



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Engenharia Química

HELBERTH JÚNNIOR SANTOS LOPES

**ESTRATÉGIAS DE ADAPTAÇÃO E DE CULTIVO DE *Rhodotorula toruloides*  
VISANDO PRODUÇÃO DE ÓLEO MICROBIANO A PARTIR DE  
HIDROLISADOS HEMICELULÓSICOS**

CAMPINAS  
2020

HELBERTH JÚNNIOR SANTOS LOPES

ESTRATÉGIAS DE ADAPTAÇÃO E DE CULTIVO DE *Rhodotorula toruloides*  
VISANDO PRODUÇÃO DE ÓLEO MICROBIANO A PARTIR DE  
HIDROLISADOS HEMICELULÓSICOS

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia  
Química da Universidade Estadual de  
Campinas como parte dos requisitos exigidos  
para obtenção do título de Doutor em  
Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. EVERSON ALVES MIRANDA

Co-orientadora: Dra. NEMAILLA BONTURI

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À  
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA  
PELO ALUNO HELBERTH JÚNNIOR  
SANTOS LOPES E ORIENTADO PELO  
PROF. DR. EVERSON ALVES MIRANDA.

---

Prof. Dr. Everson Alves Miranda

CAMPINAS  
2020

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura  
Luciana Pietrosanto Milla - CRB 8/8129

L881e Lopes, Helberth Júnior Santos Lopes, 1989-  
Estratégias de adaptação e de cultivo de *Rhodotorula toruloides* visando produção de óleo microbiano a partir de hidrolisados hemicelulósicos / Helberth Júnior Santos Lopes. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Everson Alves Miranda.

Coorientador: Nemailla Bonturi.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Adaptação. 2. Inibidores. 3. Cana-de-açúcar. 4. Eucalipto. 5. Carotenoides. I. Miranda, Everson Alves, 1959-. II. Bonturi, Nemailla, 1985- III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Adaptation and cultivation strategies of *Rhodotorula toruloides* for the production of microbial oil from hemicelulosic hydrolysates

**Palavras-chave em inglês:**

Adaptation

Inhibitors

Sugarcane

Eucalyptus

Carotenoids

**Área de concentração:** Engenharia Química

**Titulação:** Doutor em Engenharia Química

**Banca examinadora:**

Everson Alves Miranda [Orientador]

William James Nogueira Lima

Adriano Pinto Mariano

Sindelia Freitas Azzoni

Roberto da Silva

**Data de defesa:** 20-03-2020

**Programa de Pós-Graduação:** Engenharia Química

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-2864-4038>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/4609700303066477>

Folha de Aprovação da Defesa de Tese de Doutorado do aluno Helberth Júnior Santos Lopes, e aprovada em 20 de março de 2020 pela comissão examinadora da defesa constituída pelos doutores:

Prof. Dr. Everson Alves Miranda - Presidente e Orientador  
(FEQ / UNICAMP)

Dra. Sindélia Freitas Azzoni  
Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais

Dr. William James Nogueira Lima  
Instituto de Ciências Agrárias / UFMG - videoconferência

Dr. Roberto da Silva  
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas/UNESP  
Videoconferência

Prof. Dr. Adriano Pinto Mariano  
FEQ / UNICAMP

A Ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Dedico este trabalho ao meu irmão Paulo (*in memoriam*).

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmã, pelo carinho e apoio incondicional.

Ao Professor Everson, por me dar oportunidades que eu jamais imaginei ter, por acreditar em mim, pela amizade e pelo zelo para que eu pudesse ser o melhor de mim. Agradeço também, por ser um companheiro ferrenho de torcida pelo Cruzeiro.

À Dra. Nemailla Bonturi pela confiança, pela amizade e por ser peça fundamental na minha evolução durante estes anos na Unicamp.

Aos Professores Ângela Moraes, Tereza Zangirolami, Sindelia Freitas, William James, Thiago Basso, Roberto da Sila e Adriano Mariano pelas preciosas contribuições científicas ao longo da construção deste trabalho.

À querida Elizene, por todo apoio no início da minha jornada como Engenheiro Químico.

Ao Professor William James, um dos principais responsáveis por eu me aventurar em pesquisa científica.

Ao meu irmão Francisco Carlos, pela amizade sincera e apoio constante.

À Ellen, por todo carinho e apoio em todas as horas.

A Vitor e Marcos pela amizade e boas conversas.

Aos colegas do DEMBio, pelos bons momentos e apoio durante esses anos.

Ao LRAC, em especial ao Hugo, por todo apoio técnico e atenção durante as análises.

À Dra. Sindélia Freitas e ao Prof. Silvio Silvério pelas valiosas doações de hidrolisado.

Aos órgãos de pesquisa e aprimoramento CNPq, FAPESP (Processo nº 2016/10636-8) e Dora Plus pelo fomento que contribuiu para viabilização deste trabalho.

À FEQ por prover as melhores condições possível para conclusão deste trabalho.

To Dr. Petri-Jaan, for the unique opportunity and for all the knowledge you shared with me.

To everyone from Synlab at University of Tartu who supported me during my staying in Estonia.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Processo nº 152033/2015-7).

## RESUMO

Uma das soluções para o desenvolvimento sustentável é a utilização de biocombustíveis, dentre eles o biodiesel. Todavia, o biodiesel ainda não é um combustível totalmente sustentável e viável economicamente devido seu alto custo de produção e uso de fontes alimentícias como matéria-prima, principalmente óleo vegetal. Esta situação pode ser contornada pela substituição do óleo vegetal por óleo de origem microbiana. Entretanto, a obtenção de óleo microbiano ainda é mais dispendiosa quando comparado ao óleo vegetal, devido principalmente à utilização de substratos convencionais de alto custo (principalmente glicose). A utilização de hidrolisados hemicelulósicos é uma alternativa mais barata que estes substratos convencionais. No entanto, hidrolisados hemicelulósicos podem conter inibidores que afetam o desenvolvimento microbiano e contribuem para baixos conteúdos lipídicos. Assim sendo, a obtenção de levedura capaz de se desenvolver nestes hidrolisados pode contribuir para viabilização da produção de biodiesel a partir de óleo microbiano. A adaptação evolutiva de laboratório (ALE) é uma estratégia para obtenção de cepas robustas. Entretanto não há metodologia estabelecida para esta técnica, havendo uma dualidade no tocante a se executar a ALE com ou sem seleção de clones. O objetivo deste trabalho foi realizar a ALE da levedura *Rhodotorula toruloides* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço da cana-de-açúcar contendo altas concentrações de inibidores, através de duas estratégias, com e sem seleção de clones utilizando um critério para passagem de cepas a concentrações mais elevadas de hidrolisado: a taxa específica de crescimento máxima. Estudou-se ainda, a possibilidade de uso da fração hemicelulósica de eucalipto como fonte de carbono e efeito de substratos e razão C/N no cultivo contínuo desta levedura. As duas estratégias de ALE foram efetivas. Entretanto, a cepa obtida na ALE com cultura heterogênea (R<sub>th</sub>) apresentou valores de parâmetros cinéticos e de produtividade superiores às cepas parental e à obtida por ALE com seleção de clones (R<sub>tc</sub>). A R<sub>th</sub> apresentou  $\mu_{\max}$  55% superior em relação a cepa parental e maiores produção celular e conteúdo lipídico (6,51 g/l e 60%, respectivamente). Somado a isto, um cultivo da cepa R<sub>th</sub> em biorreator de tanque agitado utilizando hidrolisado hemicelulósico alcançou conteúdo lipídico de 58,2%. Confirmou-se a possibilidade da produção lipídica por R<sub>th</sub> cultivada em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto, alcançando-se relativo alto conteúdo lipídico 64,2%. Estudos em

modo turbidostato mostraram que os perfis de produção de biomassa e lipídios se alteraram de acordo com o substrato (xilose, glicerol ou ácido acético) e a razão molar C/N utilizada (60, 80, 100, 120). Os cultivos com ácido acético favoreceram a produção de biomassa (rendimento de 0,473 g/g). Já os cultivos realizados com glicerol proporcionou maior produtividade específica de lipídios (0,085 g/(g·h)). Cultivos contínuos com xilose apresentaram maior conteúdo lipídico (60%) e de carotenoides dentre todos os cultivos em turbidostato. Assim, este trabalho adaptou a levedura *R. toruloides* em duas estratégias com sucesso, levantou a possibilidade de utilização da fração hemicelulósica de eucalipto ou de bagaço da cana de açúcar como fonte de carbono para o cultivo de *R. toruloides* e estudou estratégias de cultivo com intuito de se alcançar maiores rendimentos lipídicos.

**Palavras chave:** *Rhodotorula toruloides*, adaptação hidrolisado hemicelulósico, inibidores, heterogênea, seleção de clones, cana de açúcar, eucalipto.

## ABSTRACT

One partial solution for sustainable development is the biofuel utilization, among them the biodiesel. But biodiesel is not yet a fully sustainable and economically viable fuel due to its high cost of production and use of food sources as raw material. This situation can be overcome by using microbial oil instead vegetal ones. However, microbial oil production is still more expensive when compared to vegetal oil, mainly due to the use of high cost conventional substrates (mainly glucose). The use of hemicellulose hydrolysates is a cheaper alternative to these conventional substrates but it may contain inhibitors that affect microbial development and contribute to low lipid content. Thus, obtaining yeast capable of growing in these hydrolysates can contribute to the viability of biodiesel production from microbial oil. Adaptive laboratory evolution (ALE) is a strategy to obtain a robust yeast strain. However, there is no established methodology for this technique, with a duality regarding the its execution, with or without clone selection. The present work aimed to perform this ALE of the yeast *Rhodotorula toruloides* in sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate containing high concentrations of inhibitors using strategies with and without clone selection, and a criterion for passing strains to highest concentrations of hydrolysate in media: the specific maximum growth rate. The possibility of using the hemicellulose fraction of eucalyptus as a carbon source and the effect of substrates and C/N ratio in the continuous cultivation of this yeast were also studied. The two ALE strategies were effective. The strain obtained in ALE with heterogeneous culture (Rth) showed higher kinetic values and productivity values than both parental strain and the strain obtained with ALE with clone selection (Rtc). Rth showed  $\mu_{\max}$  55% higher in relation to parental strain and higher cell production and lipid content (6.51 g/l and 60%, respectively). Moreover, a Rth cultivation in agitated tank bioreactor using hemicellulosic hydrolyzate reached a lipid content of 58.2%. The possibility of lipid production by Rth cultivated in eucalyptus hemicellulosic hydrolyzate was confirmed, with a relative high lipid content of 64.2%. The possibility of lipid production by *R. toruloides* cultivated in eucalyptus hemicellulose hydrolysate was confirmed, reaching a relative high lipid content of 50%. Turbidostat mode studies showed that the biomass and lipid production profiles changed according to the substrate (xylose, glycerol or acetic acid) and the applied C/N ratio (60, 80,

100, 120). Continuous cultivation with acetic acid favored biomass production (yield of 0.473 g/g). Cultivations carried out with glycerol in turbidostat mode provided higher specific lipid productivity (0.085 g/(g·h)). Continuous cultivations using xylose resulted in the highest lipid content (60%) and carotenoids production. Thus, this work was successful in adapting the *R. toruloides* with two ALE strategies, raised the possibility of using the hemicellulose fraction of eucalyptus or sugarcane bagasse as a carbon source for the cultivation of *R. toruloides* and studied cultivation strategies in order to achieve higher lipid yields.

**Keywords:** *R. toruloides*, adaptation, hemicellulose hydrolysate, inhibitors, heterogeneous, clone selection, sugarcane bagasse, eucalyptus.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ACC: acetil-CoA desidrogenase
- ALE: adaptação evolutiva de laboratório, acrônimo para *adaptive laboratory evolution*.
- ALEc: adaptação evolutiva de laboratório com seleção de clones
- ALEh: adaptação evolutiva de laboratório com seleção de clones
- AMP: adenosina monofosfato
- C/N: razão carbono/nitrogênio
- C/P: razão carbono/fósforo
- CMT: citrato malato translocase
- DAG: diacilglicerol
- EAR: enoil-ACP-redutase
- ER: retículo endoplasmático rugoso
- FAS: ácido graxo sintetase
- G3P: glicerol-3-fosfato
- G3PAT: glicerol-3-fosfato acetil transferase
- HHBC: hidrolisado hemicelulósico de bagaço da cana de açúcar
- HHBCc: hidrolisado hemicelulósico de bagaço da cana de açúcar do estudo comparativo
- HHBCd: hidrolisado hemicelulósico de bagaço da cana de açúcar dopado com inibidores
- HHBCb: hidrolisado hemicelulósico de bagaço da cana de açúcar utilizado em biorreator
- HHE: hidrolisado hemicelulósico de eucalipto
- HHEc: hidrolisado hemicelulósico de eucalipto concentrado
- IDH: isocitrato desidrogenase
- MD: malato desidrogenase
- ME1: enzima málica
- Mtoe: Milhões de toneladas de equivalente de petróleo
- OD: densidade óptica
- PAP: fosfatidato fosfatase
- qx: produtividade de células
- r<sub>lip</sub>: produtividade específica de lipídios
- S: concentração de substrato
- S:L: razão mássica sólido:líquido

TAG: triacilglicerol

TD: tempo de duplicação

X: concentração celular

Y<sub>ls</sub>: rendimento lipídico por substrato consumido

Y<sub>lx</sub>: rendimento lipídico em relação à massa celular

YPD: *yeast potato dextrose*

Y<sub>xs</sub>: rendimento celular por substrato consumido

## SUMÁRIO

1.	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
1.1.	Apresentação.....	17
1.2.	Uso de óleo microbiano na produção de biodiesel e seus desafios .....	17
1.3.	Objetivo .....	20
1.4.	Desafios científicos e tecnológicos.....	21
1.5.	Plano de trabalho .....	22
1.6.	Apresentação da estrutura do texto.....	24
2.	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	25
2.1.	Biorrefinaria e biodiesel .....	25
2.2.	Lipídio microbiano e sua produção por leveduras através da via <i>ex novo</i> .....	29
2.3.	Produção de SCO por leveduras a partir de biomassa lignocelulósica: microrganismos e substratos .....	34
2.4.	<i>Rhodotorula toruloides</i> : plataforma biológica de interesse industrial.....	35
2.5.	Fontes nacionais de hemicelulose potenciais para cultivo de <i>R. toruloides</i> .....	37
2.6.	Composição da matriz lignocelulósica .....	39
2.7.	Compostos tóxicos presentes no hidrolisado e seus mecanismos de inibição.....	40
2.8.	Adaptação evolutiva de laboratório (ALE).....	42
2.8.1.	ALE como estratégia geral .....	42
2.8.2.	Modos de condução da ALE.....	45
2.8.3.	Conceitos de ALE de curto e longo prazo .....	46
2.9.	Resumo da base para desenvolvimento do trabalho .....	48
3.	<b>ADAPTAÇÃO EVOLUTIVA DE LABORATÓRIO DE <i>R. toruloides</i> EM HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DA CANA DE AÇÚCAR CONTENDO ALTAS CONCENTRAÇÕES DE INIBIDORES</b> .....	50

3.1.	Introdução .....	50
3.2.	Materiais e métodos .....	51
3.2.1.	Cepa parental utilizada na adaptação evolutiva de laboratório .....	51
3.2.2.	Hidrolisados utilizados durante as ALE .....	51
3.2.3.	Meios basal, controle e sólido para seleção de clones.....	52
3.2.4.	Adaptação evolutiva de laboratório (ALE).....	52
3.2.5.	Adaptação evolutiva de laboratório com cultura heterogênea (ALEh) .....	54
3.2.6.	Adaptação evolutiva de laboratório com seleção de clones .....	55
3.2.7.	Estudo comparativo entre as cepas adaptadas e a parental.....	55
3.2.8.	Outros materiais.....	56
3.2.9.	Métodos analíticos .....	56
3.3.	Resultados e discussão.....	57
3.3.1.	Seleção do hidrolisado desafio para condução das ALE .....	57
3.3.2.	Adaptação evolutiva de laboratório com cultura heterogênea (ALEh) .....	58
3.3.3.	Adaptação evolutiva de laboratório com seleção de clones (ALEc) .....	61
3.3.4.	Estudo comparativo entre as cepas adaptadas e a parental em HHBCc .....	65
3.4.	Conclusão .....	73
4.	<b>HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE <i>Eucalyptus urograndis</i> COMO SUBSTRATO PARA cepas de <i>R. toruloides</i> ADAPTADAS EM HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DA CANA DE AÇÚCAR .....</b>	<b>75</b>
4.1.	Introdução .....	75
4.2.	Materiais e métodos .....	76
4.2.1.	Amostras de <i>E. urograndis</i> .....	76
4.2.2.	Microrganismos .....	76
4.2.3.	Reator para extração da fração hemicelulósica de eucalipto .....	76
4.2.4.	Outros materiais.....	77

4.2.5. Extração da hemicelulose de cavacos de madeira .....	77
4.2.6. Cultivo das cepas adaptadas .....	78
4.2.7. Métodos analíticos .....	78
4.3. Resultados e discussão.....	79
4.4. Cultivos de cepas adaptadas de <i>R. toruloides</i> em hidrolisados hemicelulósicos de eucalipto .....	83
4.5. Conclusão .....	90
<b>5. CEPAS DE <i>R. toruloides</i> CULTIVADAS EM MODOS BATELADA E CONTÍNUO .....</b>	<b>91</b>
5.1. Introdução .....	91
5.2. Materiais e métodos .....	92
5.2.1. Cepa e inóculo .....	92
5.2.2. Biorreatores.....	92
5.2.3. Cultivos em turbidostato.....	93
5.2.4. Cultivo em batelada .....	93
5.2.5. Métodos analíticos .....	94
5.2.6. Métodos analíticos para os estudos em modo turbidostato .....	95
5.2.7. Métodos analítico para o estudo em modo Batelada .....	95
5.2.8. Equações utilizadas para cálculos de conversões e produtividade em modo turbidostato .....	95
5.3. Resultados e discussão.....	96
5.4. Cultivo em modo batelada da cepa Rth em HHBCb .....	96
5.4.1. Cultivos em modo turbidostado.....	98
5.4.2. Cultivo de <i>R. toruloides</i> com ácido acético como fonte de carbono .....	99
5.4.1. Cultivo de <i>R. toruloides</i> com glicerol como fonte de carbono .....	101
5.4.2. Cultivo de <i>R. toruloides</i> com xilose como fonte de carbono.....	102

5.4.3. Discussão geral dos resultados obtidos com o cultivo de <i>R. toruloides</i> em turbidostato .....	104
5.4.4. Conclusão .....	105
6. <b>DISCUSSÕES GERAIS</b> .....	107
7. <b>CONCLUSÕES</b> .....	110
8. <b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....	112
9. <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	113

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Apresentação

Nesta introdução discorre-se sobre as vantagens do uso do biodiesel e suas lacunas no âmbito de produção e comercialização de fontes energéticas e sustentabilidade, segue-se do objetivo do trabalho, plano de trabalho. Por último, uma explicação da estrutura do texto, apresentando os capítulos em que a presente tese foi dividida.

### 1.2. Uso de óleo microbiano na produção de biodiesel e seus desafios

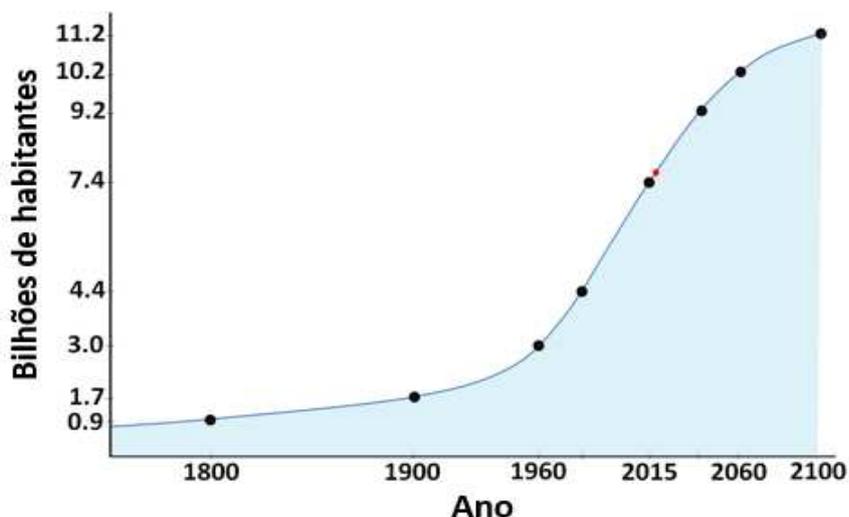
Projeções feitas pelo International Energy Outlook (2018) demonstram que o consumo energético em escala mundial pode aumentar em 28% de 2015 até 2040, resultando no inevitável maior consumo de combustíveis fósseis e, conseqüentemente, na intensificação de problemas intrínsecos a este consumo, em especial os danos ambientais. Devido a esta crescente demanda por energia bem como da grande dependência global por combustíveis fósseis, torna-se imprescindível a procura por alternativas que possam mudar este cenário. Grande parte dos estudos focados no desenvolvimento de fontes energéticas em andamento são embasados no conceito de bioenergia que, segundo Coleman e Stanturf (2006), significa qualquer energia produzida a partir de biomassa renovável de origem animal ou vegetal. Para se tornar uma realidade, estas fontes de bioenergia devem ser produzidas continuamente e possuírem matéria prima de relativo baixo custo, de maneira que permitam viabilidade econômica de sua produção e comercialização.

Frente a este cenário, pesquisas vêm sendo desenvolvidas na obtenção de energias renováveis como etanol de segunda geração (JUGWANTH; SEWSYNKER-SUKAI; GUEGUIM KANA, 2019), hidrogênio (VEERAMALINI *et al.*, 2019), metano (WANG, ZHI *et al.*, 2019) e biodiesel (CORDERO-RAVELO; SCHALLENBERG-RODRIGUEZ, 2018). Dentre estes desenvolvimentos, o biodiesel pode ser considerado em destaque, uma vez que já é uma realidade econômica com produção e distribuição ocorrendo em diversos países. Segundo a Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD/FAO, 2016) a produção mundial de biodiesel em 2025 pode superar os 40 bilhões de litros.

