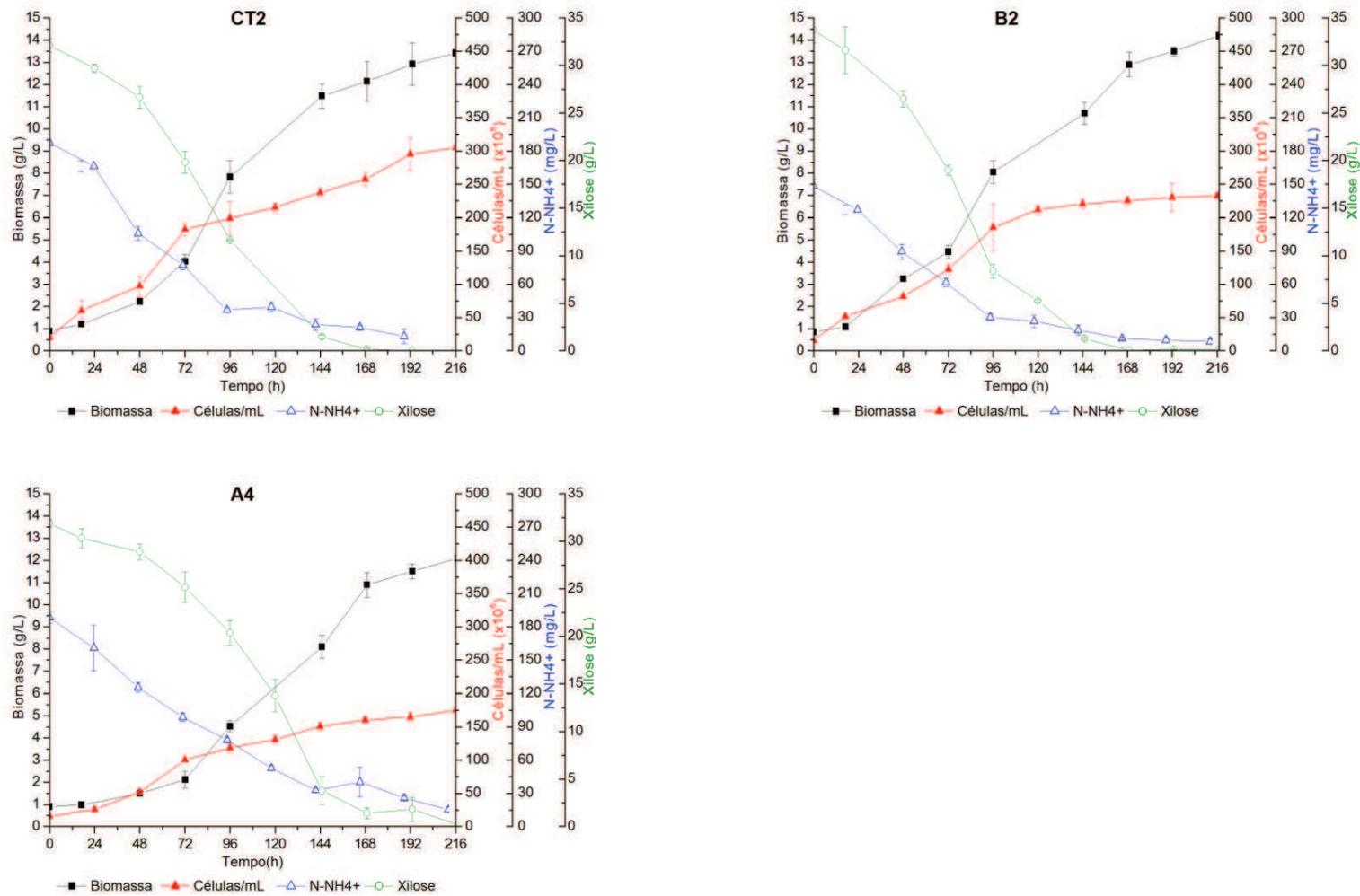


Figura 9. Parâmetros de crescimento e consumo de nutrientes pelas cepas mutantes (A4 e B2) e a cepa padrão, (CT2) cultivadas em frascos agitados durante 217h.

De acordo com os resultados, os mutantes A4 e B2 e a cepa padrão apresentaram perfis de crescimento similares. Nas cepas estudadas, a fase de latência durou apenas 17 horas para todas as amostras. Aparentemente, a fase exponencial do crescimento ocorreu até aproximadamente 144 horas de cultivo para a cepa padrão, e cerca de 168h para os dois mutantes, de acordo com os valores de biomassa. A fase estacionária parece ter sido atingida antes disso, entretanto, quando se observa a contagem do número de células. Em cada cultura, o número máximo de células atingido foi de $2,8 \times 10^8$ células/mL para a cepa padrão (96h), $1,8 \times 10^8$ células/mL para o mutante A4 (144h) e $2,5 \times 10^8$ células/mL para o mutante B2 (193h).

Os resultados para o consumo de xilose revelam que a cepa padrão e o mutante B2 esgotaram o açúcar em torno de 168 horas, enquanto que o mutante A4 aparentemente não chegou a esgotar todo o açúcar presente no meio, apenas no ponto final (217 horas). O consumo de nitrogênio apresentou um comportamento similar para os três cultivos.

IV.2.2. Parâmetros de crescimento celular e produção de lipídeos na fermentação de *L. starkeyi* DSM 70296 e mutantes, em frascos agitados

Os parâmetros de concentração celular, concentração de biomassa (g/L), conteúdo de lipídeos, produtividade de biomassa (g/L.h) e produtividade de lipídeos (g/L.h) obtidos na fermentação das cepas padrão e dos mutantes de *L. starkeyi* DSM 70296 estão sumarizados nas Tabelas 6 e 7.

O tempo de cultivo para os 6 mutantes (A1, A2, A3, B1, B3 e H4) e a cepa padrão de *L. starkeyi* DSM 70296, conforme mostrados na Tabela 6, foi de 168 horas, e enquanto para os mutantes A4 e B2 foi de 217 horas. Esta diferença se deve ao fato do açúcar não haver sido totalmente depletado no período de 168h, portanto a fermentação foi prolongada para reduzir erros nos cálculo de produtividade.

Tabela 6. Resultados gerais da fermentação da cepa padrão e os mutantes A1, A2, A3, B1, B3 e H4 de *L. starkeyi* DSM 70296 (CT), obtidos pelo cultivo em frascos agitados durante 168h.

Amostra	Número de células (cel/mL)	Concentração de biomassa (g/L)	Conteúdo de lipídeos (%)	Produtividade de biomassa (g/L.h)	Produtividade de lipídeos (g/L.h)
CT	2,42E+08	12,315	35,02±1,59	0,075±0,001	0,0255±0,001
A1	2,80E+08	13,74	39,60±1,3	0,082±0,001	0,032±0,002
A2	4,80E+08	12,94	34,86±3,15	0,079±0,002	0,027±0,001
A3	1,25E+08	12,05	38,11±1,2	0,073±0,007	0,028±0,001
B1	2,93E+08	12,93	34,98±1,71	0,075±0,002	0,028±0,001
B3	4,38E+08	12,46	30,06±0,50	0,080±0,001	0,027±0,001
H4	4,40E+08	13,12	33,65±1,61	0,078±0,001	0,028±0,001

Tabela 7. Resultados gerais da fermentação da cepa padrão e dos mutantes A4 e B2 de *L. starkeyi* DSM 70296 (CT2), obtidos pelo cultivo em frascos agitados durante 217h.

Amostra	Número de células (cel/mL)	Concentração de biomassa (g/L)	Conteúdo de lipídeos (%)	Produtividade de biomassa (g/L.h)	Produtividade de lipídeos (g/L.h)
CT2	1,93E+08	12,726	41,73±2,7	0,062±0,002	0,025±0,001
A4	1,00E+08	13,713	47,46±0,48	0,056±0,001	0,026±0,001
B2	1,20E+08	9,933	43,83±1,6	0,065±0,001	0,022±0,002

No geral, o maior rendimento de biomassa foi obtido pelo mutante A1 (biomassa = 13,74 g/L). O conteúdo máximo de lipídeos foi produzido pelo mutante A4 (fração lipídica = 47,4%).

Os resultados do cultivo em frascos agitados indicaram que o mutante A1, apresentou diferença tanto na produção de biomassa como na de lipídeos, mostrando produtividades de 0,082 ±0,0006 (g/L.h) de biomassa e 0,032±0,001 (g/L.h) de lipídeo, quando comparado com a cepa padrão (CT) que apresentou 0,075±0,0002 (g/L.h) de biomassa e 0,025±0,003 (g/L.h) de lipídeo.