A produção nacional de biodiesel figura entre as maiores do mundo. De acordo com os últimos dados de produção acumulada relatados pelo Ministério de Minas e Energia (2019), em 2018 a produção de biodiesel no Brasil contabilizou mais de  $5,0 \times 10^6 \text{ m}^3$ . No acumulado de 2019 até o mês de setembro, a produção deste combustível já era 10% superior à do mesmo período de 2018. A expectativa é que esta produção aumente ainda mais, pois se espera que a adição de biodiesel ao diesel aumente gradualmente no decorrer dos anos.

Mesmo sendo uma fonte energética comercializada mundialmente, a produção de biodiesel ainda não compete economicamente com o diesel derivado do petróleo. Isto ocorre pelo fato de sua principal matéria prima, óleo vegetal, contabilizar de 70-85% do custo de produção (KITCHA; CHEIRSILP, 2011). Somado ao relativo alto custo do óleo vegetal, o cultivo de plantas oleaginosas no mundo não está acompanhando o constante crescimento do consumo de óleo vegetal para fins energéticos e alimentícios (SITEPU *et al.*, 2014). Tendo em mente o crescimento populacional (Figura 1.1), com conseqüente aumento da produção de alimentos, a utilização de fontes alimentícias para gerar combustíveis pode se tornar cada vez mais controversa e impraticável, principalmente no continente europeu, devido à menor disponibilidade de terras aráveis e demais fatores políticos. Além da competição com o setor alimentício, a produção de biodiesel a partir de plantas oleaginosas é limitada por uma série de fatores como vulnerabilidade ao clima, disponibilidade de terras aráveis e questões geopolíticas (DONOT *et al.*, 2014).

**Figura 1.1** - Projeção do crescimento populacional até o ano de 2100.



**Fonte:** Adaptado de Our World in Data (2020).

Para fazer frente às dificuldades ascendentes em relação à obtenção de matéria-prima oleaginosa, estudos estão sendo desenvolvidos com objetivo de obtenção do óleo

microbiano para produção de biodiesel. Quando comparado com o óleo vegetal, o lipídio de origem microbiana (chamado em inglês de *single cell oil*, SCO) pode ser vantajoso, pois sua produção não é afetada por mudanças climáticas e nem de estações, além de demandar menor tempo e área (ZHU; ZONG; WU, 2008).

Microrganismos oleaginosos são classificados como aqueles capazes de acumular acima de 20% de sua massa seca na forma de lipídios (RATLEDGE, 1982). Dentre os microrganismos oleaginosos pode-se citar as leveduras *Rhodotorula* sp. (BONTURI *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2015) e *Lipomyces* sp. (CALVEY *et al.*, 2016) que, além de fornecerem teores lipídicos relativamente altos, apresentam taxas de crescimento relativamente altas.

Apesar do grande número de estudos visando à produção lipídica por leveduras e demais microrganismos oleaginosos, a maioria destes estudos utiliza glicose de alta pureza como fonte de carbono. No entanto, a aplicação deste substrato para a obtenção de lipídeo microbiano em escala industrial é impraticável, uma vez que esta matéria prima pode contabilizar de 60-80% do custo total de produção (cerca de US\$ 500/t) (FEI *et al.*, 2011; KOUTINAS *et al.*, 2014). Com base em dados de 2016 fornecidos e reportados por Braunwald *et al.* (2016), a produção de biodiesel a partir de óleo microbiano continua dispendiosa em comparação com os óleos de origem vegetal. O preço do biodiesel produzido a partir do óleo de palma estava em torno de US\$0,60/l (excluindo impostos) e os produzidos a partir de óleo de microalga e levedura estimados em no mínimo US\$ 1,52/l e US\$ 2,07/l, respectivamente. Sendo assim, torna-se fundamental a minimização dos dispêndios relacionados à obtenção de substratos para se reduzir os custos de produção e tornar o biodiesel com base em lipídeos microbianos uma alternativa economicamente competitiva.

Neste intuito, pesquisas recentes vêm utilizando subprodutos agroindustriais como fonte de carbono para obtenção de óleo microbiano, tais como sorgo (MATSAKAS *et al.*, 2014), resíduos de indústria de bebidas (RYU *et al.*, 2013), soro de queijo (AROUS *et al.*, 2016), resíduo do processamento de batata doce (SHEN, QI *et al.*, 2015), hidrolisado celulósico (LIU *et al.*, 2015), glicerol (DOBROWOLSKI *et al.*, 2016) e bagaço da cana de açúcar (XAVIER *et al.*, 2017). Analisando as principais culturas vegetais do Brasil, as frações hemicelulósicas de bagaço da cana-de-açúcar (BONTURI *et al.*, 2017) e de eucalipto (OSORIO-GONZÁLEZ *et al.*, 2019), esta última queimada nas indústrias de celulose e papel, têm potencial para serem aplicadas como substratos na produção de lipídeo microbiano, uma vez que são matérias primas abundantes e de relativo baixo custo.

Apesar da possibilidade de se obter grande quantidade de biomassa e aplicá-las como substrato para microrganismos oleaginosos, não se pode afirmar ainda que processos

baseados em óleo microbiano substituirão processos que utilizam óleo vegetal para produção de biodiesel. Um dos impasses é o microrganismo não assimilar efetivamente substratos não convencionais, como a xilose obtida da hemicelulose. Para agravar a situação, a xilose pode vir acompanhada de inibidores de crescimento microbiano liberados ou formados durante o processo de hidrólise, tais como furfural, 5-hidroximetilfurfural (HMF), ácido acético, siringaldeído, hidroxibenzaldeído e vanilina (ALMEIDA *et al.*, 2007; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000).

Estratégias como engenharia genética podem ser utilizadas para potencializar o microrganismo a ter maior resistência a inibidores e alta produtividade. Entretanto, esta técnica é dispendiosa, complexa e pode resultar em organismos com perdas indesejadas de funções básicas após modificação gênica (CHOE *et al.*, 2019). Outra técnica que pode viabilizar a utilização efetiva de substratos complexos e não convencionais é a adaptação evolutiva de laboratório de microrganismos (ALE, do inglês *adaptive laboratory evolution*; acrônimo comumente utilizado em literatura específica), técnica menos dispendiosa e complexa quando comparada com a engenharia genética. A ALE permite que microrganismos se adaptem a compostos antes considerados inertes ou nocivos, como substratos não convencionais e inibidores (SANDBERG *et al.*, 2019). Somado ao fato de ser um procedimento de menor interferência antropogênica ao microrganismo, esta técnica permite que funções já expressas ou antes silenciadas sejam paralelamente amplificadas e reativadas respectivamente. Todavia, não se tem metodologia pré-estabelecida para esta técnica com enfoque no ganho de resistência a inibidores, não havendo também consenso se a adaptação deve ser conduzida com cultivo heterogêneo ou por meio de seleção de clones.

### 1.3. Objetivo

O objetivo deste trabalho foi realizar a ALE da levedura *R. toruloides* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço da cana-de-açúcar contendo altas concentrações de inibidores, através de duas estratégias de adaptação – uma com seleção de clones e outra com cultura heterogênea (sem seleção de clones) – utilizando um critério para passagem de cepas a concentrações mais elevadas de hidrolisado: a taxa específica de crescimento máxima ( $\mu_{\max}$ )<sup>1</sup>.

Diferentes parâmetros cinéticos poderiam ser utilizados como critério para desenvolvimento da adaptação (exemplos: tempo e concentração celular). Entretanto, escolher

---

<sup>1</sup> Refere-se ao  $\mu_{\max}$  global, considerando-se o consumo de múltiplos substratos.

o  $\mu_{\max}$  garantiria que células atingiram uma maior concentração celular no menor tempo possível. Isto resultaria em maior produtividade, o que no aspecto industrial implica em menor capital fixo, visto que esta maior produtividade demandaria menor número de reatores e ou reatores de menor tamanho.

Crítérios como OD máxima (DÍAZ *et al.* 2018) ou tempo pré-definido (KUROSAWA; LASER; SINSKEY, 2015) para passagem das células também são utilizados para condução de ALE e também demonstraram ser eficazes; entretanto, diferente do método utilizado no presente trabalho, não fazem a imbricação dos fatores geração celular e tempo.

O presente trabalho está inserido no projeto temático “Da fábrica celular à biorrefinaria integrada Biodiesel-Bioetanol: uma abordagem sistêmica aplicada a problemas complexos em micro e macroescalas”. Os dados obtidos durante este doutorado alimentarão um sistema integrado de dados de simulação e otimização focado na produção de biodiesel a partir de óleo microbiano.

#### **1.4. Desafios científicos e tecnológicos**

Em relação à adaptação, os principais desafios foram o desenvolvimento de metodologia e proposta de critério adequado para se aplicar nesta pesquisa. O termo critério neste estudo refere-se ao parâmetro utilizado como indicador para início da próxima etapa da adaptação. Como o trabalho teve foco primário a obtenção de cepa com aptidão para crescer em hidrolisados com alto teor de inibidores, o critério adotado foi a taxa específica de crescimento máximo para dada situação de cultivo ( $\mu_{\max}$ ).

Outro desafio foi a obtenção de dados cinéticos devido ao fato de cada cultivo da ALE (renovação de meio e ou passagem para próxima etapa da adaptação) ter um novo comportamento, mesmo com procedimento padronizado (passagem para uma nova etapa somente após estabilização do  $\mu_{\max}$ ). Em função do ganho de aptidão durante a ALE, a cepa poderia apresentar diferentes tempos de fase lag em cada cultivo e, caso os dados de crescimento não fossem coletados corretamente em intervalos de tempo suficientemente curtos, o perfil cinético não seria obtido com devida acurácia. Sendo assim, foi necessário acompanhamento intensivo dos cultivos ao longo de toda execução das duas estratégias de ALE. A aquisição inadequada dos dados cinéticos poderia resultar em má interpretação e até mesmo erros em cascata no desenvolvimento da adaptação. Deste modo, nos períodos considerados críticos – pequenos intervalos de tempo antes da fase de aceleração e após a desaceleração – os dados foram obtidos de hora em hora com interferência mínima no cultivo

(tempo de amostragem menor que 1 min; alíquota mínima de 100 a 200 µl de um volume reacional contendo 50 ml de meio).

Outro desafio desta etapa de ALE foi a escassez de trabalhos que servissem de base comparativa. Até o momento, trabalhos envolvendo adaptação de *R. toruloides* em substratos não convencionais são poucos, podendo-se citar apenas o trabalho de Bonturi *et al.* (2017) e de Diaz *et al.* (2018). Há um grande número de trabalhos focados na adaptação evolutiva de microrganismos, entretanto a grande maioria destes estudos foram desenvolvidos com *Escherichia coli* (CHOE *et al.*, 2019; MADDAMSETTI; LENSKI; BARRICK, 2015) ou *Sacharomyces cerevisiae* (BELLISSIMI *et al.*, 2009; GONZALEZ-RAMOS *et al.*, 2016), microrganismos estes, com metabolismos distintos do observado em *R. toruloides* e outras espécies oleaginosas.

Em relação ao estudo com hidrolisado hemicelulósico de eucalipto, não se encontra na literatura uma metodologia padrão para extração seletiva da fração hemicelulósica em escala laboratorial. Para superar este problema, estudos de extração hidrotérmica foram executados com o intuito de definir a melhor condição de extração e obtenção do hidrolisado.

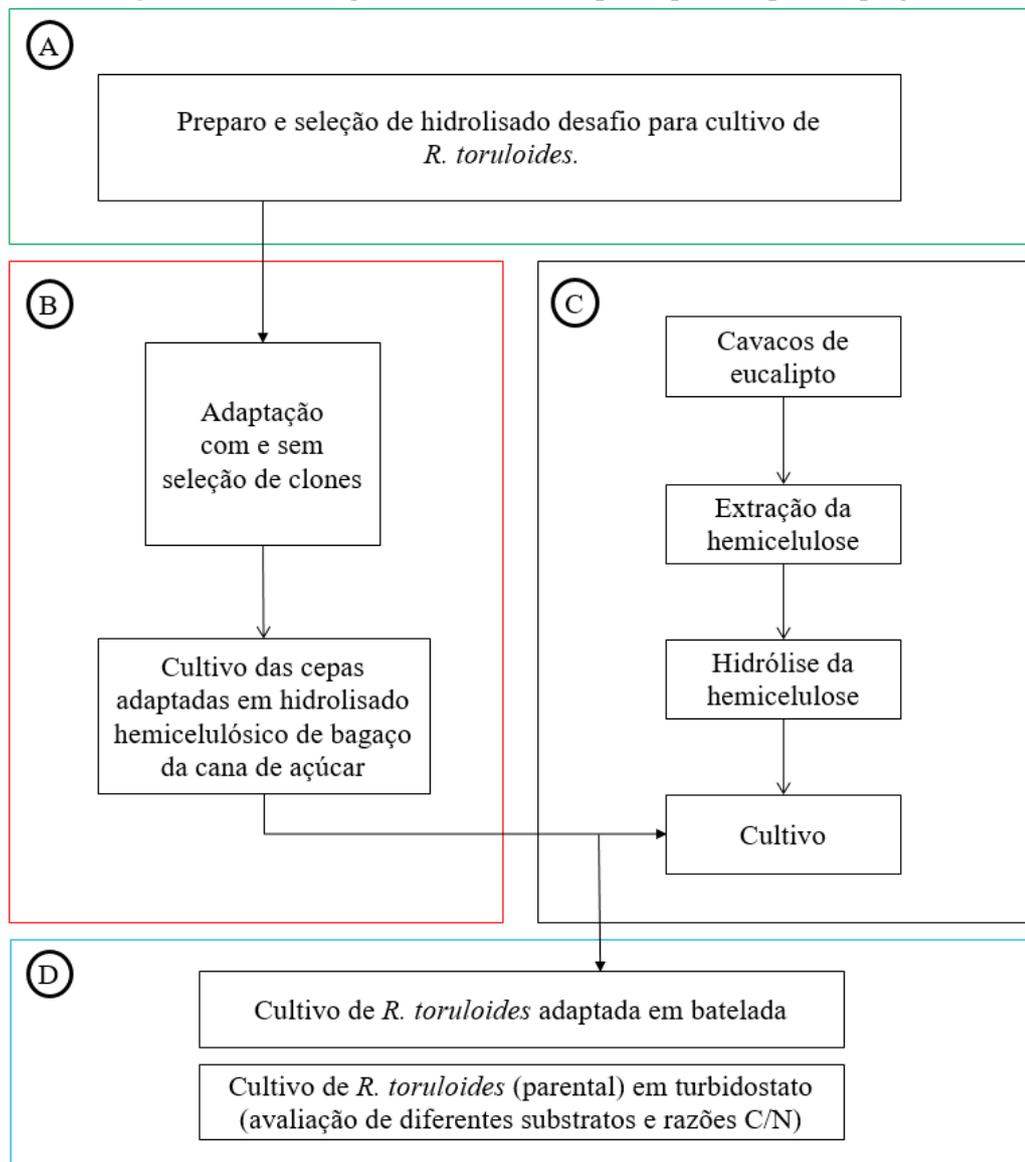
Estudos em batelada podem fornecer respostas em relação ao efeito de parâmetros escolhidos em relação a produtividade, seja ela de biomassa ou lipídios. Porém, este modo de cultivo sofre a influência de diversas variáveis ao mesmo tempo, principalmente cinéticas. Para superar este desafio e tentar entender especificamente o efeito da razão C/N de diferentes fontes de carbono na produção lipídica, foram feitos estudos em turbidostato, modo de cultivo em que variáveis, incluindo as cinéticas, são mantidas estáveis. Outro desafio do cultivo em modo turbidostato foi propor configuração operacional que exigisse o mínimo de intervenção no reator, causando assim menos distúrbios durante o cultivo da levedura. O sistema de alimentação foi composto por duas fontes distintas de substrato, uma contendo apenas fonte de carbono (alimentação 1) e a outra contendo fonte de carbono e nitrogênio com baixa razão C/N (alimentação 2). Desta maneira as diferentes razões C/N foram obtidas apenas alterando a proporção de alimentação 1 e 2 através de ajuste de vazão das bombas alimentadoras.

## 1.5. Plano de trabalho

As etapas deste trabalho estão esquematizadas na Figura 1.2.

O bloco A engloba a seleção do hidrolisado utilizado como pressão seletiva durante a ALE. Nesta etapa, amostras de hidrolisado hemicelulósico do bagaço da cana de açúcar (HHBC) foram dopadas com diferentes concentrações de inibidores e estes diferentes hidrolisados obtidos foram utilizados em cultivos distintos da cepa parental de *R. toruloides*. O

**Figura 1.2** - Fluxograma contendo as principais etapas do projeto.



hidrolisado que forneceu maior inibição ao crescimento da cepa parental foi escolhido como desafio para a ALE.

O bloco B apresenta a ALE em si. As adaptações foram executadas com duas estratégias de adaptação. Uma estratégia se baseou na seleção de clones durante a adaptação e a outra se baseou na adaptação com cultura heterogênea. O termo “clone” refere-se à colônia isolada que fora selecionada em cada etapa da ALE específica, sem, no entanto, se querer garantir com absoluta certeza que esta colônia se originou de apenas uma célula. As cepas obtidas foram comparadas em termos de produtividade celular e lipídica e parâmetros cinéticos com  $\mu_{\max}$  e fase lag em cultivos específicos. A cepa que apresentou melhores resultados foi escolhida para os estudos descritos nos blocos C e D.

O bloco C representa as etapas referentes aos estudos de extração da fração hemicelulósica de eucalipto e uso de seu hidrolisado (HHE) no cultivo das cepas adaptadas de *R. toruloides*. As primeiras atividades se deram por estudos de extração seletiva da fração hemicelulósica. Definido os parâmetros mais adequados de extração, os cultivos com HHE foram desenvolvidos.

O bloco D compreende as atividades relacionadas aos cultivos de *R. toruloides* em biorreator de tanque agitado em modo contínuo. Xilose, glicerol e ácido acético foram utilizados separadamente como substrato para *R. toruloides* sob diferentes razões C/N, partindo de um valor de 60 até 120. As condições que apresentaram melhores resultados em termos de produtividade foram utilizadas como parâmetros para cultivos em modo batelada-alimentada. Os resultados obtidos neste estudo também serviram como base para elaboração da modelagem metabólica da levedura *R. toruloides* e apresentados em Lopes *et al.* (2020). O cultivo em modo batelada utilizando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar concentrado foi executado com a melhor cepa obtida no bloco B.

## **1.6. Apresentação da estrutura do texto**

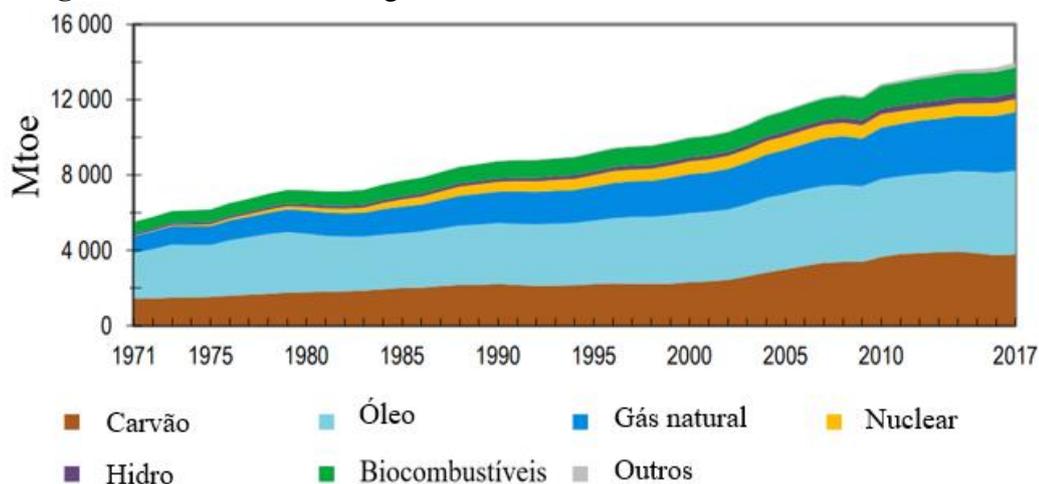
Este trabalho contém mais oito capítulos. Este trabalho segue com o capítulo 2 denominado “Revisão bibliográfica”, que aborda a literatura desde uma visão macro, em que é exposto o conceito e desafios das biorrefinarias, até uma visão micro, com destaque para a ALE como ferramenta eficaz e robusta para obtenção de microrganismos de interesses biotecnológicos e, discorrendo-se também, sobre o metabolismo das leveduras oleaginosas durante a síntese lipídica e efeito inibitório de alguns compostos presentes em hidrolisados hemicelulósicos. Em sequência, serão apresentados os itens “Materiais e métodos” e “Resultados e discussões” para cada um dos estudos divididos nos blocos apresentados na Figura 1.2, com capítulo 3 (bloco A e B), capítulo 4 (bloco C) e capítulo 5 (bloco D). Por final, serão apresentados os capítulos 6, “Discussão geral”; 7, “Conclusões” e 8 “Sugestões para trabalhos futuros”. Ao fim apresenta-se a seção “Referências bibliográficas”.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Biorrefinaria e biodiesel

As demandas por alternativas energéticas e processos cada vez mais sustentáveis vêm aumentando devido à crescente deterioração do meio ambiente em função da ação humana. O cenário ambiental está desta maneira, em grande parte, devido ao uso desenfreado de combustíveis fósseis, somado ao fato de países altamente industrializados e poluidores negligenciarem este cenário alarmante. A sociedade é extremamente dependente de derivados de recursos fósseis, seja na forma de petróleo, carvão ou gás natural, sendo eles aplicados em diversas áreas como geração de energia, combustíveis, aditivos químicos, polímeros, etc. Dados fornecidos pela Agência Internacional de Energia mostram que mais de 80% dos combustíveis consumidos no mundo são de origem fóssil e deste total 66% são direcionados para transportes e setor industrial (INTERNATIONAL ENERGY AGENCY, 2019) (Figura 2.1).

**Figura 2.1** - Demanda energética mundial e as diferentes fontes consumidas.



Fonte: Adaptado de <https://www.oecd.org/publications/key-world-energy-statistics-22202811>

Além disto, o consumo de energia e produtos químicos baseados no petróleo está crescendo em média 7% ao ano em virtude do crescimento populacional (MAITY, 2015). O setor de transportes é o que mais consome energia no mundo. Em 2018, o gasto energético em

razão dos transportes foi em torno de  $29,25 \times 10^{24}$  kJ, o que representa 28,6% de toda energia consumida no mundo ( $97,20 \times 10^{24}$  kJ) (INTERNATIONAL ENERGY OUTLOOK, 2018).

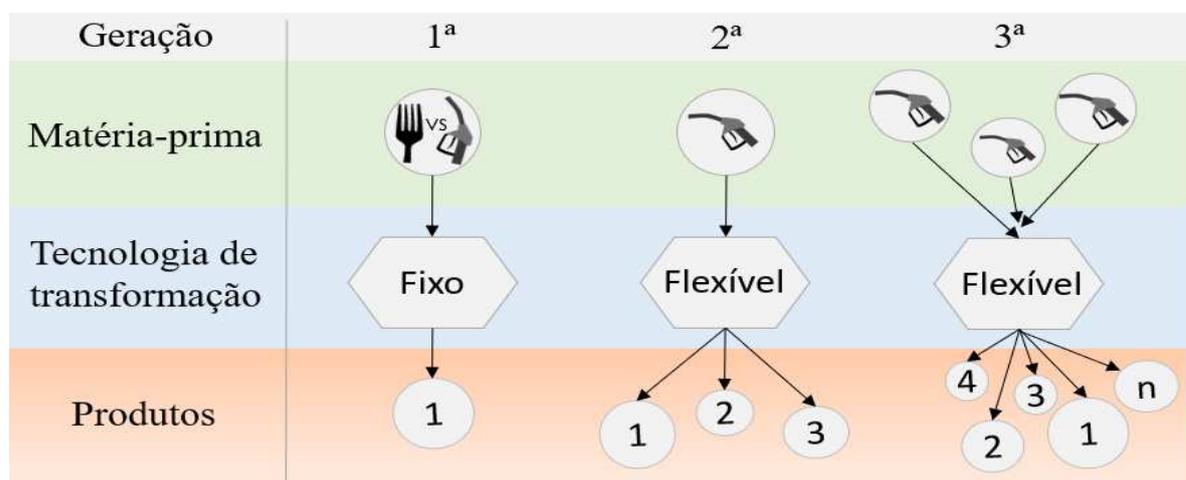
Com intuito de reduzir a dependência pelos combustíveis fósseis, governos de diversos países vêm desenvolvendo um conceito de indústria alternativa à petroquímica: as biorrefinarias (OHARA, 2003). As biorrefinarias surgiram no final da década de 90 motivadas pelos altos valores do petróleo e a tendência em se obter produtos não alimentícios a partir da biomassa vegetal (FERNANDO *et al.*, 2006; OHARA, 2003). Define-se biorrefinaria como uma instalação que integra processos de conversão de biomassa e equipamentos para produção de combustíveis, energia e produtos químicos a partir da biomassa vegetal (NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY, 2015). No entanto, este conceito inicialmente chamado de “biorrefinaria verde”, surgiu primariamente com a ideia de ser um complexo totalmente integrado, com sistema sustentável e composto de tecnologias limpas que proporcionasse obtenção energética e aplicação dos resíduos gerados como insumos para solos locais (KAMM; KAMM, 2004), ideia em prática há décadas, vide usinas sucroalcooleiras brasileiras, em que a vinhaça gerada é utilizada na fertirrigação dos solos como forma de reciclo de potássio e água para cultivo da cana-de-açúcar (FUESS; GARCIA; ZAIAT, 2018).

As biorrefinarias apresentam semelhanças processuais quando comparadas com as refinarias de petróleo. Na refinaria de petróleo, após tratamentos iniciais o óleo cru é segregado em diversos produtos durante etapa de destilação. Estes produtos são então processados por processos complexos para produção de combustíveis para uso doméstico, industrial e transporte, além de enxofre e material cru para uso na indústria petroquímica (MAITY, 2015). Assim como na refinaria de petróleo, na biorrefinaria a matéria prima (biomassa, glicerol, etc) também sofre tratamentos iniciais e objetiva-se gerar um leque de produtos diversificados. Entretanto, ao se comparar biomassa com óleo cru em termos de sua obtenção, ser renovável ou não (a relativo curto prazo), armazenamento, sustentabilidade e emissão de CO<sub>2</sub>, fica claro que há uma grande diferença entre as duas matérias primas, pois a biorrefinaria se baseia em matéria prima renovável e com menores perturbações no ciclo de carbono.

A classificação das biorrefinarias geralmente é baseada na tecnologia de conversão da biomassa e no espectro de bio-produtos obtidos (CHERUBINI *et al.*, 2009) (Figura 2.2). A  biorrefinaria de primeira geração  veio para demonstrar que a obtenção de energia a partir de biomassa vegetal seria viável em termos de produção e comercialização em larga escala. Porém, esta primeira geração faz uso de matéria prima também utilizada na indústria alimentícia, o que se tornou um desafio socioeconômico e ambiental para o setor, visto que este processo acarretaria no aumento dos preços dos alimentos (MONCADA; ARISTIZÁBAL;

CARDONA, 2016). Já as biorrefinarias de segunda geração surgiram com objetivo de superar este imbróglio com o setor alimentício, passando a não utilizar insumos alimentícios como matéria prima (NAIK *et al.*, 2010).

**Figura 2.2** - Gerações de biorrefinarias baseadas em matéria-prima, processos e produtos.



Fonte: Adaptado de Palmeros Parada; Osseweijer e Posada Duque (2017)

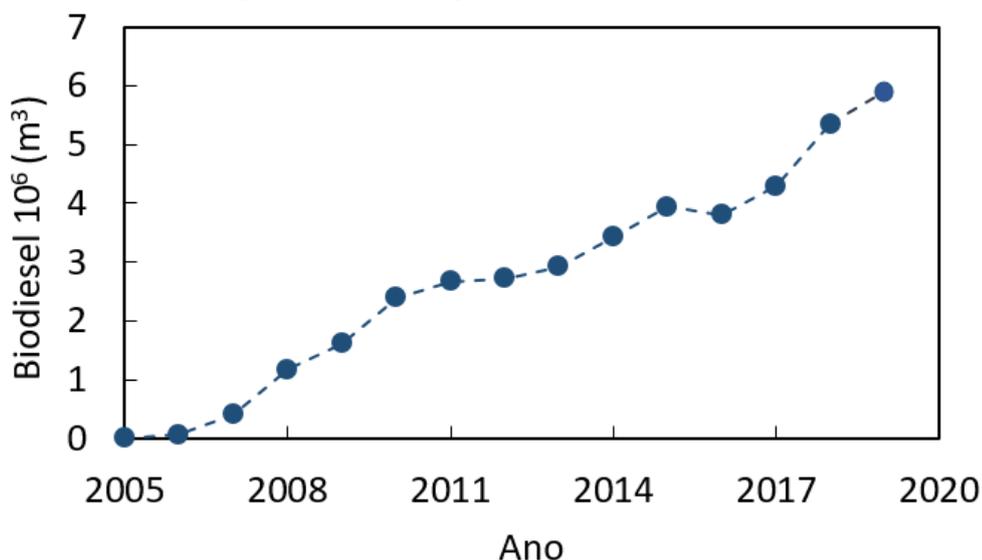
As biorrefinarias que utilizam microrganismos para produção de matéria prima e bioprodutos são classificadas como biorrefinarias de terceira geração, um modelo mais flexível que os anteriores e com potenciais vantagens, uma vez que este modelo pode produzir um leque maior de bioprodutos, ser ambientalmente menos nocivo e inteiramente renovável (AZAD *et al.*, 2015). Um novo conceito de biorrefinaria está surgindo, o de quarta geração, baseado na utilização de CO<sub>2</sub> como substrato para produção de bioenergia e bioprodutos (NAIK *et al.*, 2010).

Observa-se que as biorrefinarias de gerações mais avançadas não impactam na produção de alimentos, influenciam menos no ciclo de carbono, reutilizam cada vez mais os subprodutos gerados e possuem um leque maior de produtos. Entretanto, com o avanço destas gerações de biorrefinarias, há também o aumento na complexidade e nos custos de produção, sendo este último fator, um dos principais desafios a serem superados.

O Brasil possui destaque internacional no setor de biorrefinarias devido à expressiva produção de etanol de primeira e, recentemente, de segunda geração (BITTENCOURT *et al.*, 2019; CARPIO; SIMONE DE SOUZA, 2017) e biodiesel (DA SILVA CÉSAR *et al.*, 2019), este último sendo produzido e comercializado mundialmente sob leis de proteção e medidas regulatórias específicas, de forma a incentivar a sua produção para fazer frente ao diesel produzido a partir do petróleo (PETERS; THIELMANN, 2008). De acordo com os últimos dados de produção acumulada reportados pela Agência Nacional de Petróleo e Gás

(2020), em 2019 a produção anual de biodiesel totalizou  $5,89 \times 10^6 \text{ m}^3$ , o que em nível mundial está atrás apenas dos EUA. A expectativa é que esta produção aumente ainda mais (Figura 2.3), pois se espera que a adição mínima de biodiesel ao diesel passe de 11 para 15% (v/v) em 2023.

**Figura 2.3** - Produção nacional de biodiesel.

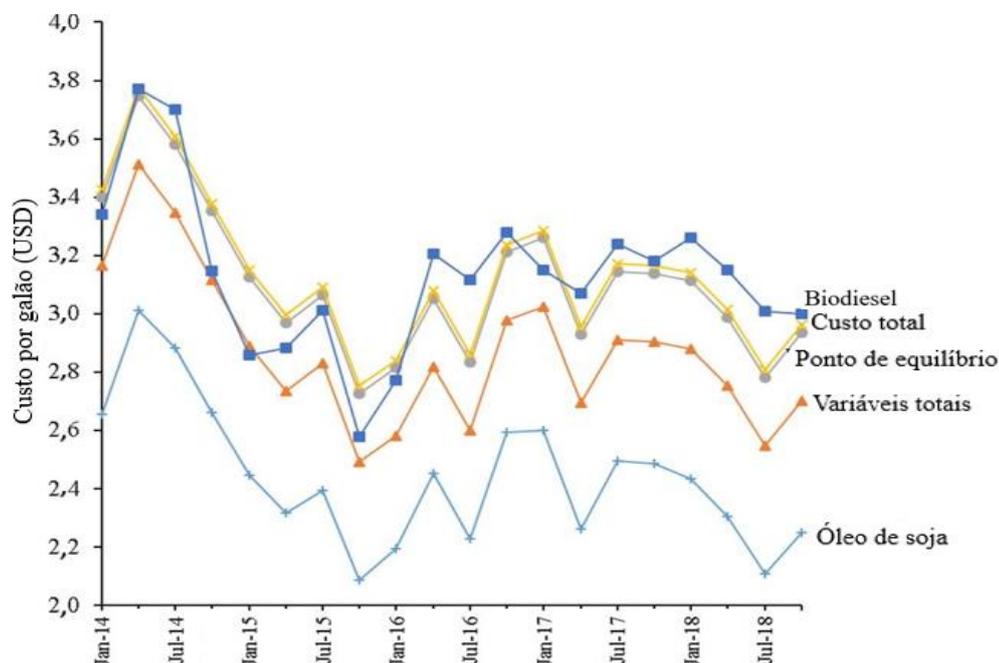


Fonte: Adaptado de <http://www.anp.gov.br/producao-de-biocombustiveis>

Mesmo sendo uma tecnologia em prática, a produção de biodiesel ainda não compete economicamente com o diesel derivado do petróleo sem as devidas medidas governamentais. Isto ocorre pelo fato de sua matéria prima ser principalmente óleo vegetal, que contabiliza de 70-85% do custo de produção (KITCHA; CHEIRSILP, 2011). De acordo com os dados apresentados na Figura 2.4, percebe-se que o preço do biodiesel está diretamente ligado ao preço do óleo vegetal. Quando somados todos os dispêndios, percebe-se que os custos variam de acordo com a tendência do preço da matéria prima. Além disso, os valores das outras variáveis são consideravelmente estáveis e o ponto de equilíbrio entre despesas e receitas neste processo está fortemente ligado a flutuações no preço do óleo vegetal.

O alto custo de produção de alguns biocombustíveis fez com que o conceito de biorrefinaria viesse a ser refutado por alguns autores, visto que, segundo eles, o conceito de sustentabilidade não é fundamentado exclusivamente em renováveis e dimensão ambiental (PFAU *et al.*, 2014). Para se alcançar o conceito de biorrefinaria sustentável, este setor deve ainda garantir principalmente a valorização de bioprodutos e segurança para o setor alimentício (AZAPAGIC; PERDAN, 2014; CAMBERO; SOWLATI, 2014).

**Figura 2.4** - Variação temporal do preço total de produção do biodiesel e de suas variáveis principais desde janeiro de 2014.



Fonte: Adaptado de Manaf *et al.* (2019).

## 2.2. Lipídio microbiano e sua produção por leveduras através da via *ex novo*

Fungos, leveduras e algas são produtores potenciais de lipídeos transesterificáveis a biodiesel, uma vez que muitos destes microrganismos sintetizam ácidos graxos com perfil similar aos de origem vegetal (KITCHA; CHEIRSILP, 2011). Além de produzirem óleos passíveis de transesterificação, este modo de obtenção de matéria prima não requer terras aráveis e é indiferente a condições climáticas, o que permite ser colocado em prática independentemente de condições geopolíticas. De acordo com Nicol, Marchand e Lubitz (2012), dentre 600 espécies de leveduras oleaginosas analisadas, menos de 5% foram capazes de acumular mais de 25% de sua massa seca na forma de corpos lipídicos (20% é o mínimo para um microrganismo ser considerado oleaginoso). Entretanto, espécies como *Rhodospiridium* sp., *Rhodotorula* sp. e *Lipomyces* sp. podem acumular até 67,5 % de conteúdo lipídico em relação a sua massa seca (LI; ZHAO; BAI, 2007).

Dentre os microrganismos oleaginosos, as leveduras possuem várias características positivas que vão além da produção de matéria-prima para produção de biodiesel. Algumas leveduras podem gerar ácidos graxos similares aos óleos de coco e palma, largamente utilizados na indústria alimentícia (SEVERO *et al.*, 2019), esteróis livres, carotenoides, açúcares-álcoois de cadeia longa, graxas, poliprenóis e isoprenóis quinonas (PATEL *et al.*, 2016). Somado a isto,

leveduras oleaginosas também podem ser utilizadas para produção de proteínas recombinantes de alto valor agregado (PARK *et al.*, 2019).

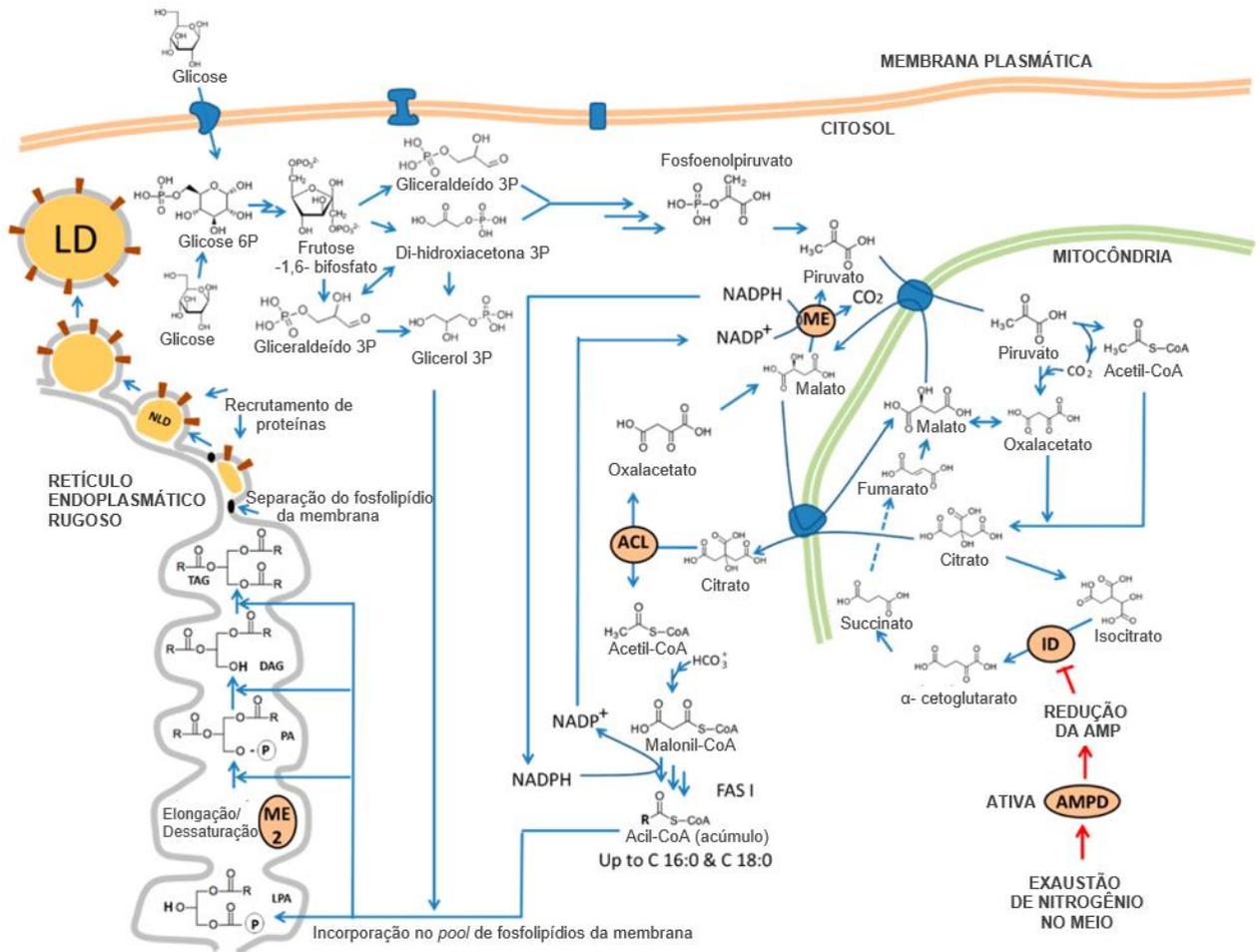
O acúmulo de lipídios nas leveduras oleaginosas pode ocorrer de duas maneiras: vias *de novo* ou *ex novo*. A via de síntese lipídica *ex novo* ocorre quando o microrganismo é cultivado em meio contendo substratos hidrofóbicos como ácidos graxos, óleos ou alcanos. As leveduras incorporam os substratos hidrofóbicos, segue-se uma hidrólise do material incorporado e transporte do material hidrolisado na forma de coenzima-A-tioester para via da lipogênese para formar lipídios neutros (PATEL; MATSAKAS, 2019).

Já a produção de corpos lipídicos pelo processo *de novo* ocorre quando o meio de cultivo é composto por substratos hidrofílicos (glicose, xilose, glicerol, ácido acético, etc.). O processo de produção *ex novo* geralmente é iniciado em virtude da depleção de algum nutriente como nitrogênio e fósforo, o que faz com que ocorra aumento das razões C/N (CALVEY *et al.*, 2016) ou C/P (WU *et al.*, 2011). A produção de lipídeos pelo processo *de novo* é o foco da grande maioria dos trabalhos com base na produção de lipídeos microbianos para subsequente produção de biocombustíveis.

A indução da lipogênese pelo método *ex novo* é, ocorre pela depleção de nutrientes como nitrogênio, fósforo, etc. Contudo, elevar a razão C/N através da limitação de nitrogênio vem sendo utilizada com maior frequência devido aos bons resultados obtidos (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2011). O processo pode ser dividido em quatro etapas a saber: fase de iniciação, em que o sistema responde ao desbalanço metabólico, fase de formação das cadeias de ácido graxo e as de formação e liberação dos corpos lipídicos (Figura 2.5).

O primeiro estágio pode ser definido como a etapa de produção de acetil-CoA e produção de NADPH. Tudo se inicia pela depleção de nitrogênio no meio; como resposta, a célula ativa a enzima AMP desaminase, o que reduz drasticamente a concentração de adenosina monofosfato (AMP). Esta redução na concentração da AMP resulta em diminuição ou até barramento da atividade da enzima isocitrato desidrogenase (*IDH*) e queda na produção de  $\alpha$ -cetogluturato no ciclo dos ácidos tricarbóxicos (TCA) (WYNN *et al.*, 2001). Em consequência disto, o isocitrato se acumula na mitocôndria e, para reverter este desequilíbrio, a enzima aconitase transforma o isocitrato em citrato, o que leva a um novo acúmulo, desta vez de citrato na mitocôndria. Sob ação da enzima citrato-malato translocase (*CMT*), o citrato é transportado para o citoplasma e ali ele é clivado para formação de oxalacetato e acetil-CoA por ação da enzima ATP:citrato liase (*ACL*), enzima presente exclusivamente em microrganismos oleaginosos (KOSA; RAGAUSKAS, 2011; ZHU *et al.*, 2012).

**Figura 2.5** – Principais etapas do acúmulo lipídico em leveduras oleaginosas.



**Fonte:** Adaptado de Garay, Boundy-Mills e German (2014).

O oxalacetato formado é reduzido a malato pela ação da malato desidrogenase (*MD*) que é, então, convertido em piruvato pela enzima málica (*MEI*). Esta última reação, além de gerar NADPH, é associada a uma série de reações paralelas (RODRIGUEZ-FROMETA et al., 2013). A primeira delas é a carboxilação do piruvato para formar oxalacetato pela piruvato carboxilase dentro da mitocôndria. O oxalacetato mitocondrial é reduzido para malato por ação da *MD*, transportado para fora da mitocôndria e descarboxilado para formar malato pela ação da *MEI*. Esta última reação necessita de NADP<sup>+</sup> e, como resultado, há a formação de NADPH. O NADPH atuará como o potencial de redução necessário para a conversão da acetil-CoA em ácidos graxos (para conversão de um mol de acetil-CoA em ácido graxo é necessária a formação de dois mols de NADPH). Sendo assim, as enzimas piruvato carboxilase, *MD* e *ME* podem ser consideradas um sistema de desidrogenação fundamental na lipogênese (ZHU et al., 2012).