Para avaliar se as diferenças obtidas atingiram significância estatística, os valores de produtividade de biomassa e lipídeos foram submetidos a teste estatístico, conforme apresentado a seguir.

IV.2.3 Parâmetros de produtividade

Após o término das fermentações em frascos agitados, os resultados obtidos foram submetidos a uma análise comparativa e avaliados estatisticamente pelo teste Tukey, de forma a identificar diferenças com significância estatística nos índices de produtividade dos mutantes em relação à cepa controle.

IV.2.3.1. Produtividade de biomassa (g/L.h)

Foi realizada análise estatística para estimar a diferença significativa entre as produtividades de biomassa (g/L.h) obtidas para os 8 mutantes estudados em dois lotes, o primeiro lote foram estudadas 6 mutantes e no segundo lote os dois mutantes restantes. Ambos os lotes foram estudadas em relação aos valores amostrados para a cepa padrão.

Foi utilizado Teste de Tukey para fazer o comparativo das médias com 95% de confiança. A Figura 10 e 11 mostram os resultados.

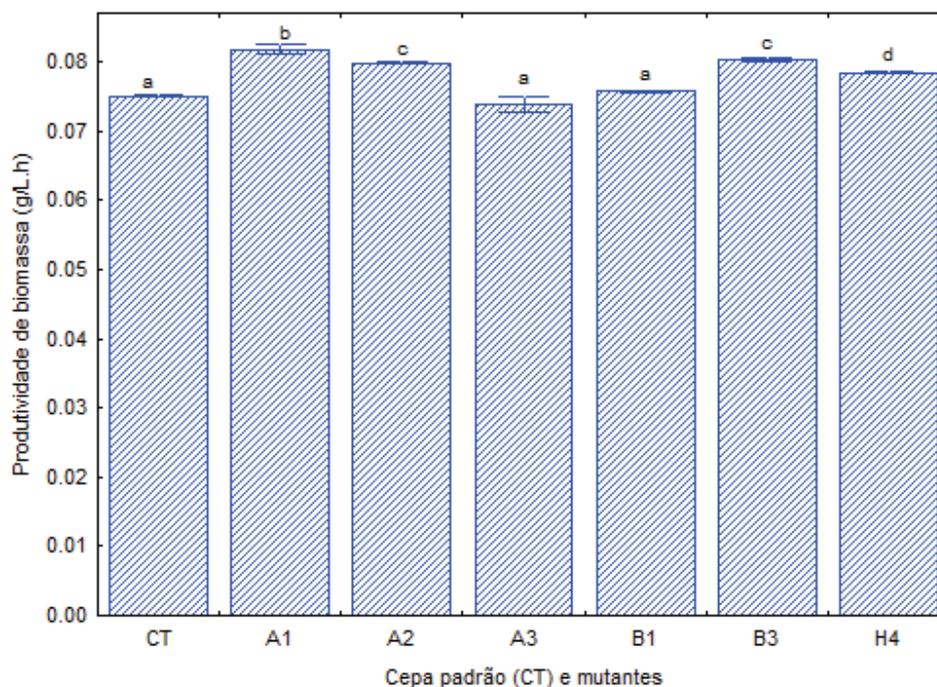


Figura 10. Produtividade de biomassa (g/L.h) da cepa padrão *L. starkeyi* DSM 70296 (CT) e dos mutantes A1, A2, A3, B1, B3 e H4. Letras distintas de produtividade de biomassa significam que as amostras são diferentes ($p < 0,05$).

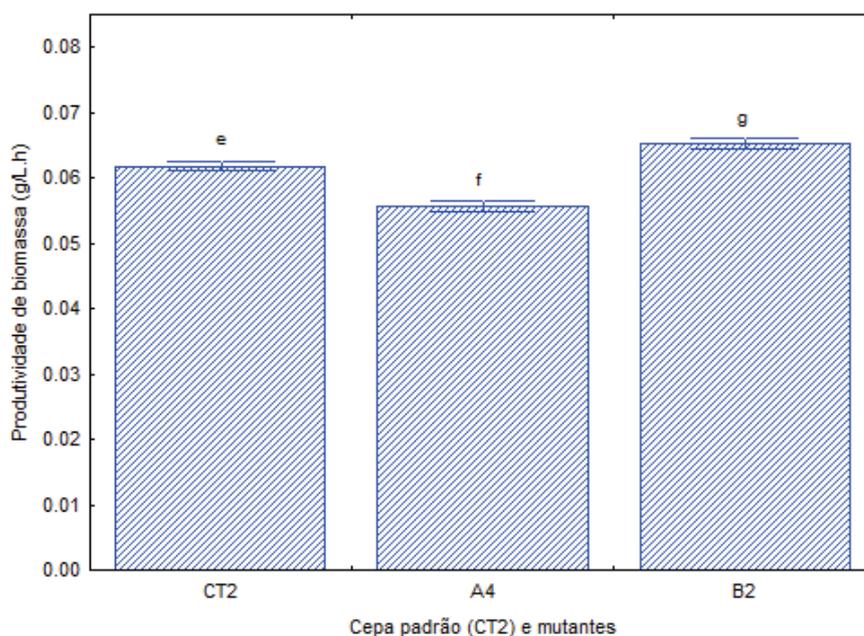


Figura 11. Produtividade de biomassa (g/L.h) da cepa padrão *L. starkeyi* DSM 70296 (CT2) e dos mutantes A4 e B2. Letras distintas de produtividade de biomassa significam que as amostras são diferentes ($p < 0,05$).

Os resultados indicaram que o mutante A1 apresentou uma pequena diferença em produção de biomassa ($0,082 \pm 0.0006$) g/L.h) quando comparado à cepa padrão (0.07 ± 0.0002) g/L.h). Esta diferença de produtividade foi considerada estatisticamente significativa segundo o teste de Tukey a 95% de confiabilidade.

IV.2.3.2. Produtividade de lipídeos (g/L.h)

Os resultados da análise estatística sobre os valores de produtividade de lipídeos (g/L.h) também foram avaliados para os oito mutantes e a cepa padrão. Os resultados estão apresentados pela Figura 12 e 13.

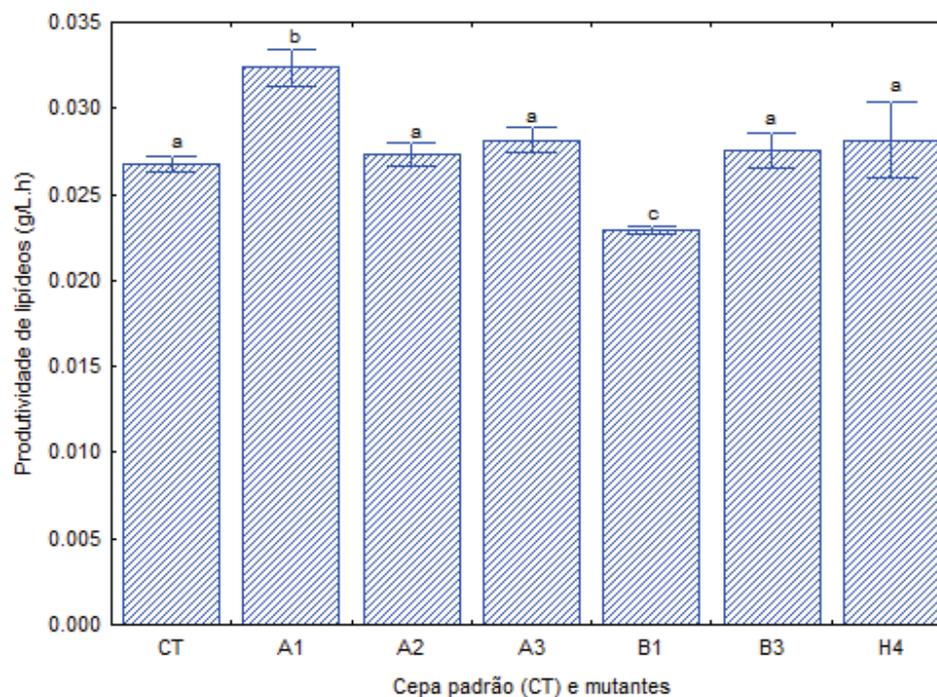


Figura 12. Produtividade de lipídeo (g/L.h) dos mutantes A1, A2, A3, B1, B3, H4 e da cepa padrão *L. starkeyi* DSM 70296 (CT) cultivados em frascos agitados por 168h. Letras distintas significam que as amostras são diferentes ($p < 0,05$).