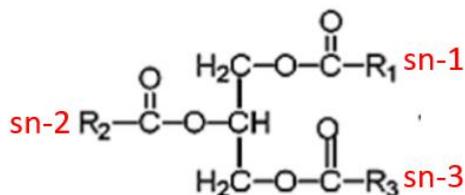
O segundo estágio pode ser definido como a fase de alongação, ou seja, a biossíntese dos ácidos graxos. A acetil-CoA, pela ação da enzima acetil-CoA carboxilase

(ACC), é convertida em malonil-CoA, que é então utilizado na síntese de ácidos graxos. Em leveduras, a ACC citosólica é codificada como ACC1, enquanto a mitocondrial é chamada de HFA1 (SCHWEIZER; HOFMANN, 2004). A conversão de grupos acetil (CH<sub>3</sub>-CO-) do malonil-CoA em ácidos graxos ocorre pela ação do complexo enzimático ácido graxo sintase denominado (FAS) (*fatty acid synthetase*). Este complexo é codificado por dois genes, FAS1 (subunidade β) e FAS2 (subunidade α) (TEHLIVETS; SCHEURINGER; KOHLWEIN, 2007). Este complexo enzimático contém seis sítios equivalentes capazes de sintetizar os ácidos graxos com um total de 42 unidades catalíticas e, dependendo da conformação estrutural deste complexo, a lipogênese pode ser conduzida com performances distintas (ZHU *et al.*, 2012). Este complexo da ácido graxo-sintase (FAS II) é composto por polipeptídeos que agem por uma sequência de reações cíclicas, sendo elas:

- A- Condensação da acil-CoA (grupo acetil) com malonil-CoA por ação da β-cetoacil-ACP-sintase (KS);
- B- Redução do grupo β-ceto em β-hidroxi – formação de β-hidroxiacil-ACP – via cetoacil redutase (KR);
- C- Remoção de uma molécula de H<sub>2</sub>O do β-hidroxiacil-ACP por ação da enzima β-hidroxiacil desidratase (DH), o que cria uma ligação dupla na estrutura;
- D- Redução da dupla ligação pela ação da enoil-ACP-redutase (EAR). Então, um novo grupo acetil é formado e transferido por ação da proteína carreadora de acetila (ACP) para etapa de condensação (reação A).

A terceira etapa é a alocação das porções de acetil em grupos de lipídios polares ou neutros. Os grupos de acetil liberados no citoplasma pela FAS1 são transportados para dentro do retículo endoplasmático rugoso. Nesta etapa, ocorrem uma série de esterificações com a estrutura do glicerol-3-fosfato (G3P), esterificações conhecidas como rota de Kennedy (GARAY; BOUNDY-MILLS; GERMAN, 2014). A primeira é a esterificação dos grupos acetila da acetil-CoA para G3P ou diidroacetona-3-fosfato via glicerol-3-fosfato acetil transferase (G3PAT) na posição sn-1 (Figura 2.6). Uma segunda porção de grupos acetil é transferido para posição sn-2 para gerar o fosfatidato (PA), sendo esta reação catalisada pela enzima acetil-CoA:lisofosfatídico acetiltransferase (LPAAT). O PA exerce função chave na regulação gênica da ACC1, FAS1 e FAS2 pelo fato dele estar envolvido num *loop* auto-reregulatório direcionado pelas concentrações de inositol e colina no citoplasma e PA no retículo endoplasmático rugoso (ER) (CARMAN; HAN, 2009; SCHWEIZER; HOFMANN, 2004).

**Figura 2.6** - Estrutura de um triacilglicerol.



Fonte: Autor.

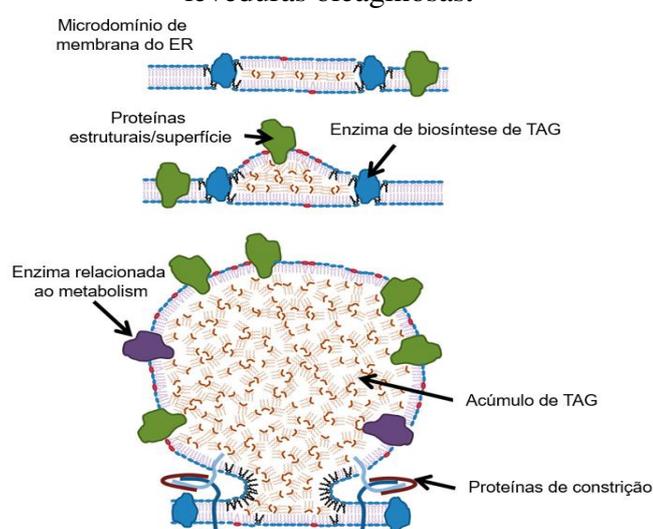
O PA já inserido no ER é então transformado em diacilglicerol (DAG) por duas maneiras. Uma é a hidrólise do grupo fosfato através da ação da fosfatidato fosfatase (*PAP*) para criar o DAG (RAJAKUMARI; GRILLITSCH; DAUM, 2008); a outra forma envolve a síntese de citidina difosfato-DAG (CDP-DAG) a partir do PA, reação catalisada pela CDP-DAG-quinase (*CDS1*) (ZHU *et al.*, 2012). Este CDP-DAG é o precursor dos diferentes fosfolipídios no ER, podendo ser fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina ou outro tipo de fosfolipídio. Normalmente, a formação do DAG se dá pela clivagem do fosfolipídio via fosfolipase C. Estas duas vias de formação de DAG intercalam-se entre si. Se a concentração de CDP-DAG estiver mais alta que a de DAG, o PA vai diretamente para formação de TAG, caso contrário o PA é direcionado para a região de acúmulo de PA na membrana do ER para formação de DAG. Estas duas vias apresentam um direcionamento regido por uma relação de equilíbrio entre CDP-DAG e DAG-PA (KOSA; RAGAUSKAS, 2011). Como etapa final, o DAG é transformado em triacilglicerol pela transesterificação de uma porção de acila originado do acil-CoA que fora catalisado pela acil-CoA:DAG acultransferase (*ADAT*). A enzima *ADAT* pode ser codificada como *DGA1* ou *LRO1* (ZHU *et al.*, 2012). Esta codificação é feita de acordo com a origem do DAG: se o DAG foi gerado diretamente do PA via *PAP* ou a partir do *pool* de fosfolipídios acumulados no retículo endoplasmático rugoso.

Elongamentos e desaturações também ocorrem no retículo endoplasmático, porém a desaturação requer que ácidos graxos estejam acoplados nos fosfolipídios do ER. Neste ponto, outra enzima málica (diferente da presente no citoplasma) catalisa a conversão do malato para piruvato e a consequente redução de NADP<sup>+</sup> para NADPH (GARAY; BOUNDY-MILLS; GERMAN, 2014). O NADPH gerado é utilizado numa série de transferência de elétrons envolvendo β-5 redutase e, mais à frente, ativando a desaturase, enzima esta que catalisa a formação de dupla ligação nos ácidos graxos através da conversão de um mol de O<sub>2</sub> em um mol de H<sub>2</sub>O (RATLEDGE, C, 2013).

A quarta e última etapa consiste na formação dos corpos lipídicos, porém as verificações deste mecanismo ainda são recentes e poucas. Acredita-se que a formação dos corpos lipídicos ocorra na região transmembrana do retículo endoplasmático rugoso

(CHOUDHARY; JACQUIER; SCHNEITER, 2011; LONG et al., 2012; SPANOVA et al., 2012). Com o acúmulo de TAG na região transmembrana ocorre a formação de uma protusão no ER, o que promove o recrutamento de proteínas estruturais denominadas PAT – das iniciais em inglês das proteínas *prelipin*, *adipocyte differentiation-related-protein* e *tail-interactin protein of 47 kDa* (TIP47) (LONDOS et al., 2005) – quando a protusão atinge determinado nível na região transmembrana a membrana externa se separa do ER, formando assim os corpos lipídicos (Figura 2.7).

**Figura 2.7** - Formação dos corpos lipídicos na região o retículo endoplasmático rugoso de leveduras oleaginosas.



Fonte: Adaptado de Murphy (2012)

### 2.3. Produção de SCO por leveduras a partir de biomassa lignocelulósica: microrganismos e substratos

Eliminar o dilema alimento vs. combustíveis, reduzir o uso de terras aráveis e produzir lipídios em menor tempo são importantes vantagens que as biorrefinarias de terceira geração apresentam. Entretanto, os custos para obtenção deste óleo ainda são altos, o que torna esta estratégia ainda inviável economicamente, principalmente pelo alto custo dos substratos para cultivo, que podem contabilizar 60-80% do custo total de produção, conforme já discutido (FEI et al., 2011; KOUTINAS et al., 2014). Uma das possibilidades para se alcançar a redução deste dispêndio operacional é o uso de biomassa lignocelulósica como fonte de açúcares fermentescíveis.

As fontes lignocelulósicas utilizadas como matéria prima para obtenção de hidrolisados são comumente escolhidas em função da economia local ou nacional, sendo assim, o material a ser hidrolisado baseado em diferentes culturas como cana de açúcar, milho, arroz,

trigo, miscanto, etc. Dentre as estratégias para hidrólise do material lignocelulósico se destacam a ácida (LIU, YATING *et al.*, 2015; YU *et al.*, 2011) e a enzimática (ZHAN *et al.*, 2013), esta última com a vantagem de gerar menos resíduos e inibidores; porém é ainda relativamente dispendiosa.

Uma diversidade de microrganismos também pode ser utilizada. Contudo alguns microrganismos figuram com mais frequência na literatura focada na produção de óleo microbiano utilizando hidrolisado lignocelulósico como fonte de carbono, dentre eles *Trichosporon sp.* (GAO *et al.*, 2014), *Cryptococcus curvatus* (LIANG *et al.*, 2012), *R. toruloides* (LIU *et al.*, 2015), *Yarrowia lipolytica* (TSIGIE *et al.*, 2011) e *L. starkeyi* (YU *et al.*, 2011) (Tabela 2.1). Os valores de produção lipídica para estes microrganismos cultivados em hidrolisados possuem grande variação, com concentração celular que pode partir de 6,7 g/l até 71 g/l e conteúdos lipídicos de 11,9% até 64%.

#### **2.4. *Rhodotorula toruloides*: plataforma biológica de interesse industrial**

Em meio a diversas espécies de leveduras oleaginosas, a levedura *R. toruloides* vem chamando a atenção devido suas múltiplas potencialidades: produção de moléculas de baixo e alto valor agregado e robustez frente a diversos desafios ligados ao cultivo em sistemas não convencionais (substrato, temperatura e pH). Tais potencialidades fizeram com que esta levedura fosse classificada como “*a workhorse*” para aplicações biotecnológicas (PARK; NICAUD; LEDESMA-AMARO, 2018). Antes conhecida como *Rhodosporidium toruloides*, esta levedura é um basidiomiceto da subdivisão *Pucciniomycotina*, heterotática e também classificada como levedura vermelha em razão da sua coloração avermelhada (COELHO *et al.*, 2008).

*R. toruloides* vem sendo estudada como microrganismo para aplicações biotecnológicas desde a década de 50 (PETERSON *et al.*, 1958). Estudos fisiológicos demonstram que esta levedura é capaz de produzir moléculas de alto valor agregado a partir de variadas fontes de carbono e nitrogênio, incluindo fontes alternativas e de relativo baixo custo, o que industrialmente é muito interessante (BONTURI *et al.*, 2017; XU; LIU, 2017). Dentre estes substratos de baixo custo estão os baseados em biomassa vegetal. Destas biomassas pode-se se produzir hidrolisados, que são um meio complexo com diferentes fontes de carbono, o que para alguns microrganismos pode ser um problema devido a possibilidade de repressão catabólica. Porém, a *R. toruloides* demonstra capacidade de assimilação simultânea de diferentes fontes de carbono, mesmo na presença de glicose (PATEL, A. *et al.*, 2016). Em termos de produtividade, o cultivo desta levedura também apresenta bons resultados. Ao se

**Tabela 2.1** – Principais sistemas leveduras oleaginosas/substratos/método de hidrólise e resultados de produção lipídica.

Levedura	Substrato	Hidrólise	Biomassa seca (g/l)	Lipídios (g/l)	Conteúdo lipídico (%)	Referência
<i>R. toruloides</i>	Alcachofra	Ácida	70,00	39,55	56,50	Zhao <i>et al.</i> (2010)
<i>R. toruloides</i>	Bagaço da cana de açúcar	Ácida	6,70	3,9	55,00	Bonturi <i>et al.</i> (2017)
<i>R. toruloides</i>	Sabugo de milho	Ácida	70,97	33,5	47,20	Liu <i>et al.</i> (2015)
<i>R. glutinis</i>	Miscanto	Ácida	11,80	1,40	11,90	Mast <i>et al.</i> (2014)
<i>C. curvatus</i>	Bagaço de sorgo	Micro-ondas	15,50	9,92	63,98	Liang <i>et al.</i> (2012)
<i>C. curvatus</i>	Palha de trigo	Ácida	17,20	6,02	33,50	Yu <i>et al.</i> (2011)
<i>Cryptococcus</i> sp.	Espiga de milho	Ácida	10,80	6,60	61,30	Chang <i>et al.</i> (2013)
<i>L. starkeyi</i>	Palha de trigo detoxificado	Ácida	12,70	3,69	29,10	Yu <i>et al.</i> (2011)
<i>T. cutaneum</i>	Espiga de milho	Ácida	38,40	12,3	32,00	Gao <i>et al.</i> (2014)
<i>T. fermentans</i>	Resíduo de batata doce	Enzimática	26,96	9,60	35,60	Zhan <i>et al.</i> (2013)
<i>Y. lipolytica</i>	Bagaço da cana de açúcar	Ácida	11,42	6,68	58,50	Tsigie <i>et al.</i> (2011)
<i>Y. lipolytica</i>	Farelo de arroz	Ácida	10,75	5,16	48,02	Tsigie <i>et al.</i> (2012)

comparar as produções lipídicas de diferentes leveduras, fungos filamentosos e bactérias em cultivos com glicose, Kosa e Ragauskas (2011) observaram que a *R. toruloides* apresentou maior produtividade lipídica, contabilizando 0,54 g/(l.h), seguida por *Cryptococcuse curvaus* (0,42 g/(l.h)) e *Candida sp.* (0,40 g/(l.h)).

Alguns estudos buscaram melhorar a produção de lipídios ou carotenoides por *R. toruloides* através de melhorias nas condições de cultivo. Li, Zhao e Bai (2007) alcançaram conteúdo lipídico de 67,5% durante cultivo em batelada alimentada com glicose. Dias *et al.* (2015) observaram rendimento máximo de carotenoides de 63,37  $\mu\text{g/g}_{\text{célula seca}}$ , também utilizando glicose como fonte de carbono. Wu *et al.* (2011) investigando diferentes razões carbono/sulfato (C/S) para induzir a produção lipídica observaram que, sob razão C/S de 46,75, o maior conteúdo lipídico foi alcançado (58,3%).

Desde que a *R. toruloides* vem ganhando destaque, seja pela produção de lipídios ou moléculas de alto valor agregado como carotenoides, esforços foram feitos para se entender o metabolismo desta levedura e desenvolver estratégias a nível metabólico para aumentar a produtividade de moléculas de interesse comercial (KUMAR, S. *et al.*, 2012; ZHU *et al.*, 2012). Zhang e colaboradores aumentaram a produção de lipídios em 1,95 vezes após a superexpressão das enzimas ACC e DGA1, ligadas diretamente na síntese lipídica. Wang *et al.* (2016) superexpressaram a enzima heteróloga  $\Delta 12$ -ácido graxo desaturase (*FADS*) em *R. toruloides* e conseguiram produção de ácido linoleico cinco vezes maior em comparação com a cepa não modificada geneticamente.

## **2.5. Fontes nacionais de hemicelulose potenciais para cultivo de *R. toruloides***

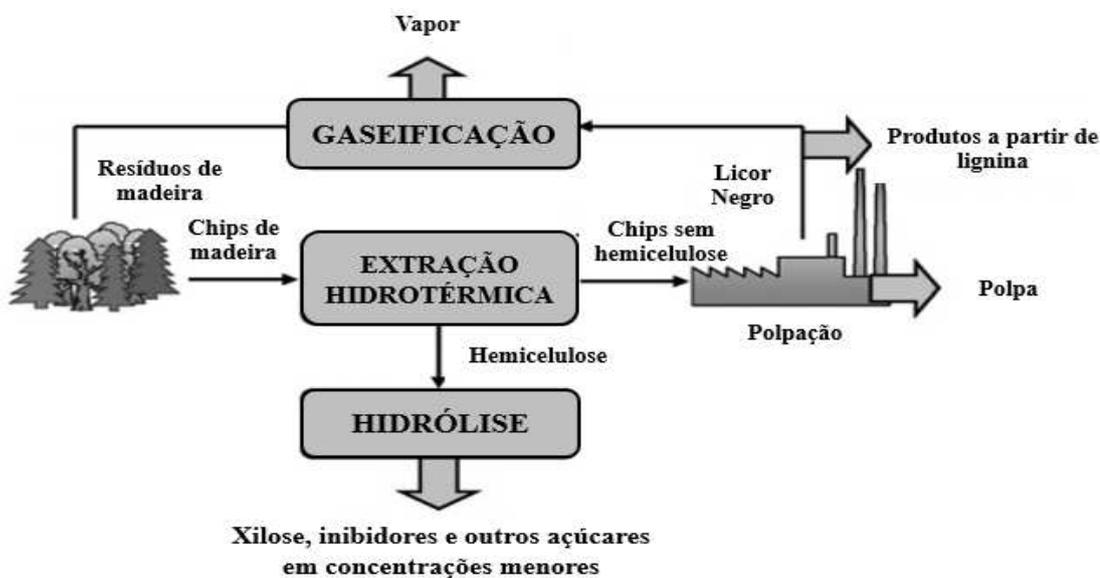
O Brasil é conhecido mundialmente por sua extensa e diversificada agricultura, destacando-se por seu pioneirismo no cultivo de cana-de-açúcar em larga escala. De acordo com os dados apresentados pela União da Indústria de Cana-de-Açúcar (2018), 633 milhões de toneladas de cana-de-açúcar foram produzidas na safra de 2018 e, após o processamento deste material, valores superiores a 200 milhões de toneladas de bagaço de cana de açúcar foram gerados. A glicose deste bagaço após a sua hidrólise é foco de grande número de pesquisas direcionadas à produção de etanol de segunda geração (GUTIÉRREZ-RIVERA *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2015). Grande parte dos trabalhos focados na produção de etanol de segunda geração utiliza somente a glicose proveniente da celulose. Tal fato se dá por limitação natural das leveduras comumente utilizadas durante fermentação alcoólica: com exceção do caso em que a levedura tenha sido submetida a técnicas de engenharia genética para metabolizar xilose, este

açúcar contido na fração hemicelulósica será queimado para produção de energia ou direcionado a dispendiosos processos de isomerização (CUNHA *et al.*, 2019). Assim, torna-se interessante a utilização da fração hemicelulósica, não aproveitada no setor de açúcar e álcool, como substrato para produção de lipídeo microbiano.

O setor industrial de papel e celulose também pode ser um fornecedor potencial de substratos para produção de lipídeo microbiano. Durante o processo de polpação kraft ocorre a separação da celulose dos demais constituintes da madeira, incluindo a hemicelulose. A hemicelulose solubilizada durante a polpação kraft é queimada juntamente com a lignina para fornecer calor para planta industrial. Porém, o poder calorífico da hemicelulose (aproximadamente 13,5 MJ/kg) é significativamente menor que o da lignina (25 MJ/kg). Assim, a queima da hemicelulose juntamente com a lignina reduz a eficiência da caldeira, sendo uma aplicação pouco nobre para este substrato (HUANG *et al.*, 2010).

Uma alternativa à queima da hemicelulose é utilizar seus monômeros como fonte de carbono para a produção de lipídeos, uma vez que a xilose e outros componentes podem ser assimilados por microrganismos oleaginosos (DAI *et al.*, 2007). No Brasil, esta estratégia pode ser viável, uma vez que as florestas de eucalipto somam aproximadamente 4,8 milhões de hectares e desse total, 1,8 milhão é destinado à produção de papel e celulose (Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas - ABRAF, 2014). Baseado no conceito de biorrefinaria, a Figura 2.8 apresenta uma proposta de recuperação de hemicelulose dentro do processo de polpação Kraft.

**Figura 2.8** - Recuperação de hemicelulose integrada ao processo de polpação kraft.



Fonte: Adaptado de Marinova *et al.* (2009).

## 2.6. Composição da matriz lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é composta principalmente de celulose, hemicelulose e lignina e a distribuição desses componentes pode variar de acordo com a espécie, idade e local de cultivo da espécie vegetal (KUMAR; SINGH; 2017). Resíduos agroindustriais como bagaço da cana-de-açúcar, possuem entre 32-34% de celulose, 19 a 24% de hemicelulose, 25 a 32% de lignina e 6 a 12% de extrativos (PANDEY *et al.*, 2000; REZENDE *et al.*, 2011). A composição do bagaço da cana-de-açúcar é semelhante à maioria dos outros vegetais não lenhosos. Como exemplo, a da casca de arroz, sub-produto largamente gerado em países asiáticos em função do massivo consumo de arroz, é constituída de 30-35% de celulose, 25-30% de hemicelulose, 15-28% lignina e 4-7% de cinzas (MARQUES *et al.*, 2010). Já espécies lenhosas possuem conteúdo de celulose maior que as outras espécies vegetais. A composição de *Eucalyptus sp.* contém por volta de 42-45% de celulose, 19,6-21,7% de hemicelulose e 28-29% de lignina (LI *et al.*, 2015, 2018).

A celulose é um homopolímero de estrutura linear constituído por moléculas de glicose ligadas entre si através de ligações  $\beta$ -1,4. Na estrutura vegetal, repetitivas subunidades de celulose estão ligadas entre si por ligações covalentes, pontes de hidrogênio e por força de Van der Waals para formar microfibrilas. Estas microfibrilas são envoltas de hemicelulose e lignina, o que fornece proteção para a estrutura celulósica contra os ataques externos de fungos, umidade, etc (KUMAR; SINGH; KORSTAD, 2017).

A hemicelulose é um heteropolímero de massa molecular menor quando comparado com da celulose. Diferente da celulose, esta estrutura é composta em sua maioria por pentoses (majoritariamente xilose) e, em menor concentração, hexoses e açúcares acetilados. A estrutura da hemicelulose pode ser constituída por homo ou heteropolímeros, com pequenas ramificações laterais unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -(1,4) ou  $\beta$ -(1,3). A hemicelulose é conhecida por ser termosensível em relação aos outros constituintes da biomassa vegetal. Sendo assim, a hemicelulose da maioria das espécies vegetais é mais facilmente removida em processos sob altas temperaturas (KUMAR; SINGH; KORSTAD, 2017).

A lignina é o principal composto, não-carboidrato, constituinte da biomassa lignocelulósica. Podendo representar até um terço da biomassa vegetal em espécies lenhosas (VISHTAL; KRASLAWSKI, 2011). A lignina fornece hidrofobicidade e força para estrutura vegetal, além de proteger a biomassa da degradação microbiana (VANHOLME *et al.*, 2010). Este biopolímero é formado por um sistema complexo de aromático geralmente formado por

sub-unidades de siriguil, guaiacil e hidroxifenil polimerizadas entre si (CHEN; DIXON, 2007). A posição e proporção destas subunidades contituíntes da lignina podem variar e são determinantes para facilidade de pré-tratamento e ou hidrólise do material lignocelulósico, bem como a concentração e característica dos inibidores presentes no material hidrolisado (YOO *et al.*, 2020).

## 2.7. Compostos tóxicos presentes no hidrolisado e seus mecanismos de inibição

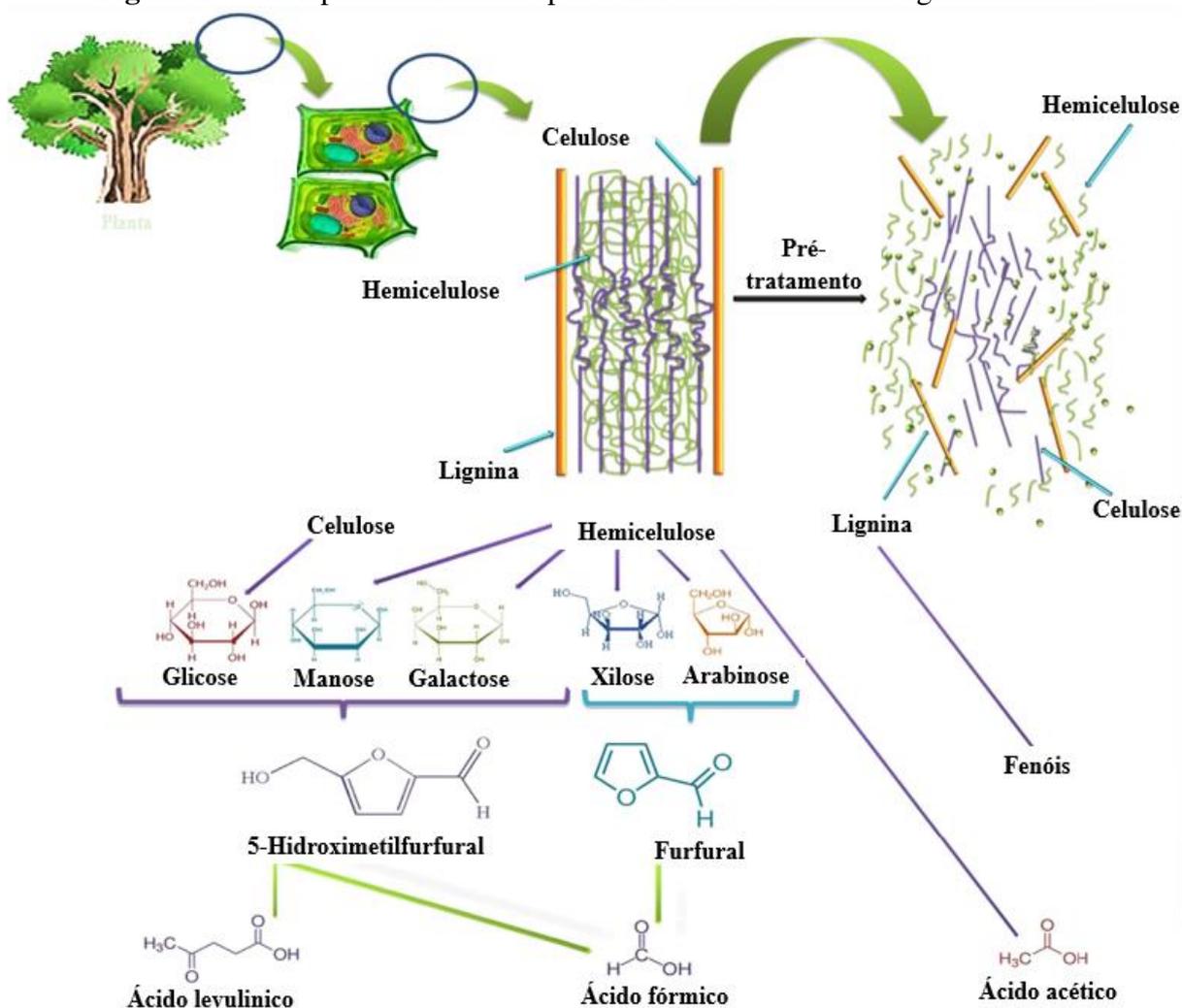
A utilização da biomassa vegetal por leveduras como *R. toruloides* requer a liberação dos açúcares presentes na biomassa para, então, serem assimilados pelo microrganismo. Infelizmente, junto com os açúcares liberados há a formação de compostos tóxicos para o microrganismo como: furfural e 5-hidroximetilfurfural (gerados em função da desidratação de pentoses e hexoses), ácido acético (oriundo dos grupos acetil que compõem a hemicelulose) e compostos fenólicos, como fenol, vanilina siringaldeído e hidroxibenzaldeído (gerados a partir da lignina) (ALMEIDA *et al.*, 2007; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000) (Figura 2.9). Durante o cultivo de microrganismos oleaginosos em hidrolisados, estas moléculas podem exercer efeitos inibitórios e prejudicar o desenvolvimento microbiano bem como numa baixa síntese dos produtos desejados. Hu *et al.* (2009) relataram que, ao cultivarem *R. toruloides* Y4 na presença de furfural na concentração 1,0 mmol/l, houve uma redução drástica de 41,1%, 45,5% e 26,5% nos valores de consumo de glicose, produção celular e lipídios, respectivamente.

Compostos fenólicos podem causar danos na membrana celular até o ponto de perda de sua integridade, o que afeta o microrganismo não só estruturalmente, mas também degrada uma região em que compostos fundamentais, como enzimas, são sintetizados (HEIPIEPER *et al.*, 1994). Compostos fenólicos como vanilina, hidroxibenzaldeído, siringaldeído e fenol podem ser encontrados em hidrolisados lignocelulósicos. Buchert, Puls e Poutanen (1989) relatam que quanto menor a massa molecular do composto fenólico, mais nocivo ele será para o microrganismo. A mesma conclusão foi alcançada por Zhang *et al.* (2012) nos ensaios verificando o efeito tóxico de compostos fenólicos durante o cultivo de *Candida athensensis*: o nível de toxicidade foi ordenado como o seguinte esquema:

fenol > siringaldeído > hidroxibenzaldeído > vanilina

Além desta ordenação, os autores verificaram que a presença de compostos fenólicos afetou negativamente a atividade da enzima xilose redutase.

**Figura 2.9** - Compostos formados após a hidrólise da biomassa lignocelulósica.



Fonte: Adaptado de Patel *et al.* (2016).

Devido à presença dos inibidores nos hidrolisados, muitos autores sugerem etapas de detoxificação destes hidrolisados como etapa essencial para redução das concentrações desses compostos (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). Muitos métodos para remoção de inibidores podem ser aplicados de acordo com as características dos inibidores: químicos, físicos e biológicos. A neutralização do hidrolisado por agentes alcalinos ( $\text{CaO}$  e  $\text{Ca(OH)}_2$ ), conhecida como calagem, é comumente o método primário, pois é necessário, caso a hidrólise seja ácida, estabilizar o pH do hidrolisado (geralmente muito ácido) para valores apropriados para o cultivo. Após a calagem, há métodos secundários mais dispendiosos para detoxificação como troca iônica, adsorção em carvão ativado e até ação de agentes biológicos (PATEL, *et al.*, 2016). Entretanto, a utilização destes métodos secundários objetivando a maior remoção possível de inibidores acarretará em perda de açúcares e aumento dos custos operacionais, o

que contribuirá negativamente para viabilizar a produção de lipídios microbianos e sua aplicação na produção de biodiesel.

Os ácidos acético, fórmico, levulínico e octanóico podem estar presentes no hidrolisado. Estes ácidos são lipossolúveis quando estão na forma não dissociada (valores de pH do meio abaixo do  $pK_a$  do composto), o que permite que eles se difundam intracelularmente pela membrana celular até alcançar o citosol (AXE; BAILEY, 1995; THIELE; CHARTRAIN; ZEIKUS, 1988). Dentro do citosol, o ácido retorna à sua forma dissociada devido ao pH intracelular, o que causa redução no pH citosólico (PAMPULHA; LOUREIRO-DIAS, 1989). O mecanismo do efeito inibitório pode ser explicado por duas hipóteses. A hipótese do desacoplamento defende que a presença destes ácidos no interior da célula faz com que o pH seja neutralizado pela enzima ATPase da membrana plasmática que faz o papel de bombear prótons ( $H^+$ ) para o exterior da célula com a utilização de ATP, acarretando num maior coeficiente de manutenção (STOUTHAMER, 1979; VERDUYN *et al.*, 1991). A outra hipótese, da acumulação de ânions, diz que os ácidos na forma aniônica são capturados no interior celular e ácidos na forma não dissociada vão difundir pra dentro da célula até que o equilíbrio seja alcançado (ROTTENBERG, 1979).

Furfural e HMF também podem causar efeito inibitório de microrganismos quando presentes no interior celular. Durante cultivo de *S. cerevisiae*, verificou-se que a presença desses compostos causou a inibição das enzimas álcool desidrogenase (*ADH*), piruvato desidrogenase (*PDH*) e aldeído desidrogenase (*ALDH*) (ALMEIDA *et al.*, 2007). Além disso, certificou-se que enzimas ligadas à assimilação de substrato como as enzimas glicolíticas exoquinases e gliceraldeído-3-fosfato tiveram suas funções reduzidas em virtude da presença de furfural e HMF.

## **2.8. Adaptação evolutiva de laboratório (ALE)**

### **2.8.1. ALE como estratégia geral**

Como discutido, apesar da grande quantidade de material lignocelulósico com potencial para se tornar fonte de carbono na obtenção lipídica por levedura, ainda é necessário preencher algumas lacunas. Um dos principais problemas é a presença de inibidores como furfural, HMF, ácido acético, siringaldeído, hidroxibenzaldeído e vanilina presentes nos hidrolisados. Sabendo da toxicidade destes compostos, propor a destoxificação do hidrolisado geralmente é a primeira ideia, porém tal estratégia representa custos adicionais, aumento na

complexidade do processo de produção e perdas no rendimento de açúcar (PIENKOS; ZHANG, 2009).

Além da destoxificação, existem outras técnicas que possibilitam, não só contornar a presença de inibidores, mas também propiciar a assimilação de substratos não convencionais. Uma das estratégias seria submeter microrganismos a técnicas de engenharia genética, como já feito para *E. coli* (LIU; KHOSLA, 2010) e *Y. lipolytica* (NIEHUS *et al.*, 2018), com o intuito de inserir genes ligados à lipogênese e ou resistência a compostos nocivos ao cultivo. Outra técnica possível de ser aplicada é adaptar o microrganismo para o mesmo se desenvolver em substratos complexos (e.g., hidrolisado lignocelulósico) que podem carregar consigo potenciais inibidores.

De acordo com Santos (2011), a inserção de modificações genéticas no microrganismo interfere na fisiologia global da célula e raramente uma única modificação neste genoma causará apenas um efeito no microrganismo. Há de se considerar também, que as técnicas de engenharia genéticas possuem custo e complexidade significativos. Dentro deste contexto, a aplicação da adaptação evolutiva de laboratório (ALE, do inglês *adaptive laboratory evolution*), também chamada de engenharia adaptativa, pode ser uma melhor estratégia para potencialização do microrganismo.

ALE é um método frequentemente utilizado em estudos biológicos e que tem seus primeiros relatos datados no último século como o trabalho executado por Atwood, Schneider e Ryan (1951) e, como relatado por Sauer (2001), possui a vantagem de não requerer nenhum conhecimento preliminar da natureza molecular ou de regulação fenotípica. O princípio desta técnica é embasado em cientistas como Antonie van Leeuwenhoek, Louis Pasteur, Robert Koch e, o mais notável de todos, Charles Darwin com suas descobertas de microrganismos, teoria dos germes e a importância da seleção natural e artificial para evolução. ALE tem como objetivo alcançar melhorias nos mecanismos metabólicos básicos dos microrganismos, seja por evolução molecular, como maior produção de determinado produto e, ou mudanças adaptativas acumuladas em populações durante o cultivo em condições específicas, como a capacidade de se desenvolver em ambientes não convencionais como diferentes faixas de temperatura, pH e substratos (DRAGOSITS; MATTANOVICH, 2013).

Estas condições específicas de cultivo geralmente são ambientes de estresse. Assim, as células microbianas desenvolvem mecanismos para resistir a estas condições e manter o estado de homeostase. O ambiente de estresse pode ser composto por exposição à inibidores (NAM; CONRAD; LEWIS, 2011). É possível também alcançar condição de estresse ao

submeter as células a condições inapropriadas de pH, pressão osmótica, temperatura, radiação UV, etc. (HUGHES; CULLUM; BENNETT, 2007; RIEHLE *et al.*, 2003; STOEBEL *et al.*, 2009).

O estresse celular também pode ser obtido através da exposição do microrganismo à meios complexos e ou substratos não convencionais. Em se tratando de substratos não convencionais em um âmbito industrial, a eficiência de utilização destes substratos é um aspecto importante, uma vez que taxas de conversão podem ser definitivas na viabilização do processo (GORKE; STULKE, 2008). Quando cultivado em ambiente com limitação de nutriente único, as modificações mais comuns se dão pela superexpressão gênica relacionada à assimilação do nutriente específico. Gresham *et al.* (2008) reportam que ALE executada com *S. cerevisiae* em limitação de enxofre acarretou na amplificação do transportador de alta afinidade de enxofre SUL1. Kao; Sherlock (2008) verificaram a superexpressão dos genes transportadores de hexose HXT6 e HXT7 em *S. cerevisiae* durante ALE executada com limitação de glicose; além disto, verificaram que uma dos clones apresentou, além do ganho de aptidão para assimilação de glicose, deleção em um par de bases de gene responsável pela enzima RIM15 ligada à repressão de glicose. Este ganho na aptidão de assimilação de nutrientes, especialmente nos casos dos não convencionais, representam modificações expressivas no metabolismo celular e, em alguns casos pode levar anos para que seja alcançado. Em torno de 15 anos foram necessários para se obter fenótipos ligados ao consumo de citrato uma população de *E. coli*. As outras 11 populações continuaram não assimilando esta fonte de carbono mesmo após 30 anos de ALE (LEON *et al.*, 2018).

Como descrito por Sandberg *et al.* (2019), a ALE se mostra como uma poderosa ferramenta multifuncional que permite investigação laboratorial de processos evolucionários, o que fornece uma maior base de conhecimento para sucesso em melhorias de organismos através da identificação de mutações genéticas associadas com pressões seletivas específicas. O uso de ALE pode ser categorizado em cinco áreas de aplicação:

- 1) Otimização da taxa de crescimento;
- 2) Aumento de tolerância a determinados compostos;
- 3) Utilização de substratos específicos, muitas vezes não convencionais;
- 4) Aumento de produtividade;
- 5) Descobertas gerais.

Entretanto estas categorias não ocorrem de maneira única e separada, permitindo a ocorrência de maneira simultânea, ou seja, permite o paralelismo de alterações. Desta maneira,

ALE pode produzir microrganismos com combinações de alterações que os tornem únicos. Quando identificado este fenômeno de múltiplas alterações benéficas o fato é classificado como fenômeno de co-evolução ou proteção cruzada. Um exemplo de adaptação com proteção cruzada é o trabalho de Cakar *et al.* (2005): ao adaptarem células de *S. cerevisiae* em meio contendo elevadas concentrações de cobalto, os autores identificaram também tolerância a outros metais. Posteriormente a estas descobertas foi verificado que esta mesma cepa também adquiriu resistência à estresse térmico e oxidativo.

É importante registrar que ALE se difere da evolução direcionada (engenharia genética) (ARNOLD, 2018; PACKER; LIU, 2015), uma vez que ALE permite a mutação de qualquer região do genoma de forma que melhore a aptidão do microrganismo em desenvolvimento no meio seletivo. Já a engenharia genética foca em uma região específica (transformação específica) do genoma e posterior seleção dos fenótipos de interesse, em muitos casos, independente dos ganhos ou perdas na aptidão do microrganismo (SANDBERG *et al.*, 2019). Estas perdas ou ganhos na aptidão se referem às capacidades dos microrganismos que podem ser deletadas, reduzidas, expressadas e amplificadas. Porém, apesar de serem distintos, a engenharia genética (evolução direcionada) e ALE podem atuar de forma complementar, uma vez que os efeitos negativos da engenharia genética podem ser superados com o uso da adaptação evolutiva, muitas vezes melhorando a aptidão celular (LIU *et al.*, 2015). Um exemplo desta simbiose entre evolução direcionada e ALE é o trabalho de Choe *et al.* (2019), quando uma cepa de *E. coli* com mais de um milhão de pares de bases removidas do seu cromossomo, apresentou crescimento três vezes inferior em meio mínimo quando comparado com a cepa selvagem. Porém, após ALE com menos de mil gerações, a cepa modificada conseguiu corrigir este problema relacionado ao crescimento em meio mínimo.

### **2.8.2. Modos de condução da ALE**

A ALE pode ser executada de diferentes formas e o tipo de biorreatores de cultivo é variado, podendo ser em frascos agitados, biorreator de tanque agitado (batelada e contínuo) e até em placas de Petri com meio sólido. Em frascos agitados, neste modo de condução as células são inicialmente cultivadas em meio contendo baixo nível de estresse. O aumento deste nível de estresse – concentração de inibidores, substratos não convencionais, temperatura, pH, etc – pode ser feito após o critério escolhido para condução da ALE atingir o valor desejado. Desta forma o avanço da ALE será controlado em função de um ou mais fatores como: valor de OD, consumo de substrato, parâmetros cinéticos, fases de crescimento, valor de pH etc.

Uma alternativa simples para se executar a ALE é o cultivo em microplaca, o que demanda ainda menos meio de cultivo e permite uma abundância de experimentos paralelos (GONZALEZ; BELL, 2013). Por outro lado, este modo de condução de ALE pode demandar maior tempo quando comparado com as outras técnicas, uma vez que, as colônias podem demorar dias para serem formadas.

Outra possibilidade operacional para condução da ALE é o cultivo em quimiostato, modo de adaptação em que o suprimento de substrato e oxigênio (quando necessário) e controle de pH são ajustados para se manterem constantes. Um contraponto da adaptação executada em quimiostato é a complexidade operacional e custo de desenvolvimento/manutenção. Sendo assim, a maior diferença entre os modos mais simples e complexos de ALE se dá pela disposição constante ou não de nutrientes e fatores aditivos de estresse como alteração de pH e inibição por metabólitos produzidos.

Além dos diferentes modos de condução da ALE em função do vaso de cultivo, há também variações de ALE referente à maneira em que as células serão coletadas e expostas às condições de maior estresse. Kurosawa, Laser e Sinskey (2015) e Díaz *et al.* (2018) utilizaram a técnica de seleção de clones durante ALE, modo de condução que envolve a seleção de células, através de critérios pré-definidos (maior halo, maior aptidão para se desenvolver, coloração mais intensa, etc) e utilização destas células escolhidas na próxima etapa da adaptação. Diferente destes autores, há trabalhos como de Bonturi *et al.* (2017) e Choe *et al.* (2019), em que os autores desenvolveram ALE sem seleção de clones, ou seja, iniciando a nova etapa da adaptação sem qualquer seleção das células adaptadas na condição mais branda anterior. No entanto, não há um consenso sobre qual destes modos é mais eficiente, visto que, não há ainda na literatura, um trabalho que aplique estes dois modos de ALE e os compare utilizando mesma cepa e meio desafio, o que é uma lacuna a ser preenchida no tocante à melhor metodologia de aplicação da ALE.

### **2.8.3. Conceitos de ALE de curto e longo prazo**

Em face do estresse provocado pelo meio, os microrganismos mais resistentes sobressaem-se e repassam seu material genético para gerações futuras (SAUER, 2001). Apesar da baixa possibilidade desta alteração gênica,  $10^{-1}$ - $10^{-9}$ /(par de bases por geração), a exposição de microrganismos a fatores de estresse durante o cultivo pode ser utilizada para promover adaptações em curto ou longo prazo. Certos ambientes de evolução podem levar a observação de fenótipos adaptados em relativos curtos espaços de tempo; já outras situações como

adaptação em faixas de pH não convencionais, podem requerer longos prazos de adaptação (DRAGOSITS *et al.*, 2013). Sendo assim, a previsão em termos de não ser possível mais ter ganho de aptidão se torna muito difícil. Entretanto, trabalhos recentes como de Ibarra, Edwards e Palsson (2002), conseguiram, de certa forma, prever o tempo de adaptação de *E. coli* K-12 MG1655 na assimilação de glicerol.