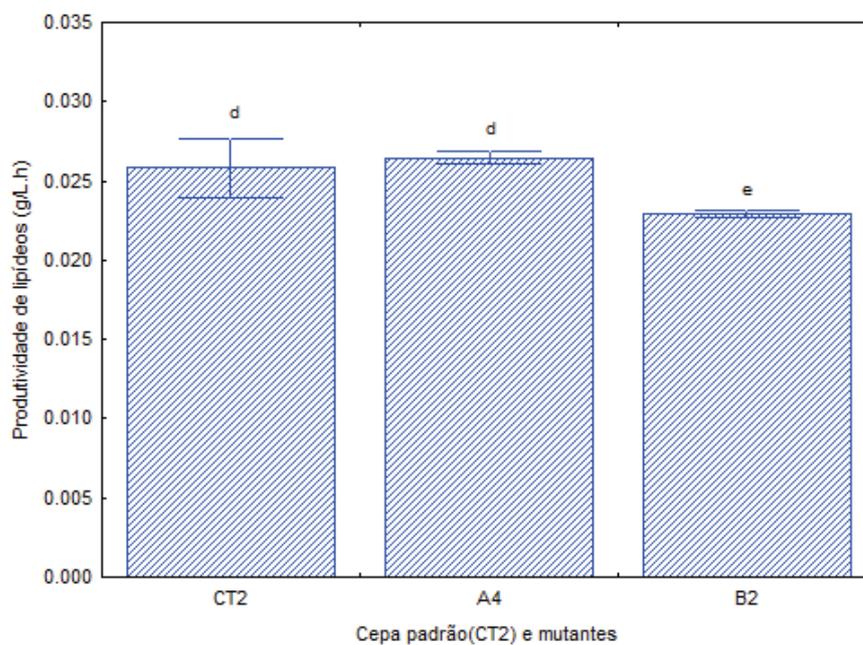


Figura 13. Produtividade de lipídeo (g/L.h) dos mutantes A4 e B2, e da cepa padrão *L. starkeyi* DSM 70296 (CT) cultivados em frascos agitados por 217h. Letras distintas significam que as amostras são diferentes ($p < 0,05$).

Os resultados indicam que houve um ligeiro aumento na produtividade de lipídeos do mutante A1 (0.032 ± 0.001 g/L.h) em relação à cepa padrão (0.025 ± 0.003 g/L.h). Esta diferença de produtividade foi considerada estatisticamente diferente segundo o teste de Tukey a 95% de confiabilidade

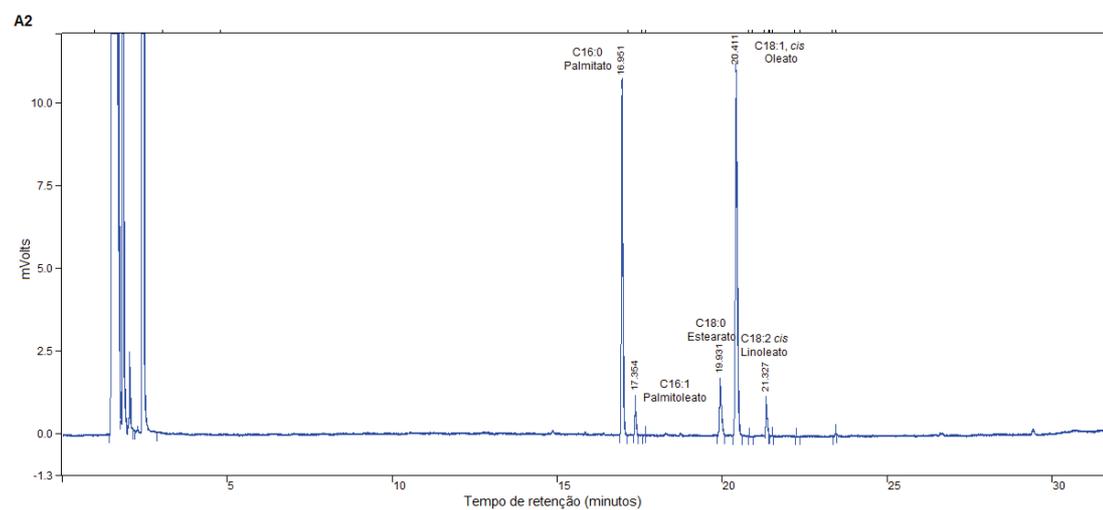
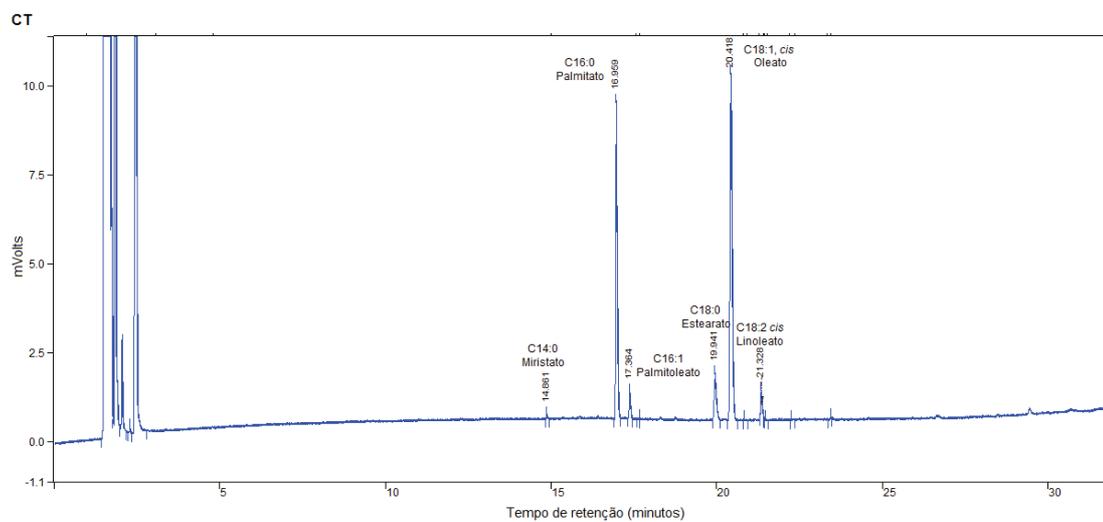
Apesar dos demais mutantes também apresentarem uma sutil diferença nas produtividades em relação à cepa padrão, estas diferenças não foram consideradas estatisticamente significativas.

Assim, o mutante A1 foi selecionado para estudo em biorreator para avaliar seu desempenho fermentativo com maior detalhamento, conforme apresentado na seção seguinte (IV. 3. Fermentação em biorreator)

A seguir, apresentamos uma análise do perfil dos ácidos graxos produzidos por alguns dos mutantes estudados.

IV.2.4. Composição de ácidos graxos do lipídeos dos mutantes A2, B1, B2, B3 e H4

A composição de ácidos graxos dos lipídeos produzidos pelos mutantes A2, B1, B2, B3 e H4 foram analisados por cromatografia gasosa. A Figura 12 apresenta os cromatogramas. Não foram apresentados os cromatogramas dos demais mutantes por se mostrarem semelhantes.