Apesar da dificuldade de previsão de um prazo para sucesso da ALE, alguns autores procuraram definir um tempo mínimo para se verificar uma evolução. Santos (2011) relata que o tempo requerido para evolução de linhagens é relativamente longo, em média a partir de 200 gerações. Já Lenski e Travisano (1994) relataram que melhorias de uma adaptação só ocorrem em até 2.000 gerações; a partir daí a aptidão celular para alterações vantajosas se reduz gradativamente. A eficácia da ALE também foi verificada por Hua *et al.* (2007), estes autores relataram que, durante ALE de *E. coli* para consumo de lactato, observou-se aumento do consumo deste substrato em 60% com menos de 250 gerações. Todavia, até alcançar 900 gerações, o ganho de aptidão para consumo de lactato foi menor que 20%. Lenski *et al.* (1991) submeteram *E. coli* a ALE focando seu desenvolvimento em 37°C por 2.000 gerações para ser usada como organismo base para subsequentes adaptações. Nas primeiras 200 gerações do pré-condicionamento executado por Bennett, Dao e Lenski (1990), o ganho de aptidão foi de aproximadamente 33%, já durante as próximas 2.000 gerações executadas por Lenski *et al.* (1991), foi observado ganho de aptidão de apenas 10%.

Alguns autores definem adaptação em curto prazo como aquela regida pela diferença fenotípica. Neste processo as células expressam genes que outrora se encontravam silenciados como forma de sobreviverem à condição adversa às quais foram expostas (KUNDU; HORN; PETERSON, 2007). Por outro lado, a adaptação em longo prazo pode envolver alterações genotípicas de um microrganismo e, análogo à estratégia de curto prazo, os microrganismos adaptados também passam esta herança genética para as próximas gerações (NIELSEN *et al.* 2015). Schneider *et al.* (1995) verificaram a indução da expressão da enzima galactitol desidrogenase por *Rhodobacter sphaeroides*. Para tal, os autores cultivaram a bactéria em quimiostato contendo concentração limitante de substrato convencional e excesso de lactato no meio de cultivo, sendo o lactato até então não assimilado por *R. sphaeroides*. Após aproximadamente 50 dias, Schneider *et al.* (1995) verificaram aumento expressivo na densidade celular, indicando uma mutação adaptativa que possibilitara a utilização de lactato como substrato. Destacou-se em análise bioquímica a atividade da galactitol desidrogenase, enzima não expressa na cepa parental. Kuyper *et al.* (2005) adotaram a estratégia de engenharia

adaptativa para amplificar a assimilação de xilose por cepa de *S. cerevisiae* manipulada geneticamente para expressar a enzima xilose isomerase. Os autores executaram bateladas sequenciais em meio contendo xilose como substrato. Como resposta à adaptação, os autores verificaram aumento expressivo de 36 vezes da taxa específica de crescimento (de 0,005 1/h para 0,18 1/h).

Apesar da evolução propriamente dita ser alcançada somente após um longo período de adaptação, melhorias expressivas no microrganismo para até mais de um objetivo podem ser alcançados em períodos menores. Um exemplo é o trabalho Bonturi (2016), em que houve adaptação da levedura *R. toruloides* CCT0783 em meio contendo hidrolisado hemicelulósico. Dentre os resultados obtidos pela autora destaca-se a superexpressão dos genes ligados à resistência a inibidores: aldeído desidrogenase (*ALD4*, 2,8 vezes), 6-fosfogluconato desidrogenase (*GND*, 6,5 vezes), ribulose-fosfato 3-epimerase (*RPE*, 5,8 vezes) e transquelotase (*TLK*, 6,1 vezes). Houve também maior expressão de genes ligados à lipogênese, sendo eles: fosfofrutoquinase (*PFK*, 3,1 vezes), ATP-citrato liase (*ACL1*, 12, 5 vezes) e subunidades alfa e beta ácido graxo sintetase (*FAS1* e *FAS2*, 23,5 e 5,2 vezes, respectivamente).

## 2.9. Resumo da base para desenvolvimento do trabalho

Com base no apresentado, vê-se que ainda há muitos desafios na geração de combustíveis renováveis a serem superados. No que se refere a biodiesel, observa-se que a sua obtenção de maneira sustentável poderia ser alcançada ao se utilizar óleo de origem microbiana como matéria prima; entretanto, esta opção ainda se encontra pouco distante da realidade, devido ao oneroso processo de cultivo microbiano. O uso de hidrolisados hemicelulósicos é uma alternativa para se contornar o problema dos custos de obtenção do óleo microbiano, entretanto, a ação dos inibidores presentes no hidrolisado dificultam o adequado desenvolvimento dos microrganismos. Como estratégia para superar este desafio, a ALE pode ser utilizada na obtenção de cepa de *R. toruloides* robusta o bastante para conseguir se desenvolver em hidrolisado contendo inibidores em sua composição. Porém, não há na literatura uma metodologia estabelecida para esta técnica que defina critérios para seu desenvolvimento, como a necessidade ou não da seleção de clones durante seu desenvolvimento.

Sabendo destas lacunas, este trabalho comparou estratégias de ALE existentes na literatura, estabeleceu critérios de condução desta técnica e buscou obter cepa de *R. toruloides* robusta capaz de se desenvolver em hidrolisados hemicelulósicos e apresentar bom conteúdo

lipídico. Além disso, este trabalho propôs utilização de hidrolisado hemicelulósico de eucalipto como fonte de carbono no cultivo de *R. toruloides* e estudos com diferentes modos de cultivo para se obter maiores produções lipídicas.

### 3. ADAPTAÇÃO EVOLUTIVA DE LABORATÓRIO DE *R. toruloides* EM HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DA CANA DE AÇÚCAR CONTENDO ALTAS CONCENTRAÇÕES DE INIBIDORES

#### 3.1. Introdução

A adaptação evolutiva de laboratório (ALE), como descrita no capítulo 2, permite a obtenção de cepas mais robustas em relação a cepa parental. A utilização da ALE dentro do conceito de biorrefinarias pode contribuir para redução do valor final do biodiesel, uma vez que ela possibilitará o uso de substratos de baixo custo – principalmente hidrolisados hemicelulósicos – no cultivo de microrganismos. Obtendo-se cepas oleaginosas aptas a crescer em hidrolisados contendo inibidores, evita-se etapas de operações adicionais de pré-tratamento da fonte de carbono.

Neste presente trabalho de adaptação foram levantadas as seguintes questões:

- a) Qual hidrolisado utilizar (no tocante a nível de concentração de inibidores);
- b) Metodologia de adaptação utilizar (com e sem seleção de clones);
- c) Passagem de células ao longo da adaptação;
- d) Escolhas de critério para o desenvolvimento das estratégias de ALE.

Para se definir qual seria o hidrolisado desafio a ser utilizado neste estudo, fez-se cultivos da *R. toruloides* com diferentes hidrolisados que possuíam diferentes concentrações dos inibidores furfural, HMF e ácido acético. O hidrolisado escolhido como desafio foi aquele em que a cepa parental não conseguiu se desenvolver. Com o hidrolisado desafio definido, a ALE foi realizada aumentando-se a concentração do hidrolisado gradativamente em relação ao meio basal, iniciando-se com 10% (v/v) de hidrolisado e 90% meio basal.

O aumento da concentração de hidrolisado durante a ALE só era executado quando se alcançava o principal critério adotado, a estabilização do  $\mu_{\max}$ , indicativo de que as células tinham alcançado seu desempenho máximo naquela condição e já estavam aptas para enfrentarem um desafio maior (maior concentração de hidrolisado em relação ao meio basal).

Além da adoção de um critério quantitativo, mensurado a cada etapa, o presente trabalho comparou duas técnicas de ALE presentes na literatura, mas nunca aplicadas à um mesmo sistema de adaptação, assim este trabalho pode ser considerado um feito inédito. Apesar das duas técnicas de ALE serem utilizadas, ainda não há definição de qual estratégia seria mais adequada para obtenção de uma cepa evoluída e estudos publicados utilizaram uma ou outra técnica, nunca as duas para o mesmo sistema. Autores como Kurosawa, Laser e Sinskey (2015) e Díaz *et al.* (2018) adotaram estratégia de seleção de clones durante a obtenção de cepas mais robustas cultivadas em hidrolisado hemicelulósico. Em outra via, trabalhos como de Bonturi *et al.* (2017) utilizaram a adaptação sem seleção de clones (cultura heterogênea) durante obtenção da cepa *R. toruloides* CCT7815, adaptada em hidrolisado hemicelulósico da cana de açúcar.

Estas duas estratégias de ALE – passagem de cepa heterogênea e de clones selecionados – foram abordadas neste estudo. Iniciou-se a ALE com a estratégia de cultura heterogênea (denominada ALEh). Nesta estratégia, as células eram passadas para um novo desafio, uma nova etapa (maior proporção de hidrolisado no meio reacional), sem qualquer seleção celular após estabilização do  $\mu_{max}$ . Diferente da primeira estratégia, a segunda metodologia de ALE (denominada ALEc) selecionou, após atingimento do critério utilizado, um clone com maior aptidão nas condições de cultivo nas quais ele foi originado para servir de inóculo no próximo desafio. Ao fim da adaptação, as duas cepas obtidas e a cepa parental foram cultivadas isoladamente em hidrolisado hemicelulósico do bagaço da cana de açúcar e seus perfis cinéticos e produção de biomassa e lipídios foram comparados.

## **3.2. Materiais e métodos**

### **3.2.1. Cepa parental utilizada na adaptação evolutiva de laboratório**

A cepa de *R. toruloides* utilizada neste trabalho, denominada aqui como cepa parental, foi adquirida da Coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello (Campinas, SP) como *Rhodosporidium toruloides* CCT0783. As células, mantidas a -80 °C, foram reativadas em meio YPD para condução da adaptação evolutiva de laboratório.

### **3.2.2. Hidrolisados utilizados durante as ALE**

Os hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana de açúcar (HHBC) utilizados nos estudos deste capítulo foram gentilmente doados pela Dra. Sindelia de Freitas Azzoni (Laboratório Nacional de Biorrenováveis, CTBE, Campinas, Brasil) e pelo Dr. Sílvio Silvério

da Silva (Laboratório de Bioprocessos e Produtos Sustentáveis, LBios, Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Brasil). Ambos os hidrolisados doados foram produzidos por via ácida ( $H_2SO_4$ ) e tiveram os valores de pH ajustados entre 5,7 e 6,0 com CaO. Caso o hidrolisado tivesse com conteúdo de xilose inferior ao desejado, concentrava-se o material a  $80^\circ C$  sob agitação com auxílio de chapa aquecedora.

Para a definição do hidrolisado desafio para adaptação em termos de ácido acético, furfural, fenol e HMF, dopou-se o hidrolisado original com estes compostos a concentrações diferentes, gerando os hidrolisados C1 a C4 (Tabela 3.1). O hidrolisado desafio utilizado (HHBCd) teve a mesma composição C1 em termos de inibidores e uma pequena diferença em termos de concentrações de xilose e glicose.

O hidrolisado utilizado para comparação entre as cepas adaptadas e a parental foi o hidrolisado denominado HHBCc, cuja composição parcial é também apresentada na Tabela 3.1.

### 3.2.3. Meios basal, controle e sólido para seleção de clones

O meio basal utilizado na etapa de adaptação tinha a seguinte composição em (g/l): xilose, 20,0; glicose, 5,0; extrato de levedura, 1,9;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1,5;  $(NH_4)_2SO_4$ , 5,0;  $KH_2PO_4$ , 3,6 (BONTURI, 2016) e 2% (v/v) da solução de elementos traços com composição (g/l) de  $CaCl_2 \cdot H_2O$ , 4,0;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,55; ácido cítrico, 0,50;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,1;  $MnSO_4 \cdot H_2O$ , 0,076 e 100  $\mu L$  de  $H_2SO_4$  fumegante adicionados a um litro de solução de elementos traços (MEESTERS; HUIJBERTS; EGGINK, 1996). Para os estudos de definição de hidrolisado desafio e comparação entre as cepas adaptadas e parental o meio de cultivo teve composição em % (v/v): 5% de inóculo, 2% de solução de elementos traços e 93% de hidrolisado. O meio controle utilizado na etapa de definição do hidrolisado desafio foi composto por (g/l): extrato de levedura, 10; peptona, 20 e dextrose, 20.

O meio sólido preparado para as placas de seleção dos clones durante a ALEc foi feito de forma a preservar a pressão seletiva em cada etapa desta estratégia de adaptação. Deste modo, o meio sólido era composto por ágar batata dextrose (PDA) com adição de HHBCd na concentração equivalente a utilizada na fase em que os clones foram coletados.

### 3.2.4. Adaptação evolutiva de laboratório (ALE)

A estratégia de ALE desenvolvida neste estudo consistiu em expor a cepa parental de *R. toruloides* ao HHBCd de maneira gradativa, com incrementos de 10% no volume de HHBCd presente no meio até que alcançasse uma concentração em que a cepa não fosse capaz de se

**Tabela 3.1** - Composição parcial dos hidrolisados utilizados em diferentes etapas da ALE.

Hidrolisado	Etapa	Composição (g/l)							
		Xilose	Glicose	Arabinose	Ácido acético	Furfural	Fenol	HMF	
C1	Definição				4,0	2,0	8,7	2,5	
C2					2,0	1,0	8,7	1,0	
C3			50,0	4,0	5,0	1,8	0,5	8,7	0,5
C4						1,9	0	8,7	0,08
HHBCd	Adaptação	55,0	5,0	5,0	4,0	2,0	8,7	2,5	
HHBCc	Comparação	55,0	1,5	1,5	2,3	1,0	6,4	1,4	

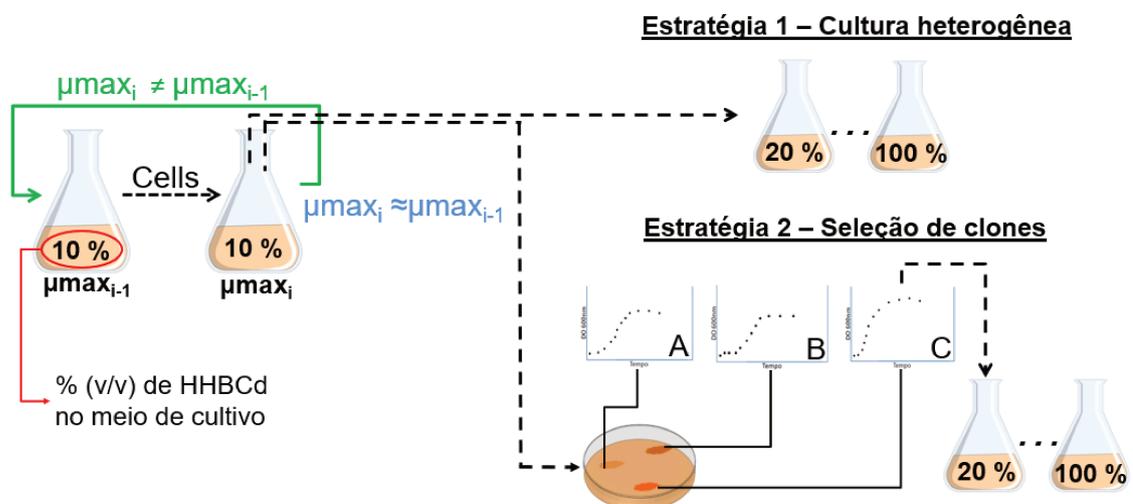
desenvolver. A estabilização do  $\mu_{\max}$  (desvio < 5%) durante as renovações de meio numa mesma condição foi utilizada como métrica para aumento da concentração de hidrolisado no meio. Cada repetição de cultivo em um meio contendo a mesma concentração de HHBCd é chamada neste presente trabalho de passagem.

Como a métrica para detectar ganho de aptidão de crescimento celular no meio foi o  $\mu_{\max}$ , todos os cultivos realizados durante a adaptação tiveram seus perfis cinéticos determinados. Durante o acompanhamento cinético, ao se identificar o início da fase de aceleração (e até início da fase estacionária) a amostragem foi feita em intervalos de 1 h com intuito de ter um perfil cinético bem definido. Vale ressaltar que, as amostragens feitas durante as ALE foram de modo a interferir o mínimo possível no cultivo, com tempo gasto para amostragem menor que um minuto e alíquotas suficientemente mínimas, amostragem de 100 a 200  $\mu\text{l}$  de um volume de trabalho de 50 ml.

### 3.2.5. Adaptação evolutiva de laboratório com cultura heterogênea (ALEh)

O início da adaptação evolutiva de laboratório com cultura heterogênea (ALEh) se deu com 1% (v/v) de células de *R. toruloides* CCT0783 inoculadas em meio contendo 10% de hidrolisado, 2% de solução de micronutrientes e 87% de meio basal (em termos de volume). Definido o perfil e parâmetros cinéticos, 1% do meio de cultivo era então coletado e inoculado em meio fresco na mesma condição e novo acompanhamento cinético era feito (Figura 3.1).

**Figura 3.1** - Esquemas de ALEh e ALEc utilizados para adaptação de *R. toruloides* CCT0783 em HHBCd.



Fonte: O autor.

Quando verificado a estabilização do  $\mu_{\max}$ , mais uma passagem era feita para confirmação deste resultado. Confirmada a estabilização do  $\mu_{\max}$ , 1,0 ml da suspensão celular da última passagem era coletado e inoculado no primeiro cultivo da próxima etapa de adaptação, cujo meio continha 10% a mais de HHBCd e, conseqüentemente, 10% a menos de meio basal. Na nova condição, repetia-se o ciclo de passagens até a estabilização do  $\mu_{\max}$ . As células da última passagem foram coletadas e congeladas em solução de glicerol 10% (v/v). A concentração de solução de micronutrientes no meio permaneceu em 2% durante toda ALE.

### **3.2.6. Adaptação evolutiva de laboratório com seleção de clones**

A adaptação evolutiva de laboratório com seleção de clones (ALEc) foi executada de maneira análoga à ALEh (Figura 3.1). Entretanto, a diferença principal foi o procedimento de passagem para nova etapa com meio de maior concentração de HHBCd. Quando identificada estabilização do  $\mu_{\max}$ , as células foram semeadas em placas de seleção (seção 3.2.3) com diluições sucessivas, de modo que fosse possível identificar clones de maneira isolada. Os clones eram avaliados por sua coloração e tamanho de halo; os de halo maior e coloração mais intensa eram coletados e cultivados em frascos agitados na mesma condição de concentração de HHBCd em que eles foram coletados. Fazia-se acompanhamento cinético e o clone com maior  $\mu_{\max}$  era escolhido para prosseguir com a adaptação em meio com 10% (v/v) a mais de HHBCd. Caso dois ou mais clones apresentassem  $\mu_{\max}$  semelhantes, outros parâmetros como coloração do clone no meio sólido, maior densidade óptica ao final do cultivo e menor fase lag eram adotados como critério de desempate.

### **3.2.7. Estudo comparativo entre as cepas adaptadas e a parental**

Ao final das adaptações, cultivos comparativos entre as cepas adaptadas e a parental foram realizados. Nestes cultivos comparou-se os aspectos cinéticos ( $\mu_{\max}$ , tempo de fase lag e consumo dos substratos) e aspectos relacionados à produtividade celular e lipídica. Cada cepa foi reativada em tubo tipo Falcon contendo 10 ml de meio YPD mantido a 28 °C sob agitação de 200 rpm por 24 h. Nestas mesmas condições, o inóculo foi preparado vertendo-se as células reativadas em frascos tipo Erlenmeyer de 500 ml contendo 90 ml de meio YPD. Após 24 h as células foram coletadas, centrifugadas, lavadas com de NaCl 0,9% (v/v) e ressuspendidas nesta solução para se ter OD de 20 (absorbância a 600 nm). O estudo comparativo foi feito em frascos com meio de cultivo preparado de acordo com o apresentado na seção 3.2.2. A amostragem

para medida de OD das fases críticas (entre fase de aceleração até início da fase estacionária) foi feita em intervalos de uma hora. Amostrou-se os cultivos para as análises de concentração de substratos e medidas de OD em intervalos maiores, de aproximadamente 12 h. As produções celulares e lipídicas foram determinadas ao fim do experimento, com 120 h de cultivo. O *software Statistica* versão 10.1 (StataSoft Inc., EUA) foi utilizado para se empregar o teste de *Tukey* na comparação das médias obtidas. Neste teste utilizou-se nível de significância de 95%.

### **3.2.8. Outros materiais**

Todos os reagentes utilizados neste estudo eram de grau analítico. Todas as soluções foram preparadas utilizando água purificada em equipamento MilliQ (Millipore, Bedford). Os cultivos foram executados em frascos tipo Erlenmeyer de 250 ml com 20% de volume útil em incubadora com agitação orbital modelo TE-4200 (Tecnal, Piracicaba, Brasil) a 28 °C e 200 rpm. Uma centrífuga modelo 5804R (Millipore, Bedford, EUA) foi operada a 4 °C e 8.228g por 15 min para recuperação de células. Para determinação de biomassa seca e lipídios foram utilizados frascos tipo Schott âmbar de 100 ml. Para recuperação do solvente utilizado na extração de lipídios da biomassa foi utilizada uma bomba a vácuo modelo LR-271C (Grieve, Illinois, EUA) e um evaporador rotativo modelo TE-211 (Tecnal, Piracicaba, Brasil). Todos os materiais com necessidade de esterilização foram esterilizados a 121 °C por 15 min em autoclave. Todas as soluções para cultivo foram esterilizadas com filtro de poro 0,22 µm marca JetBiofil (Guangzhou Jet Bio-Filtration, Guangzhou, China).

### **3.2.9. Métodos analíticos**

A quantificação de açúcares redutores totais foi feita utilizando o método proposto por (MILLER, 1959), com xilose como padrão. As concentrações de xilose, ácido acético, glicose, HMF e furfural foram determinadas por HPLC (equipamento modelo Dionex Ultimate 3000, ThermoScientific, Sunnyvale, EUA) equipado com coluna HPX-87H (Biorad, Hercules, EUA) operando a 50 °C. Solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mmol/l foi utilizada como fase móvel com vazão de 0,6 ml/min. A concentração de fenóis foi determinada de acordo com o método presente em Hodge et al. (2009) utilizando vanilina como padrão.