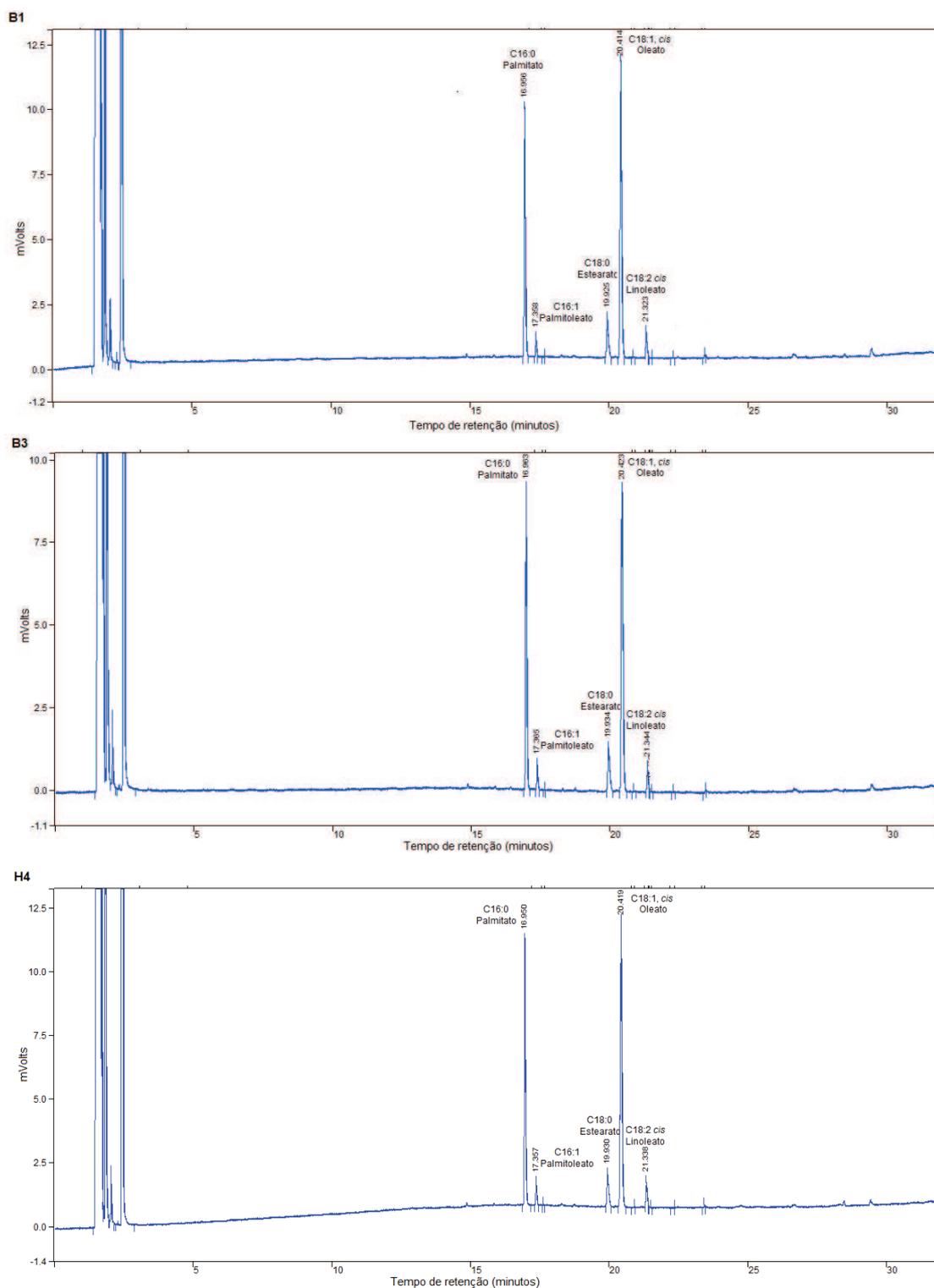


Figura 14. Cromatograma dos ácidos graxos dos lipídeos microbianos da cepa padrão (CT) *L. starkeyi* DSM 70296 e os mutantes A2, B1, B3 e H4 cultivados em frascos agitados, analisados por cromatografia gasosa.

A Tabela 8 apresenta a composição dos ácidos graxos da cepa padrão *L. starkeyi* DSM 70296 e de quatro dos mutantes cultivados em frascos agitados. Para fins de comparação, foram incluídos também os resultados obtidos para a cepa padrão em outro estudo conduzido em nosso laboratório (Garzón, 2009).

Tabela 8. Composição de ácidos graxos dos lipídeos produzidos pelos mutantes (A2, B1, B3 e H4) e a cepa padrão *L. starkeyi* DSM 70296 (CT) estudados em frascos agitados.

	Ácido mirístico C14:0	Ácido palmítico C16:0	Ácido palmitoléico C16:1	Ácido esteárico C18:0	Ácido Oléico C18:1n9c	Ácido Linoléico C18:2n6c
CT	0.42	34.88	2.56	7.42	51.93	2.79
A2	n.d.	36.3	2.92	7.37	50.86	2.56
B1	n.d.	34.19	2.27	8.11	52.27	3.16
B3	n.d.	35.71	2.53	7.76	51.25	2.75
H4	n.d.	35	2.85	6.67	52.02	3.46
<i>L. starkeyi</i> DSM 70296*	0.83	20.38	n.d.	10.77	56.06	11.96

*Dados obtidos por Garzón(2009).

Os resultados revelaram que a composição de ácidos graxos dos lipídeos produzidos pela cepa padrão e pelos mutantes é muito semelhante, composta principalmente por C16: 0 (ácido palmítico, ~ 35%) e C18: 1 (ácido oleico, ~ 50%) . Outros ácidos graxos identificados foram C16: 1 (ácido palmitoléico, ~ 2,5%), C18: 0 (ácido esteárico, ~ 7%) e C18: 2 (linoleato, ~ 2,5%). Curiosamente, observou-se a presença de C14: 0 (ácido mirístico) apenas na cepa padrão (~ 0,5%), estando ausente nos quatro mutantes estudados neste análise. Os lipídeos da levedura *L. starkeyi* DSM 70296 e das cepas mutantes são compostas basicamente por seis tipos de ácidos graxos contendo 14 a 18 carbonos, com baixo grau de insaturação que é uma característica desejável para a produção de biocombustíveis a partir desta fonte.

Diferenças nas proporções relativas de ácido palmítico e ácido oléico são provavelmente devido às diferenças nas fontes de carbono, a composição do meio e da duração do cultivo. De acordo com a Wild e colaboradores (Wild et al., 2010), os ácidos graxos insaturados *L. starkeyi* está compreendida entre 58 e 60%. A questão da relação entre insaturados de ácidos graxos saturados em lipídeos é de grande interesse para a indústria de biodiesel, uma vez que tem profundo impacto sobre a produção de biodiesel (Garzón, 2009).

IV.3. Fermentação em biorreator

Varias formas de cultivo foram utilizados para cultivar microrganismos oleaginosos, entre as quais se sobressai o cultivo em biorreator, permitindo que os parâmetros fermentativos sejam rigorosamente controlados (Ganuza and Izquierdo, 2007). Assim, conduzimos a fermentação do mutante selecionado em biorreator, utilizando os parâmetros fermentativos previamente definidos para a cepa padrão em nosso laboratório.

Os experimentos foram conduzidos em batelada alimentada (3 pulsos de alimentação) e utilizando fonte de carbono mista (glicose 70%: xilose 30% no inóculo; glicose 30%: xilose 70% nas alimentações). Os ensaios foram feitos em duplicata tanto para a cepa padrão como para o mutante. Os resultados estão apresentados a seguir, identificados pela letra M ('mutante') acompanhada pelo identificador do ensaio ('1' ou '2') para o mutante A1 e pela letra S ('selvagem') acompanhada pelo identificador do ensaio ('1' ou '2') para a cepa padrão.

IV.3.1. Parâmetros de crescimento

Os resultados obtidos nas fermentações do mutante A1 e da cepa padrão *L. starkeyi* DSM 70296 estão apresentados esquematicamente pela Figura 15, para os dados de biomassa (absorbância 600nm), biomassa seca (g/L), concentração celular (células/mL) e fração de células mortas (%), e pela Figura 16, para os dados de consumo de xilose e glicose (g/L), nitrogênio (mg/L) e fração lipídica (%).