O crescimento celular foi monitorado através da medida da OD com espectrofotômetro (Quimis, Diadema, Brasil) a 600 nm. A quantificação de biomassa seca foi feita por gravimetria: as amostras coletadas ao fim dos cultivos (30 ml) foram secadas em estufa

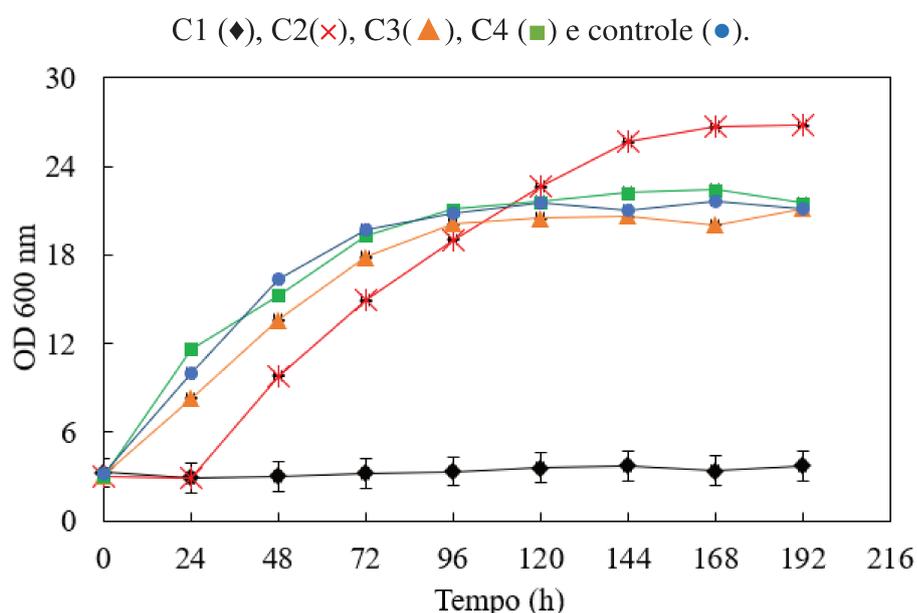
por 24 h a 100 °C. A quantificação de lipídios também foi executada por gravimetria após extração dos lipídios utilizando clorofórmio e metanol seguindo o método proposto por Folch, Lees e Stanley (1957). Os cálculos de  $\mu_{\max}$  foram feitos a partir da equação de Monod com regressão linear dos dados de OD em função do tempo.

### 3.3. Resultados e discussão

#### 3.3.1. Seleção do hidrolisado desafio para condução das ALE

O hidrolisado desafio foi escolhido entre quatro hidrolisados dopados com diferentes concentrações de inibidores (Tabela 3.1). De acordo com o grau de concentração de inibidores as células se desenvolveram com perfis distintos, apresentado em certos casos maior fase lag e até ausência de desenvolvimento celular (Figura 3.2). Os cultivos utilizando os hidrolisados com menores concentrações de inibidores (C3 e C4) apresentaram comportamento análogo ao cultivo controle.

**Figura 3.2** - Cinéticas de cultivos de *R. toruloides* CCT 0783 em diferentes hidrolisados:



Observando os dados do cultivo com hidrolisado C2, percebe-se que as células apresentaram fase lag maior quando comparada com os cultivos feitos com C3, C4 e controle. Possivelmente, a concentração dos inibidores presentes no meio de cultivo causou este maior tempo de aclimação para posterior crescimento. Verificou-se também que o cultivo com C2 entrou em fase estacionária após 144 h de cultivo além de proporcionar densidade ótica maior

que os outros cultivos, enquanto os cultivos com C3 e C4 entraram nesta fase com 72 h. Possivelmente, este fato ocorreu em virtude da maior fase lag e a maior concentração de ácido acético em C2, uma vez que este composto pode ser utilizado como fonte de carbono pela levedura *R. toruloides*. O cultivo com hidrolisado C1, contendo maior concentração de inibidores, não apresentou qualquer desenvolvimento celular durante as 192 h de experimento. Frente a isto, o hidrolisado C1 foi escolhido como hidrolisado desafio para ser utilizado durante a adaptação evolutiva da levedura *R. toruloides* CCT0783. Assim, a partir deste ponto, este hidrolisado C1, passou a ser referido como hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar desafio (HHBCd).

### 3.3.2. Adaptação evolutiva de laboratório com cultura heterogênea (ALEh)

A ALEh foi composta por cinco etapas sequenciais com cada uma delas contendo maior proporção de hidrolisado no meio de cultivo (Tabela 3.2, Figura 3.3). Cada etapa foi constituída por múltiplas passagens em que as células foram cultivadas até se verificar a estabilização do  $\mu_{\max}$  (algumas passagens não tiveram seu  $\mu_{\max}$  determinado).

**Tabela 3.2** - Etapas, números de passagens e valores de dados cinéticos obtidos durante a ALEh.

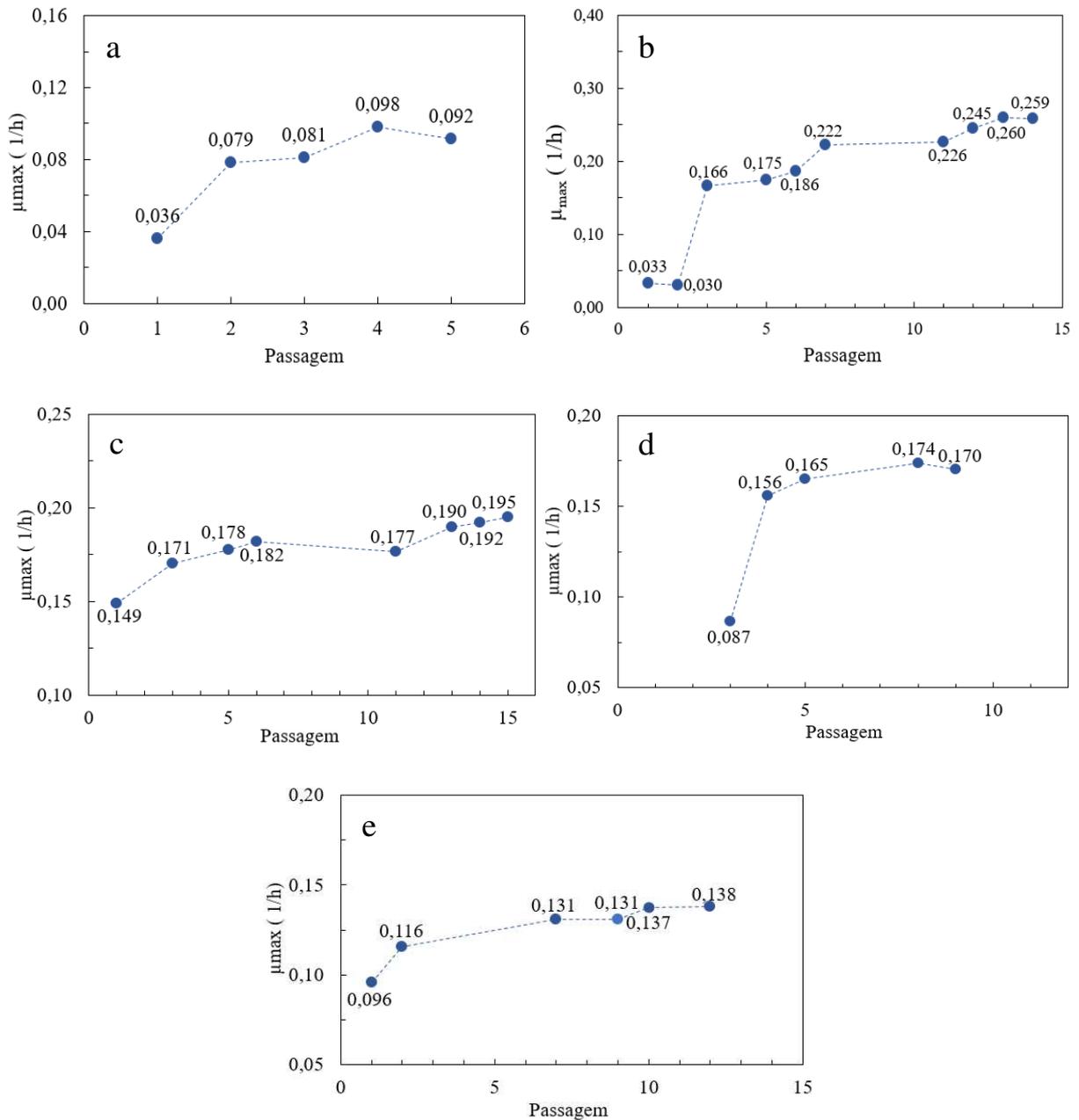
Etapa	Passagem	$\mu_{\max}$		
		Inicial (1/h)	Final (1/h)	Aumento (vezes)
1	5	0,036	0,092	2,6
2	14	0,033	0,259	7,8
3	15	0,149	0,195	1,3
4	9	0,087*	0,170	2,0
5	12	0,096	0,136	1,4

\*contabilizado a partir da terceira passagem.

A primeira etapa desta estratégia de adaptação com cultura heterogênea consistiu em cultivos com meio contendo 10% (v/v) de HHBCd. Verificou-se que as passagens levaram a levedura a um ganho de aptidão em relação aos cultivos anteriores (Figura 3.3a). O  $\mu_{\max}$  verificado no primeiro cultivo foi 0,036 1/h. Após sete passagens, pôde-se observar ganho de aptidão de aproximadamente 2,5 vezes na taxa máxima de crescimento, passando esta, para 0,092 1/h. Ao se verificar a estabilização nos valores de  $\mu_{\max}$  após cinco passagens, as células

foram coletadas; parte delas foram direcionadas para o início da ALEc e outra parte foi utilizada como inóculo para a segunda fase da ALEh.

**Figura 3.3** – Resultados de  $\mu_{\max}$  das diferentes etapas da ALEh com HHBCd na concentração (v/v): (a) 10%, (b) 20%, (c) 30%, (d) 40% e (e) 50%.



No início da segunda etapa da ALEh foi possível observar que o aumento na concentração de HHBCd no meio para 20% provocou redução na taxa de crescimento de 0,092 para 0,033 1/h (Figura 3.3b). Somente após 14 passagens verificou-se a estabilização nos valores de  $\mu_{\max}$ , em torno de 0,260 1/h. Com o aumento do  $\mu_{\max}$  de 0,033 1/h para 0,260 1/h, o tempo de duplicação celular reduziu em mais de oito vezes, passando de 21,3 para 2,7 h. Com a estabilização dos parâmetros cinéticos desta etapa deu-se início a etapa três da ALEh.

Na terceira etapa da ALEh, com 30% de HHBCd, também se observou ganho de aptidão no desenvolvimento da levedura, porém estes não foram tão expressivos como observado nas primeiras fases (Figura 3.3c). Se durante a primeira e segunda etapa o  $\mu_{\max}$  aumentou 2,5 e 8 vezes, respectivamente, nesta etapa o ganho de aptidão foi de somente 1,3 vezes, com  $\mu_{\max}$  partindo de 0,149 1/h e estabilizando em 0,191 após um número bem maior de passagens (14).

Na quarta etapa de adaptação, o ganho de aptidão em termos de  $\mu_{\max}$  foi de 1,96 vezes partindo de 0,0867 1/h para 0,170 1/h após nove passagens (Figura 3.3d). Diferente das etapas anteriores, nesta se verificou ganho expressivo de aptidão da terceira para quarta passagem, com aumento de 1,8 vezes. Contudo, da quarta passagem em diante o  $\mu_{\max}$  aumentou em apenas 10%.

Provavelmente, a estabilização do  $\mu_{\max}$  poderia ser verificada antes da 9ª passagem. Entretanto, não foi possível coletar adequadamente os dados cinéticos das passagens seis e sete de acordo com descrito no item 3.2.3. Na quinta etapa de adaptação da ALEh, os ganhos de aptidão foram de 1,4 vezes, com o valor de  $\mu_{\max}$  na primeira passagem de 0,0958 1/h e na 12ª de 0,138 1/h (Figura 3.3e). Nesta etapa da ALEh, a fase lag foi cerca de 5 h mais longa em comparação com as etapas anteriores, que variaram entre 15 e 20 h. As fases lag de 20 a 25 h observadas nesta quinta etapa, provavelmente ocorreram em virtude do maior desafio imposto pelo HHBCd, presente em 50% (v/v) no meio de cultivo.

De um modo geral, os valores de  $\mu_{\max}$  estáveis ao longo da ALEh reduziram com o avanço das etapas. Esta redução era prevista, visto que o aumento da concentração de HHBCd aumentou a presença de inibidores no meio. Além disso, houve redução de glicose, açúcar facilmente assimilável por microrganismos, e de outros componentes como extrato de levedura, sulfato e fosfato presentes no meio basal, que são potencializadores do desenvolvimento celular. Entretanto, há de se reconhecer o ganho de aptidão, uma vez que os aumentos de  $\mu_{\max}$ , desde as passagens iniciais até as em que o  $\mu_{\max}$  se estabilizavam, foram de 1,4 até 8,0 vezes. A ALEh

foi finalizada na quinta etapa, pois cultivos realizados com 60% (v/v) de HHBCd não resultaram em crescimento celular. As células obtidas ao fim da quinta etapa foram consideradas as cepas adaptadas por ALEh e denominadas Rth e armazenadas em solução 10% (v/v) de glicerol.

### 3.3.3. Adaptação evolutiva de laboratório com seleção de clones (ALEc)

Conforme dito no item 3.3.2, o início da ALEc se deu com a seleção de clones da cultura adaptada na primeira etapa da ALEh. As células foram semeadas em meio sólido seletivo e as colônias que se desenvolveram isoladamente e em menor tempo foram selecionadas para comparação dos respectivos  $\mu_{\max}$  em meio contendo 10% (v/v) de HHBCd (Tabela 3.3). Dentre as quatro colônias selecionadas o clone A apresentou valor superior de  $\mu_{\max}$  (0,209 1/h). Este clone A foi então utilizado como inóculo para próxima etapa da ALEh.

**Tabela 3.3** – Parâmetros cinéticos dos clones selecionados em ALEh com 10% (v/v) de HHBCd.

Clone	$\mu_{\max}$ (1/h)	TD (h)	R <sup>2</sup> da fase exponencial
<b>A</b>	0,209	3,3	0,974
<b>B</b>	0,131	5,2	0,997
<b>C</b>	0,117	5,9	0,993
<b>D</b>	0,139	4,9	0,978

Diferente da ALEh, a ALEc teve uma etapa de adaptação a menos, visto que os clones selecionados da primeira etapa foram originados na primeira etapa da ALEh (Tabela 3.4 e Figura 3.4). Durante a segunda etapa da ALEh, com HHBCd em 20% (v/v), verificou-se que as células de *R. toruloides* sofreram redução na aptidão já na primeira passagem em relação ao  $\mu_{\max}$  do clone selecionado na primeira etapa (de 0,209 1/h para 0,098 1/h), provavelmente em virtude do aumento de inibidores no meio (Figura 3.4a). Contudo, na terceira passagem já se observou ganho expressivo de aptidão para se desenvolver equivalente a 81% do  $\mu_{\max}$  estabilizado nesta etapa, 0,223 1/h. Comparando os valores de  $\mu_{\max}$  inicial e final o ganho total de aptidão foi de 2,3 vezes, o que causou redução da metade do tempo de duplicação celular, passando de 7,1 para 3,11 h.

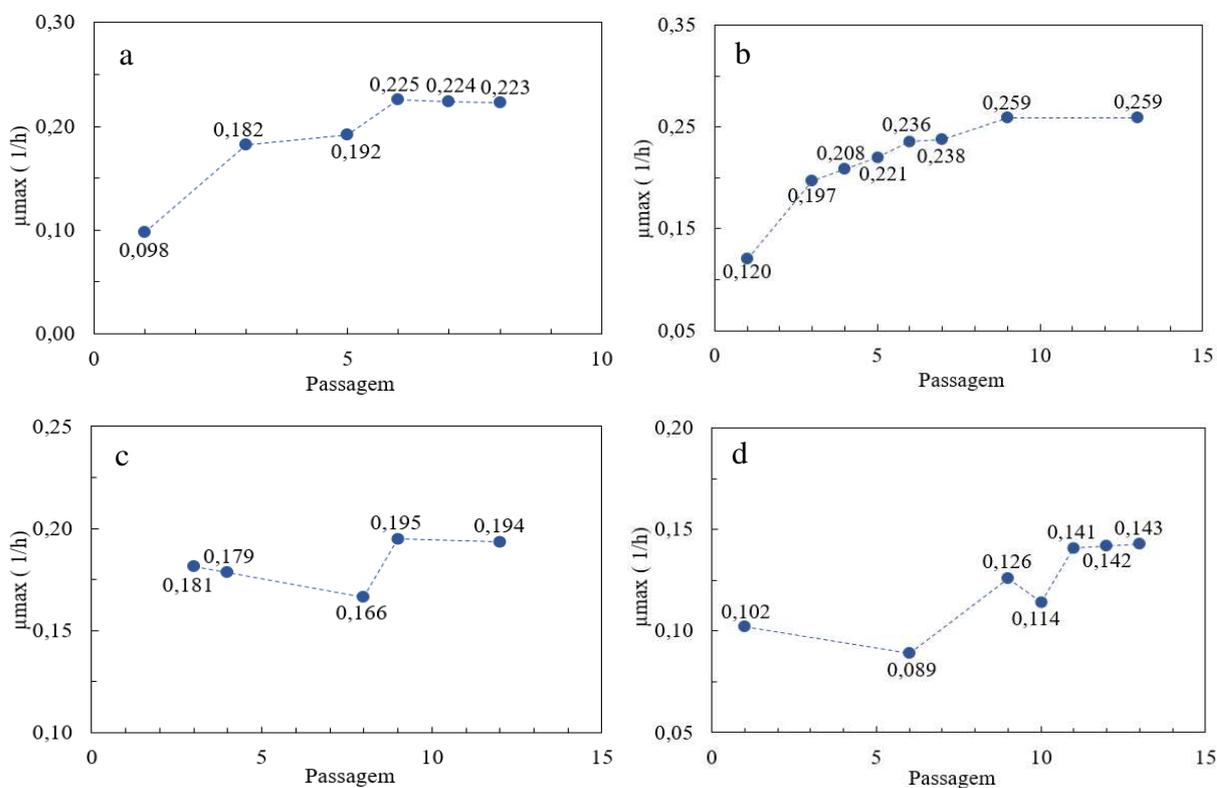
**Tabela 3.4** - Etapas, números de passagens e valores de dados cinéticos obtidos durante a ALEh.

Etapa	Passagem	$\mu_{\max}$		
		Inicial (1/h)	Final (1/h)	Aumento (vezes)
1	8	0,098	0,223	2,3
2	13	0,120	0,259	2,2
3	12*	0,181	0,194	1,07
4	13	0,102	0,143	1,4

\*contabilizado a partir da terceira passagem.

**Figura 3.4** – Resultados de  $\mu_{\max}$  da ALEc com HHBCd na concentração (v/v):

(a) 20%, (b) 30%, (c) 40%, (d) 50%.



Verificada a estabilização no  $\mu_{\max}$ , procedeu-se a seleção de clones, semeando-se as células do oitavo cultivo em meio sólido seletivo; cinco colônias foram selecionadas em virtude do menor tempo para se formarem. Todos os cinco clones selecionados para a comparação cinética apresentaram  $\mu_{\max}$  acima de 0,200 1/h (Tabela 3.5). Dentre os clones avaliados, o clone D apresentou maior  $\mu_{\max}$  e menor tempo de duplicação, 0,287 1/h e 2,4 h, sendo então, utilizado como inóculo para a terceira etapa da ALEh.

**Tabela 3.5** – Parâmetros cinéticos dos clones selecionados em ALEc com 20% (v/v) de HHBCd.

Clone	$\mu_{\max}$ (1/h)	TD (h)	R <sup>2</sup> da fase exponencial
A	0,235	2,9	0,960
B	0,205	3,4	0,985
C	0,265	2,6	0,980
D	0,287	2,4	0,886
E	0,248	2,8	0,966

Na terceira etapa da ALEc, verificou-se que o  $\mu_{\max}$  reduziu para menos da metade em relação ao do clone escolhido na etapa anterior (de 0,287 1/h para 0,120 1/h) (Figura 3.4b). Durante a 13<sup>a</sup> passagem, observou-se estabilização do  $\mu_{\max}$  em 0,259 1/h, com tempo de duplicação celular de 2,67 h. Possivelmente, a estabilização do  $\mu_{\max}$  ocorreu em passagens anteriores, entre a 10<sup>a</sup> e 12<sup>a</sup>.

Finalizada a terceira etapa da ALEh, fez-se a seleção dos clones desta etapa (Tabela 3.6). Análogo à fase anterior com 20% de hidrolisado, cinco clones também foram selecionados para comparação cinética. O clone selecionado (clone B) apresentou o maior  $\mu_{\max}$  frente aos outros (0,191 1/h), sendo o único que apresentou tempo de duplicação menor que 4 h (3,6 h). Com o clone mais apto escolhido, deu-se continuidade a ALEh.

**Tabela 3.6** - Parâmetros cinéticos dos clones selecionados em ALEc com 30% (v/v) de HHBCd

Clone	$\mu_{\max}$ (1/h)	TD (h)	R <sup>2</sup> da fase exponencial
A	0,156	4,5	0,994
B	0,191	3,6	0,992
C	0,169	4,1	0,992
D	0,172	4,0	0,981
E	0,167	4,1	0,995

Na quarta etapa da ALEc foram necessárias 12 passagens para se verificar estabilização do  $\mu_{\max}$  em 0,194 1/h (Figura 3.4c). É possível perceber que nesta etapa com 40% de HHBCd o ganho de aptidão em relação a terceira passagem foi de apenas 7%. Entretanto,

baseado nos perfis das etapas anteriores das duas estratégias de ALE, é possível que, nesta quarta etapa da ALEc o ganho em relação a primeira passagem tenha sido maior caso o perfil cinético fosse obtido.

Durante a seleção de clones da quarta etapa da ALEh um fato inédito foi observado: dentre os cinco clones selecionados para comparação cinética um deles apresentou desenvolvimento celular muito menor quando comparado com os outros, com  $\mu_{\max}$  de apenas 0,011 1/h e tempo de duplicação de 63 h (Tabela 3.7, clone B). Este clone teve fase de aceleração sutil e logo atingiu um platô. O clone D, com maior  $\mu_{\max}$  frente aos outros (0,136 1/h) foi escolhido para prosseguir com a ALEc.