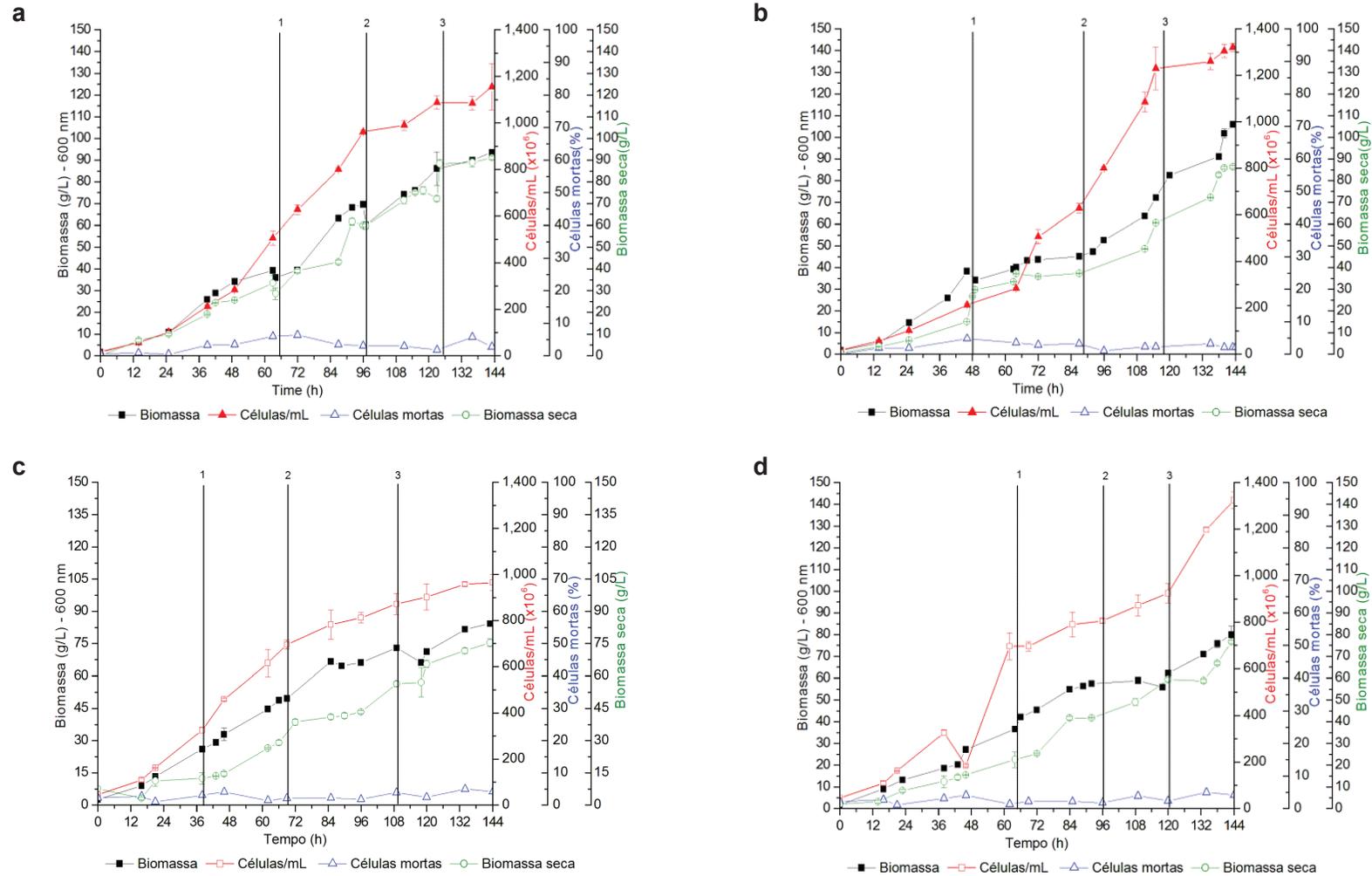


Figura 15. Perfil de crescimento obtido na fermentação do mutante A1: M1 (a) e M2 (b); e na fermentação da cepa padrão: S1 (c) e S2 (d).

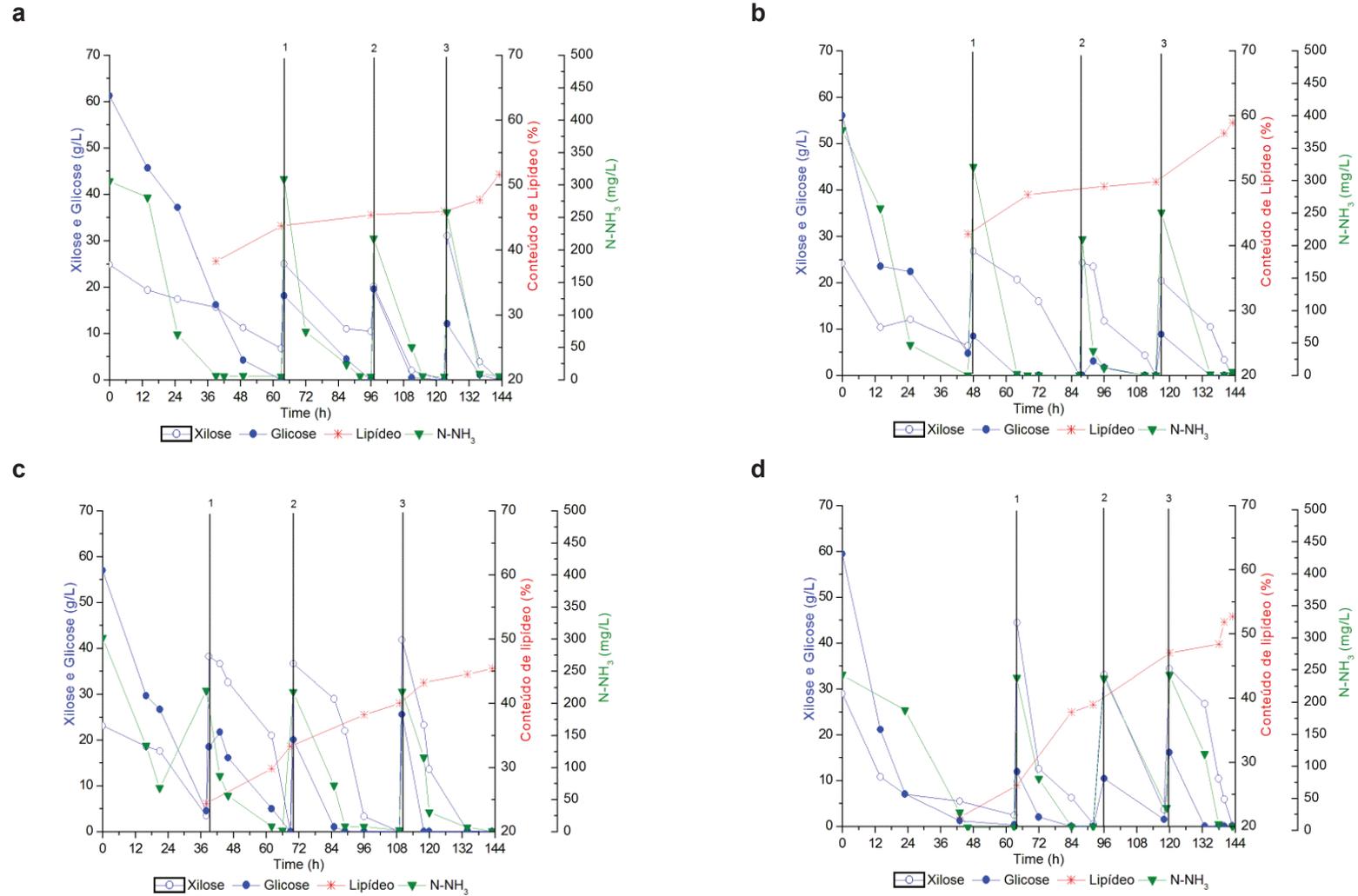


Figura 16. Perfil de consumo de nutrientes: xilose, glicose, acúmulo de lipídeos nas fermentações do mutante A1: M1 (a) e M2 (b) e a cepa padrão S1 (c) e S2 (d).

Ambas as cepas foram cultivadas em duplicata, e o tempo total de cada fermentação foi de 144 horas. A concentração celular atingida ao final das fermentações apresentou os seguintes valores $1,16 \times 10^9$ células/mL (M1), $8,89 \times 10^8$ células/mL (M2), $9,64 \times 10^8$ células/mL (S2) e $1,33 \times 10^9$ células/mL (S2). Os perfis de biomassa seca atingida ao final das fermentações foram de 91,1 g/L (M1) e 86,0 g/L (M2), 75,3 g/L (S1) e 76,6 g/L (S2). Os perfis de biomassa seca e de biomassa estimada pela absorbância a 600nm mostraram tendência similar (Figura 15). Os níveis de nitrogênio amoniacal (N-NH_3) diminuíram rapidamente durante a fase exponencial de crescimento até níveis próximos de zero (Figura 16).

A Tabela 9 traz os valores obtidos nas quatro fermentações.

Tabela 9. Resultados gerais da fermentação da cepa padrão *L. starkeyi* DSM 70296 (S1 e S2) e do mutante A1 (M1 e M2) em biorreator.

Cepas	Concentração celular	Concentração de biomassa (g/L)	Conteúdo de lipídeos (%)	Produtividade de biomassa (g/L.h)	Produtividade de lipídeo (g/L.h)
S1	9,64E+08	75,35±1,80	45,40±1,3	0,53±0,01	0,24±0,23
S2	1,33E+09	76,67±3,34	52,72±3,1	0,54±0,02	0,29±0,02
M1	1,16E+09	91,13±0,81	51,62±0,9	0,63±0,01	0,33±0,01
M2	8,89E+08	86,28±1,15	58,60±1,4	0,60±0,01	0,35±0,01

De acordo com os resultados, apesar da diferença entre as duplicatas da fermentação da cepa padrão, pode ser observar que tanto os valores de biomassa como de conteúdo de lipídeos foram inferiores àqueles obtidos para a cepa mutante. Para confirmar esta diferença, foi realizada análise estatística e os resultados estão conforme apresentados na seção a seguir.

IV.3.3. Parâmetros de produtividade

Os resultados foram analisados estatisticamente para estimar se existe diferença significativa entre as produtividades de biomassa e lipídeos (g/L.h) obtidas nas quatro bateladas alimentadas. Foi utilizado Teste de Tukey para fazer o comparativo das médias com 95 % de confiança.

IV.3.3.1. Produtividade de biomassa (g/L.h)

Para estimar se houve diferença significativa entre as produtividade de biomassa (g/L.h) obtidas para o mutante A1 em relação aos valores amostrados para a cepa padrão, foi aplicado o Teste de Tukey (95 % de confiança) A Figura 17 mostra os resultados.

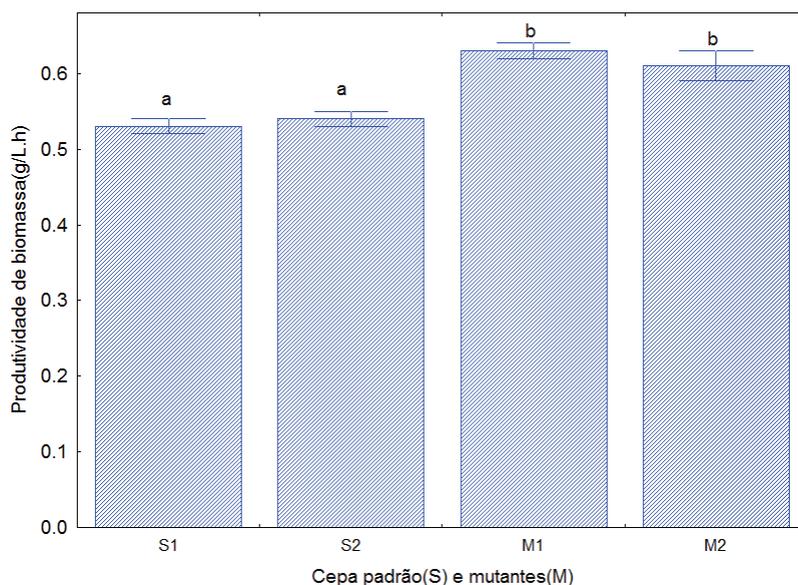


Figura 17. Produtividade de biomassa (g/L.h) na fermentação da cepa padrão *L. starkeyi* DSM 70296 (S1 e S2) e do mutante A1 (M1 e M2). Letras distintas significam que as amostras são diferentes ($p < 0,05$).

De acordo com os resultados apresentados na Figura 17, pode-se observar que houve diferença significativa em relação à produtividade de biomassa entre a cepa padrão e o mutantes, confirmando seu aumento no mutante.

IV.3.3.2. Produtividade de lipídeos (g/L.h)

Os resultados da análise estatística para a produtividade de lipídeos (g/L.h) das fermentações do mutante A1 e da cepa padrão estão apresentados na Figura 18.

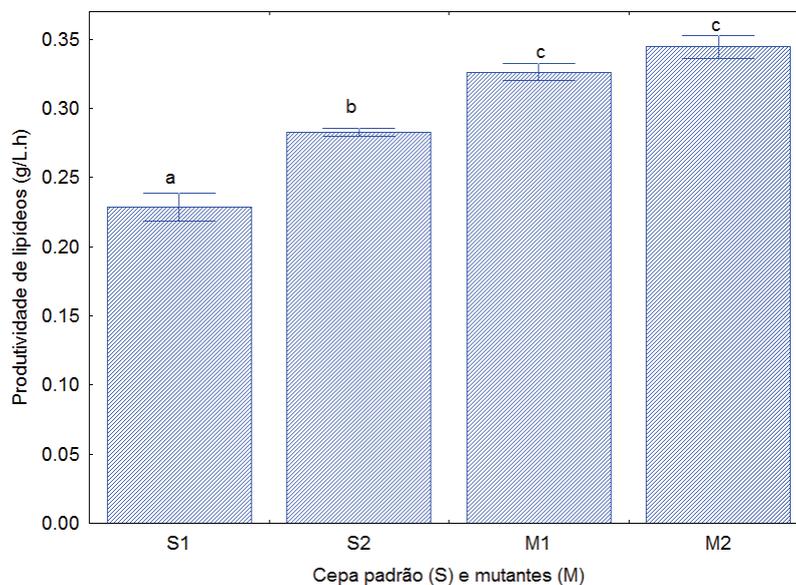


Figura 18. Produtividade de lipídeos (g/L.h) nas fermentações da cepa padrão *L. starkeyi* DSM 70296 (S1 e S2) e do mutante A1 (M1 e M2). Letras distintas significam que as amostras são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Pode-se verificar que, apesar da diferença entre os valores de lipídeo amostrados nas duplicatas para a cepa padrão, foi confirmado o aumento significativo no mutante A1.

Em resumo, os resultados em biorreator indicaram que o mutante A1 teve aumento médio de 15,8% nos teores de biomassa em relação à cepa padrão, atingindo média de 88 g/L de biomassa, enquanto a cepa padrão permaneceu em 76 g/L. Em relação à quantidade de lipídeos, o mutante A1 acumulou em média 54,6%, enquanto a cepa padrão acumulou em média 47,5% de sua massa em lipídeo, alcançando um aumento de 14,9% na fração lipídica.

Assim, o mutante A1 demonstrou ganho de produtividade em relação à cepa padrão, confirmando seu potencial para substituí-la no processo de obtenção de óleo a partir de resíduos lignocelulósicos.

A seguir apresentamos uma avaliação da composição lipídica do mutante A1 em relação à cepa padrão, através da análise dos óleos obtidos nas fermentações em biorreator.

IV.3.3. Composição de ácidos graxos dos lipídeos da cepa padrão *L. starkeyi* DSM 70296 e do mutante A1 cultivados em biorreator

A composição de ácidos graxos dos lipídeos produzidos pelo mutante A1 e a cepa padrão *L. starkeyi* DSM 70296 foram analisados por cromatografia gasosa. Os resultados estão apresentados pela Tabela 10.

Tabela 10. Composição de ácidos graxos dos lipídeos da cepa padrão *L. starkeyi* DSM 70296 e do mutante A1 cultivados em batelada alimentada.

Microrganismos	Ácido mirístico C14:0	Ácido palmítico C16:0	Acido palmitoléico C16:1	Ácido esteárico C18:0	Acido oléico C18:1n9c	Acido linoléico C18:2n6c
<i>L. starkeyi</i> DSM 70296	n.d	36,20±0,3	2,27±0,1	12,09±0,2	45,67±0,7	3,5±0,4
Mutantes A1	0,39±0,02	33,98±0,1	3,36±0,09	7,52±0,1	50,61±0,3	3,91±0,2
<i>L. starkeyi</i> ¹	0,4	33,0	4,8	4,7	55,1	1,6
<i>R. toruloides</i> ²	1,3	20,0	0,6	14,6	46,9	13,1

¹(Liu and Zhao, 2007)

²(Li et al., 2007)

Conforme podemos observar na Tabela 10, a composição dos ácidos graxos apresenta-se semelhante entre o mutante e a cepa padrão, com maior quantidade dos ácidos palmítico (>30%) e ácido oléico(>45%). Este perfil é similar àquele descrito para *L. starkeyi* em outros estudos (Liu and Zhao, 2007, Angerbauer et al., 2008, Meng et al., 2009, Wild et al., 2010).

Entretanto, uma pequena redução na quantidade de ácido esteárico (C18:0) do mutante em relação à cepa padrão (aprox. 5 pontos percentuais), e aumento proporcional na quantidade de ácido oléico (C18:1). Como esta modificação foi obtida durante fermentações utilizando as mesmas condições, pode refletir uma característica intrínseca ao mutante.

Do ponto de vista da regulação do metabolismo de síntese de lipídeos, este resultado poderia indicar um aumento da atividade da enzima $\Delta 9$ desaturase (EC 1.14.19.1), responsável pela conversão do ácido esteárico em ácido oléico. Entretanto, estudos adicionais devem ser conduzidos antes de estabelecer este tipo de discussão.

CONCLUSÕES

Microorganismos constituem uma alternativa promissora para a produção de biocombustíveis e outros bioprodutos a partir de biomassa renovável e, assim, fugir à dependência dos derivados petroquímicos. Uma grande vantagem do uso de microorganismos para a obtenção de produtos de interesse industrial é o fato de eles não requerem grandes áreas de cultivo, sendo geralmente cultivadas em tanques de fermentação e, portanto, não competem com terras agrícolas (Meng et al., 2009, Vicente et al., 2009). Outras características importantes dos microorganismos é sua capacidade de utilizar carboidratos complexos, como resíduos lignocelulósicos, como fonte de carbono (Meng et al., 2009).

Lipídeos microbianos têm grande potencial para substituir as sementes oleaginosas na produção de biodiesel. No entanto, apesar de todo o seu potencial, a produção de biodiesel de segunda geração a partir de microorganismos ainda não é economicamente viável, principalmente devido às limitações na produtividade das linhagens disponíveis.

É de grande importância a aplicação de metodologias de biologia molecular, como a engenharia genética, para a melhoria destes microorganismos. Neste contexto, utilizamos a levedura *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 para a produção de lipídeos microbianos a partir de pentoses, os principais açúcares presentes na fração hemicelulósica vegetal, como o bagaço de cana. Nosso objetivo principal foi a otimização desta linhagem através da utilização de ferramentas de biologia molecular, de modo a acelerar a sua adaptação ao bioprocessamento de interesse.

Entretanto, as ferramentas tradicionais de engenharia genética muitas vezes encontram dificuldades técnicas quando utilizado em espécies não domesticadas, que normalmente exibem mecanismos de proteção impedindo a manipulação de seu DNA. Em tais casos, é preferível utilizar-se um método para aumentar as taxas de mutação naturais do seu DNA através da ação de agentes mutagênicos, tais como luz ultravioleta (UV) (Kava - Cordeiro et al., 1995). Estudos preliminares realizados no nosso grupo indicam que é o caso da *Lipomyces starkeyi*.

Assim, a estratégia descrita no presente trabalho empregou a técnica de mutagênese aleatória induzida por irradiação UV. Inicialmente, procuramos determinar o tempo ideal de exposição à UV através de curvas de dose/resposta. De acordo com os nossos resultados, o tempo de exposição ótima para *L. starkeyi* foi de 40 minutos, correspondendo a uma sobrevivência de células de 5%, faixa com grande acúmulo de mutações no DNA.

Associada a esta estratégia foi realizado um ensaio de seleção de mutantes utilizando cerulenina para identificar os mutantes com potencial aumento no metabolismo lipídico. A cerulenina tem sido largamente utilizada em estudos de biossíntese e metabolismo de ácidos graxos em bactérias e leveduras (Satoshi, 1976), e estudos mostram seu efeito inibitório sobre a atividade da enzima ácido graxo sintase (FAS), essencial à biossíntese de lipídeos (Heath et al., 2001). Uma vez que a biossíntese de lipídeos é essencial para o crescimento celular, sua inibição determina uma redução significativa na taxa de crescimento celular (Wang et al., 2009).

Com esta estratégia, foram isoladas 8 mutantes, os quais foram estudados através da fermentação em frascos agitados utilizando a cepa padrão de *L. starkeyi* DS 70296 como controle, o que nos permitiu avaliar quaisquer alterações significativas nos parâmetros de produtividade.

Os experimentos realizados em frascos agitados indicaram que, destes 8 mutantes, apenas o mutante A1 apresentou uma diferença significativa nas produtividades de biomassa e lipídeos em relação à cepa padrão. Desta forma, A1 foi empregado para estudo detalhado em biorreator, utilizando os parâmetros fermentativos definidos para a cepa padrão em outros estudos do nosso grupo.

Os resultados em biorreator demonstraram um aumento aproximado de 15,8% nos teores de biomassa e de 14,9% na produtividade de lipídeos em relação à cepa padrão, confirmando seu potencial para substituí-la no processo de obtenção de óleo a partir de resíduos lignocelulósicos.

Maiores estudos podem ser conduzidos na tentativa de adaptar esta cepa às condições de fermentação em hidrolisados de bagaço, bem como na caracterização de suas alterações metabólicas através de ferramentas da genômica. Finalmente, tal

mutante pode ser empregado para aperfeiçoamento de suas características desejáveis através de metodologias de engenharia evolutiva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGEITOS, J. M.; VALLEJO, J. A.; VEIGA-CRESPO, P.; VILLA, T. G. Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Applied Microbial Biotechnology*, v. 90, p. 1219-1227, 2011.
- AGGELIS, G.; KOMAITIS, M. Enhancement of single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing in the presence of *Teucrium polium* L. aqueous extract. *Biotechnology Letters*, v. 21, p. 747-749, 1999.
- AGGELIS, G.; KOMAITIS, M.; PAPANIKOLAOU, S.; PAPADOPOULOS, G. A mathematical model for the study of lipid accumulation in oleaginous microorganisms .2. Study of cellular lipids of *Mucor circinelloides* during growth on a vegetable oil. *Grasas y aceites*, v. 46, p. 245-250, 1995.
- ALVAREZ, H. M.; STEINBÜCHEL, A. Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 60, p. 367-376, 2003.
- ANGERBAUER, C.; SIEBENHOFER, M.; MITTELBACH, M.; GUEBITZ, G. M. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 3051-6, 2008.
- ANTOLIN, G.; TINAUT, F. V.; BRICENO, Y.; CASTANO, V.; PEREZ, C.; RAMIREZ, A. I. Optimisation of biodiesel production by sunflower oil transesterification. *Bioresource Technology*, v. 83, p. 111-114, 2002.
- AZEVEDO, J. L. *Genética de microrganismos*, Goiânia, GO. 1998.
- BALL, C. Melhoramento genética de microrganismo. *FEALQ*. Piracicaba, 1985.
- BEOPOULOS, A.; CESCUT, J.; HADDOUCHE, R.; URIBELARREA, J. L.; MOLINA-JOUVE, C.; NICAUD, J. M. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Progress in Lipid Research*, v. 48, p. 375-387, 2009.

- BEOPOULOS, A.; MROZOVA, Z.; THEVENIEAU, F.; LE DALL, M. T.; HAPALA, I.; PAPANIKOLAOU, S.; CHARDOT, T.; NICAUD, J. M. Control of Lipid Accumulation in the Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Applied Environmental Microbiology*, v. 74, p. 7779-7789, 2008.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, v. 37, p. 911-917, 1959.
- BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, v. 14, p. 557-577, 2010.
- CALDEIRA, M. L. *Produção de SCO (Single Cell Oil) para biodiesel a partir da microalga Chlorella protothecoides em diversos bioreactores com troca simbiótica de correntes gasosas*. Dissertação de mestrado, Universidade Nova de Lisboa. 2011.
- CONTADO, J. L. *Produção e caracterização da β -frutofuranoisidade de Linhagem mutante de Aspergillus niger e su aplicação na produção de frutooligossacarídeos*. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas. 1998.
- CRONAN JR, J. E. Thermal regulation of membrane lipid composition of *Escherichia coli*. Evidence for the direct control of fatty acid synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 250, p. 7074-7077, 1975.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, v. 25, p. 294-306, 2007.
- DA SILVA, S. *Aplicação de radiação UV para desinfecção de efluentes da associação de reator UASB e biofiltro aerado submerso*. Dissertação mestrado, Escola de São Carlos da Universidade de São Paulo. 2007.
- DAI, C. C.; TAO, J.; XIE, F.; DAI, Y. J.; ZHAO, M. Biodiesel generation from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity. *African Journal of Biotechnology*, v. 6, p. 2130-2134, 2007.

- FAIFE, E.; OTERO, M. A.; ALVAREZ, A.; PENA, M. A.; MELFI, M.; MATOS, M. L.; KOZLOWSKI, A. M. Microbial oil production by oleaginous yeasts on wastewaters-based medium. *International Sugar Journal*, v. 113, p. 786-791, 2011.
- FRANCISCO, E. C. *Biofixação de dióxido de carbono por microalgas acumuladoras de materiais graxos*. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas. 2010.
- GANUZA, E.; IZQUIERDO, M. S. Lipid accumulation in *Schizochytrium* G13/2S produced in continuous culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 76, p. 985-990, 2007.
- GARZÓN, C. S. L. *Produção microbiana de lipídeos*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas. 2009.
- GRIFFITHS, A. J. F.; WESSLER, S. R.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W. M.; SUZUKI, D. T.; MILLER, J. H. 8th edition *An Introduction to Genetic Analysis*, New York, Freeman, W. H. 2004.
- GUIMARÃES, T. M. *Isolamento, identificação e seleção de cepas de levedura *Sacharomyces cerevisiae* para elaboração de vinho*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Paraná. 2005.
- GUO, C. B.; CUI, N. B.; YU, G. Y.; LIU, D. X.; MENG, S. C.; SONG, Q. Effects of cerulenin on the endogenous fatty acid synthetic activity in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 61, p. 909-912, 2003.
- HATA, T. Y. S., A.; MATSUMAE, Y. ;KAMIO, S Study of new antifungal antibiotic. *Journal Bacteriology*, v. 15, p. 1075-1077, 1960.
- HE, P.; HUANG, J.; SHI, Q.; LI, X.; YUAN, L.; ZOU, Q. Breeding of Oleaginous *Rhodotorula* *Glutinis* and the Synthesis of Biodiesel. *Applied Mechanics and Materials*, v. 108, p. 159-166, 2012.
- HEATH, R. J.; WHITE, S. W.; ROCK, C. O. Lipid biosynthesis as a target for antibacterial agents. *Progress in Lipid Research*, v. 40, p. 467-497, 2001.

- HONG, W.-K.; RAIKHWADA, D.; SEO, P.-S.; PARK, S.-Y.; HUR, B.-K.; KIM, C. H.; SEO, J.-W. Production of Lipids Containing High Levels of Docosahexaenoic Acid by a Newly Isolated Microalga, *Aurantiochytrium* sp KRS101. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 164, p. 1468-1480, 2011.
- IASSONOVA, D. R.; HAMMOND, E. G.; BEATTIE, S. E. Oxidative stability of polyunsaturated triacylglycerols encapsulated in oleaginous yeast. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 85, p. 711-716, 2008.
- JACOB, Z. Linear growth and lipid Synthesis in the oleaginous yeast *Rhodotorula gracilis*. *Folia Microbiologica*, v. 37, p. 117-121, 1992.
- KARATAY, S. E.; DONMEZ, G. Improving the lipid accumulation properties of the yeast cells for biodiesel production using molasses. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 7988-7990, 2010.
- KAVA - CORDEIRO, V.; LUNA - ALVES - LIMA, E. A.; AZEVEDO, J. L. Survival and mutant production induced by mutagenic agents in *Metarhizium anisopliae*. *Scientia Agricola*, v. 52, p. 548-554, 1995.
- KELLER, B.; ZOLZER, F.; KIEFER, J. Mutation induction in haploid yeast after split-dose radiation exposure. II. Combination of UV-irradiation and X-rays. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 43, p. 28-35, 2004.
- KUHAJDA, F. P. Fatty-acid synthase and human cancer: New perspectives on its role in tumor biology. *Nutrition*, v. 16, p. 202-208, 2000.
- LANG, X.; DALAI, A. K.; BAKHSHI, N. N.; REANEY, M. J.; HERTZ, P. B. Preparation and characterization of bio-diesels from various bio-oils. *Bioresource Technology*, v. 80, p. 53-62, 2001.
- LEWIS, T.; NICHOLS, P. D.; MCMEEKIN, T. A. Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid producing microheterotrophs. *Journal of Microbiological Methods*, v. 43, p. 107-116, 2000.

- LI, Q.; DU, W.; LIU, D. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 80, p. 749-756, 2008.
- LI, Y.; ZHAO, Z.; BAI, F. High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 41, p. 312-317, 2007.
- LI, Y. H.; LIU, B.; SUN, Y. Screening of oleaginous yeasts for broad-spectrum carbohydrates assimilating capacity. *Chinese Journal of Biotechnology*, v. 25, p. 43-48, 2005.
- LIU, B.; ZHAO, Z. Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 82, p. 775-780, 2007.
- MA, F. R.; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. *Bioresource Technology*, v. 70, p. 1-15, 1999.
- MADIGAN, M. T., MARTINKO, J.M., PARKER, J. Microbiologia de Brok. Biología de los microorganismos. *In: HALL, P. (ed.)*, 2004.
- MANIRAKIZA, P.; COVACI, A.; SCHEPENS, P. Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and modified Bligh & Dyer extraction methods. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 14, p. 93-100, 2001.
- MENG, X.; YANG, J.; XU, X.; ZHANG, L.; NIE, Q.; XIAN, M. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*, v. 34, p. 1-5, 2009.
- MILLER, R. V.; JEFFREY, W.; MITCHELL, D.; ELASRI, M. Bacterial responses to ultraviolet light. *Asm News*, v. 65, p. 535-541, 1999.
- MORETON, R. S. Technical and economic aspects and feasibility of single cell oil production using yeast technology. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v. 64, p. 1250-1251, 1987.

- NELSON, D. L.; COX, M. M. 3*Lehninger Princípios de bioquímica*, New York, W. H. Freeman and Company. 2002.
- NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry*, v. 153, p. 375-380, 1944.
- PAN, L.-X.; YANG, D.-F.; LI, S.; WEI, L.; CHEN, G.-G.; LIANG, Z.-Q. Isolation of the Oleaginous Yeasts from the Soil and Studies of Their Lipid-Producing Capacities. *Food Technology and Biotechnology*, v. 47, p. 215-220, 2009.
- PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 113, p. 1031-1051, 2011a.
- PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential applications. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 113, p. 1052-1073, 2011b.
- PENG, X.; CHEN, H. Hemicellulose sugar recovery from steam-exploded wheat straw for microbial oil production. *Process Biochemistry*, v. 47, p. 209-215, 2012.
- PENG, X. W.; CHEN, H. Z. Single cell oil production in solid-state fermentation by *Microsphaeropsis sp* from steam-exploded wheat straw mixed with wheat bran. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 3885-3889, 2008.
- PIGATTO, G. *Irradiação UV em Xanthomonas campestris pv. campestris visando a produção da goma xantana*. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista. 2008.
- RATLEDGE, C. Microorganisms for lipid *Acta Biotechnol*, v. 11, p. 429-438, 1991.
- RATLEDGE, C. Single Cell Oils - have they a biotechnological future? *Trends in Biotechnology*, v. 11, p. 278-284, 1993.
- RATLEDGE, C. Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. *Biochem. Soc. Transac*, v. 30, p. 1047-1050, 2002.

- RATLEDGE, C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimie*, v. 86, p. 807-815, 2004.
- RATLEDGE, C.; COHEN, Z. Microbial and algal oils: Do they have a future for biodiesel or as commodity oils? *Lipid Technology*, v. 20, p. 155-160, 2008.
- RATLEDGE, C.; WYNN, J. P. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Advances in Applied Microbiology*, Vol 51, v. 51, p. 1-51, 2002.
- SAENGE, C.; CHEIRSILP, B.; SUKSAROGUE, T. T.; BOURTOOM, T. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. *Process Biochemistry*, v. 46, p. 210-218, 2011.
- SATOSHI, Ô. The Antibiotic Cerulenin, a Novel Tool for Biochemistry a an Inhibitor of fatty Acid Synthesis. *Americal Society for Microbiology*, v. 40, p. 681-697, 1976.
- SAXENA, V. S., CD.; BHAGAT, SD.; SAINI VS, ADHIKARI, DK. Lipid and fatty acid biosynthesis by *Rhodotorula minuta*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 74, p. 501-505, 2008.
- SHEEHAN, J.; CAMOBRECO, V.; DUFFIELD, J.; GRABOSKI, M.; SHAPOURI, H. Life cycle inventory of biodiesel and petroleum diesel for use in an urban bus. *Final report, National Renewable Energy Laboratory, NREL/SR-580-24089 UC Category 1503*, v., p., 1998.
- SOMOGYI, M. A NEW REAGENT FOR THE DETERMINATION OF SUGARS. *Journal of Biological Chemistry*, v. 160, p. 61-68, 1945.
- SRIENC, F.; ARNOLD, B.; BAILEY, J. E. Characterization of intracellular accumulation of poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) in individual cells of *Alcaligenes eutrophus* H16 by flow cytometry. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 26, p. 982, 1984.
- VICENTE, G.; BAUTISTA, L. F.; RODRIGUEZ, R.; GUTIERREZ, F. J.; SADABA, I.; RUIZ-VAZQUEZ, R. M.; TORRES-MARTINEZ, S.; GARRE, V. Biodiesel production from

- biomass of an oleaginous fungus. *Biochemical Engineering Journal*, v. 48, p. 22-27, 2009.
- VICENTE, G.; MARTINEZ, M.; ARACIL, J. Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts systems. *Bioresource Technology*, v. 92, p. 297-305, 2004.
- WANG, J. F.; LI, R. M.; LU, D.; MA, S.; YAN, Y. P.; LI, W. J. A quick isolation method for mutants with high lipid yield in oleaginous yeast. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 25, p. 921-925, 2009.
- WILD, R.; PATIL, S.; POPOVIC, M.; ZAPPI, M.; DUFRECHE, S.; BAJPAI, R. Lipids from *Lipomyces starkeyi*. *Food Technology and Biotechnology*, v. 48, p. 329-335, 2010.
- XIONG, W.; LI, X. F.; XIANG, J. Y.; WU, Q. Y. High density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 78, p. 29-36, 2008.
- XUE, F. Y.; ZHANG, X.; LUO, H.; TAN, T. W. A new method for preparing raw material for biodiesel production. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 1699-1702, 2006.
- ZHAO, X.; KONG, X.; HUA, Y.; FENG, B.; ZHAO, Z. Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 110, p. 405-412, 2008.
- ZHAO, X.; WU, S.; HU, C.; WANG, Q.; HUA, Y.; ZHAO, Z. K. Lipid production from Jerusalem artichoke by *Rhodospiridium toruloides* Y4. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 37, p. 581-585, 2010.