**Tabela 3.7** - Parâmetros cinéticos dos clones selecionados em ALEc com 40% (v/v) de HHBCd.

Clone	$\mu_{\max}$ (1/h)	TD (h)	R <sup>2</sup> da fase exponencial
<b>A</b>	0.109	6,4	0.989
<b>B</b>	0.011	63,0	0.851
<b>C</b>	0.098	7,1	0.988
<b>D</b>	0.136	5,1	0.985
<b>E</b>	0.079	8.69	0.996

Na quinta etapa da ALEc, a estabilização do  $\mu_{\max}$  foi detectada após 13 passagens, com valor de 0,143 1/h (Figura 3.4d). Assim como na ALEh, na ALEc também foi observado que com o avanço das etapas, os valores de  $\mu_{\max}$  estáveis foram diminuindo em função do aumento da concentração de inibidores no meio e redução nas concentrações de nutrientes. Nesta quinta etapa da ALEc verificou-se ganho de aptidão de 38%, partindo de 0,102 1/h da primeira passagem para 0,143 1/h na 13<sup>a</sup>.

Na seleção de clones da quinta etapa, apenas um dos clones selecionados dentre aqueles escolhidos em meio sólido seletivo, conseguiu se desenvolver. Como não foi verificado crescimento dos outros quatro clones selecionados, fez-se novo cultivo com todos eles e novamente apenas um apresentou crescimento, com  $\mu_{\max}$  de 0,136 1/h. Este clone foi tido como a cepa resultante da adaptação evolutiva de laboratório com seleção de clones e nomeado como Rtc. Suas células foram coletadas e armazenadas em solução 10% (v/v) de glicerol. Observa-se que em meio sólido todos os clones se desenvolveram, por outro lado, em meio líquido contendo a mesma proporção de HHBCd apenas um dos clones conseguiu se desenvolver. A

formação de um gradiente de concentração de inibidores com concentração menor na superfície pode ser uma explicação para este fato. Durante o preparo do meio sólido, adicionava-se HHBCd em PDA liquefeito nas devidas razões, agitava-se manualmente a solução formada para completa homogeneização e distribuía-se o meio em placas de Petri estéreis. Possivelmente, no período de solidificação do meio, um gradiente de concentração de inibidores era formado, com a camada superior contendo menos agentes nocivos. Sendo assim, é provável que no meio sólido o contato dos inibidores com as colônias não tenha sido tão efetivo como em meio submerso. Além disso, é possível que o maior contato com oxigênio quando as células estavam em meio sólido pode ter contribuído para o desenvolvimento microbiano.

### 3.3.4. Estudo comparativo entre as cepas adaptadas e a parental em HHBCc

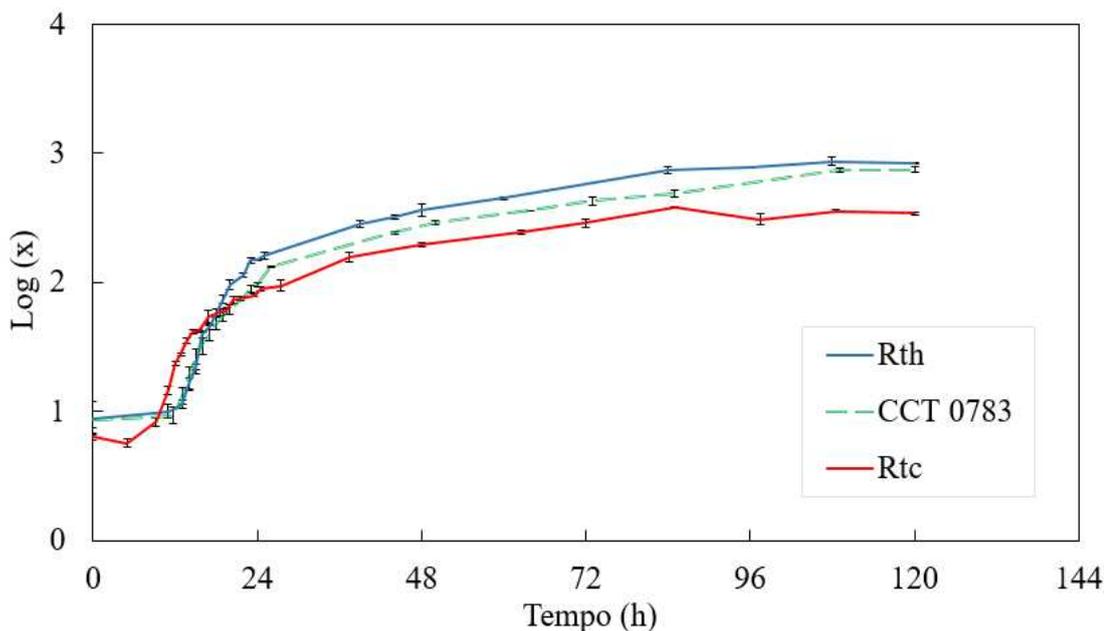
Tendo-se concluído as adaptações e obtido duas cepas adaptadas por estratégias distintas, realizou-se estudos comparativos para se definir qual seria a cepa escolhida para os estudos subsequentes. A escolha da melhor cepa adaptada foi feita após cultivo isolado das cepas Rth, Rtc e CCT0783 em HHBCc como fonte de carbono. Estes cultivos foram feitos com intuito de se verificar diferenciações causadas nas duas cepas adaptadas. Observando as cinéticas de crescimento das três cepas de *R. toruloides*, percebe-se que a cepa Rth apresentou o maior valor de  $\mu_{max}$  (0,142 1/h), seguido, pela cepa Rtc (0,096 1/h) e pela cepa parental (0,092 1/h) (Tabela 3.8, Figura 3.5).

**Tabela 3.8** - Dados cinéticos e produtividades referente aos cultivos isolados das cepas adaptadas e parental em HHBCc após 120 h.

<i>R. toruloides</i>	$\mu_{max}$ (1/h)	TD (h)	Fase lag (h)	Células (g/L)	Lipídios (%)	Produtividade lipídica (g/l·h)
<b>Parental</b>	0,092±0,005 <sup>a</sup>	7,53	13	5,69±0,07	56,02±3,33 <sup>a,b</sup>	0,027±0,002
<b>Rtc</b>	0,096±0,002 <sup>a</sup>	7,22	9	4,82±0,27	52,07±1,16 <sup>b</sup>	0,021±0,001
<b>Rth</b>	0,142±0,003	4,89	11	6,51±0,18	60,06±0,73 <sup>a</sup>	0,033±0,001

Sobrescritos <sup>a,b</sup>: valores na mesma coluna com sobrescritos iguais indicam que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, p<0,05).

**Figura 3.5** - Cultivo comparativo em HHBCc das cepas de *R. toruloides* Rtc, Rth e parental CCT0783.



O valor de  $\mu_{\max}$  obtido com a cepa Rth foi 54% superior ao observado com a cepa parental, o que significa ganho na aptidão desta cepa em se desenvolver em hidrolisados contendo concentrações de inibidores relativamente altas. Já o valor de  $\mu_{\max}$  obtido com a cepa Rtc (0,096 1/h) foi pouco superior ao observado com a cepa parental (0,092 1/h), o que representa 4,3% de superioridade.

Apesar de apresentar  $\mu_{\max}$  pouco superior em relação à cepa parental, a cepa Rtc teve menor fase lag em relação às outras cepas. Esta cepa Rtc apresentou fase lag de 9 h, o que representa tempo necessário para aceleração 37% menor quando comparado com a cepa parental (13 h). Apesar de apresentar  $\mu_{\max}$  semelhante ao da cepa parental, este menor tempo para aceleração do crescimento celular é um ganho de aptidão que, do ponto de vista industrial, é importante, pois representa menor tempo requerido para desenvolvimento celular. A cepa Rth também teve menor tempo de fase estacionária (11 h) quando comparada com a cepa parental.

Em termos de produção celular e lipídica, a cepa Rth também apresentou resultados superiores às outras, 6,51 g/l e 60,06 % (m/m), respectivamente. Em relação a biomassa, a cepa Rth apresentou valor 14% superior ao verificado pela cepa parental (5,69 g/l). Já em relação a produção lipídica, os valores foram menos expressivos, apenas 7% maiores. Entretanto, em termos de produtividade, os valores obtidos com a cepa Rth foram 22% e 55% maiores do que os alcançados pelas cepas parental e Rtc, respectivamente. Os menores valores de biomassa e

conteúdo lipídico foram verificados com a cepa Rtc com 4,82 g/l de biomassa e 52,07% (m/m) de conteúdo lipídico. Todavia, apesar dos melhores resultados obtidos com a cepa Rth, os ganhos na produção de biomassa e lipídios foram relativamente baixos quando comparados com os ganhos obtidos em relação ao  $\mu_{\max}$ . Como o objetivo foi obter cepas resistentes aos inibidores presentes no hidrolisado, a métrica adotada foi o  $\mu_{\max}$  e, provavelmente em função disso, os ganhos em produtividade celular e lipídica não tenham sido tão expressivos.

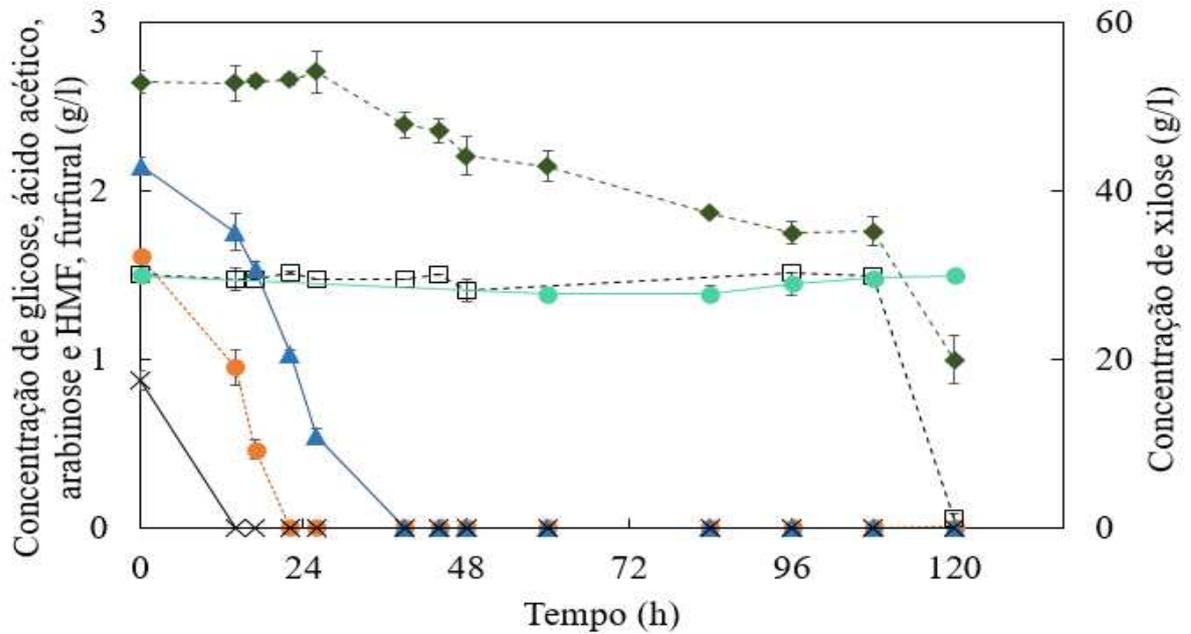
Os dados cinéticos do cultivo da cepa Rth em HHBCc indicaram um consumo de 62% da xilose em 120 h de cultivo (Figura 3.6). Observando os dados de assimilação dos substratos pode-se perceber que houve repressão catabólica da glicose em relação à xilose, pois somente após depleção da hexose (22 h), a xilose começou a ser consumida. Este fenômeno é comum em muitos microrganismos, uma vez que a glicose pode ser considerada o substrato preferido para uma vasta microbiota e muitas vezes age como uma molécula mensageira primária, sinalizando condições ótimas de cultivo para o mecanismo celular (ROLLAND; WINDERICKX; THEVELEIN, 2002). Os compostos HMF e ácido acético também foram consumidos rapidamente, após 14 e 39 h, respectivamente. Vale ressaltar que os consumos de HMF e ácido acético foram verificados simultaneamente ao consumo de glicose, diferente da xilose que passou a ser consumida efetivamente somente após o completo consumo da glicose e menor presença de ácido acético no meio.

Análogo ao observado com a cepa Rth, as cepas Rtc e parental apresentaram repressão catabólica da glicose em relação a xilose, porém, com menor intensidade, pois tanto xilose quanto glicose foram consumidos simultaneamente após 16 h de cultivo (Figuras 3.7 e 3.8). Entretanto, mesmo sofrendo repressão catabólica, a cepa Rth apresentou maior consumo de xilose. As cepas Rtc e parental consumiram, respectivamente, 41 e 46% da xilose contida no meio de cultivo.

Os perfis de consumo de HMF e ácido acético foram semelhantes aos observados no caso da cepa Rth. Por outro lado, somente a cepa Rth e a parental foram capazes de assimilar arabinose; porém, com 108 h de cultivo, este substrato foi completamente consumido pela cepa parental, enquanto que com a Rth o substrato só foi exaurido com 120 h, fato que demonstra perda de aptidão pela cepa Rtc no consumo deste substrato. Há duas hipóteses para esta perda de aptidão da Rtc em consumir arabinose: Silenciamento de genes ligados à assimilação do substrato ou repressão causada pela presença dos outros substratos.

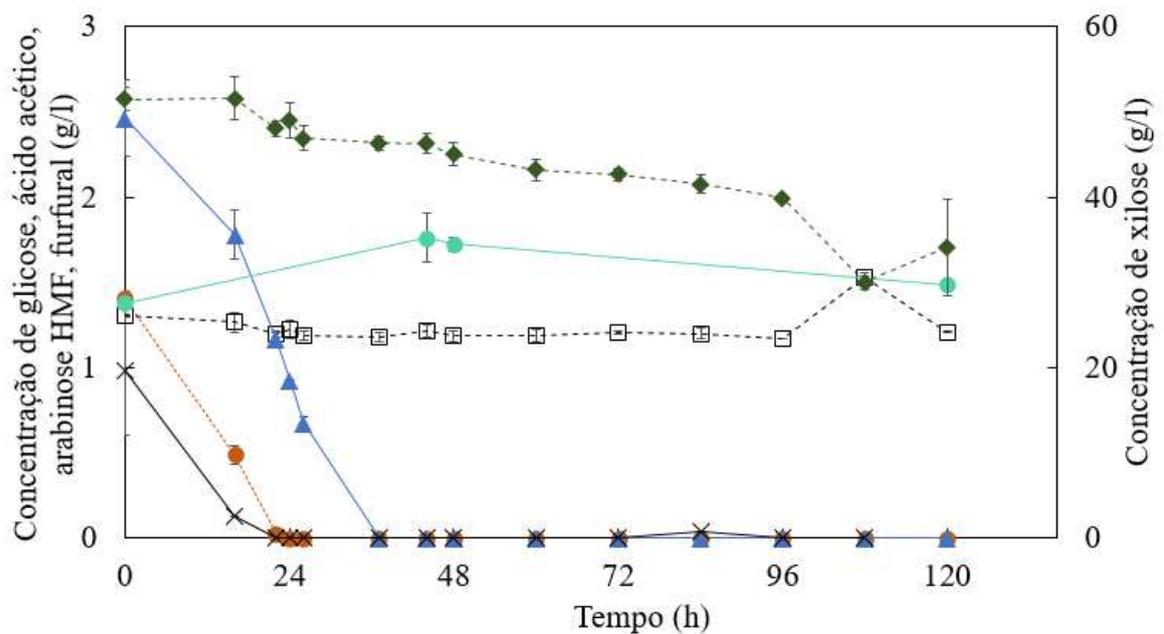
**Figura 3.6-** Cinética de consumo dos substratos presentes no HHBCc pela cepa Rth.

Xilose (◆), glicose (●), ácido acético (▲), arabinose (□), furfural (●) e HMF (×).

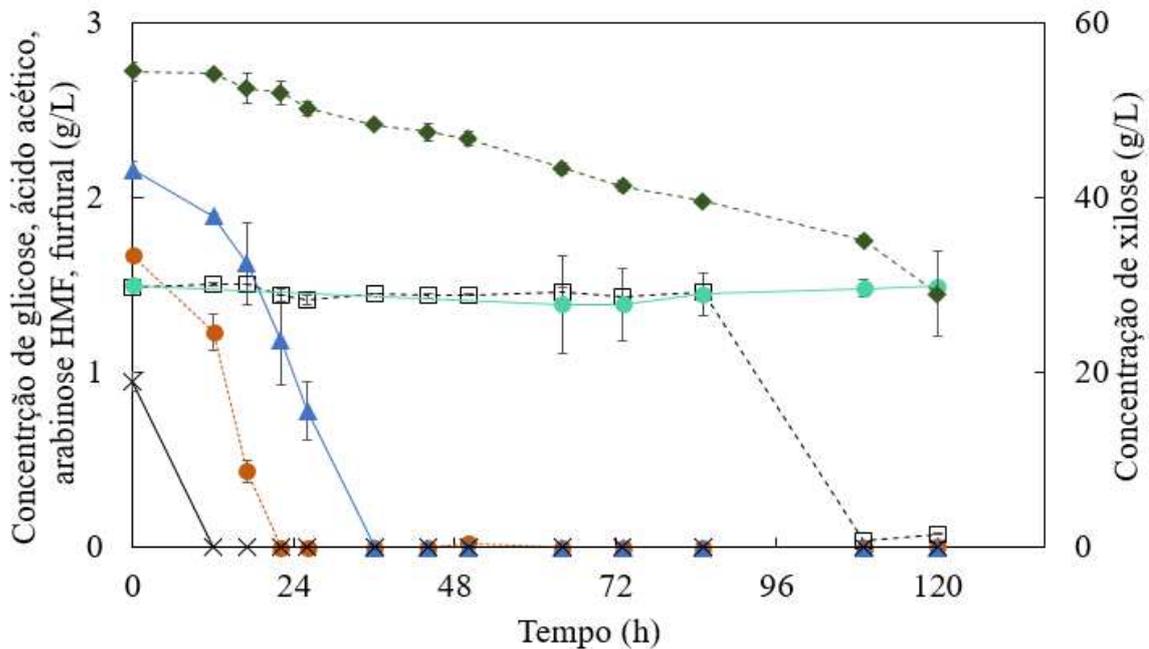


**Figura 3.7 -** Cinética de consumo dos substratos presentes no HHBCc pela cepa Rtc.

Xilose (◆), glicose (●), ácido acético (▲), arabinose (□), furfural (●) e HMF (×).



**Figura 3.8** - Consumo dos substratos presentes no HHBCc pela cepa parental. Xilose (◆), glicose (●), ácido acético (▲), arabinose (□), furfural (●) e HMF (×).



De maneira geral, percebe-se que, em termos de resistência e aptidão para se desenvolver em meio contendo potenciais agentes tóxicos, a Rth se sobressaiu em relação à cepa Rtc, tendo esta última, apresentado densidade celular menor até, em comparação com a cepa parental. É provável que o fato de o ambiente ter condição subótima para desenvolvimento tenha causado mudanças sistêmicas que, possivelmente desviaram o fluxo energético para manutenção e defesa em virtude dos inibidores, ao invés de desenvolvimento e multiplicação celular. Além disso, o ganho de aptidão devido à seleção de clones também pode não ter sido alcançado como observado pela Rth.

Ao ser cultivado em ambiente de estresse – condições subótimas – os organismos celulares se reorganizam com respostas customizadas para a situação específica (CHASMAN *et al.*, 2014). Estas respostas são reguladas por fatores de transcrição específicos para dada condição, que favorecem vias ativadas somente em casos de condições limitantes (HOHMANN; MAGER, 2003). Entretanto, leveduras em ambiente de estresse podem ativar um aparato de defesa chamado ambiente de resposta a estresse (ESR, do inglês *environmental stress response*) (CAUSTON *et al.*, 2001). Este ambiente é a base para a técnica de adaptação evolutiva. Crescimento ótimo e tolerância à condições extremas são vias concorrentes para alguns microrganismos, pois quão mais rápido as células crescem menos tolerantes às condições adversas elas são, sendo o inverso dessa relação válido (LEVY; ZIV; SIEGAL, 2012). Para

muitos casos o balanço entre estas duas hipóteses torna-se necessário para o adequado desenvolvimento do microrganismo, mesmo que isto possa ser dificultado pelo grau de adversidade no ambiente de cultivo. Apesar do aparato intracelular agindo em resposta ao estresse, autores como Berry e Gasch (2008) sustentam que todas as mudanças no transcriptoma para ativar o ESR, logo nos primeiros indicativos de estresse, não são exclusivas para resistência de maneira instantânea e pontual, mas também para o fenômeno de resistência ao estresse adquirida, para garantir que a progênie se beneficie frente às próximas adversidades. Estes autores também observaram que, mesmo submetendo a levedura *S. cerevisiae* a ambientes de estresse moderado ela foi capaz de obter resistência suficiente para ambientes ainda mais adversos.

Ainda de acordo com Berry e Gasch (2008) este ganho de aptidão se dá pelos fatores de transcrição Msnp e ou Msn4p, responsáveis por regular a expressão dos genes ligados ao ESR e, dependendo do grau de expressão destes genes, pode haver ganho maior ou menor de aptidão, fato este que provavelmente seja a explicação para as diferenciações observadas entre as cepas Rth e Rtc.

Manter a ALE sem a seleção de clone, provendo uma heterogeneidade, pode ter sido benéfico pois, segundo Honigberg (2011), até em espécies puras relativamente simples há mecanismos de organização de indivíduos em comunidades, de forma que o ganho de aptidão global em grupo é maior do que o de indivíduos isolados. Este ambiente heterogêneo de uma espécie é também beneficiado pela comunicação intercelular. Diferentes colônias da mesma espécie podem ter potencialidades diferentes (aptidões) e emitirem diferentes fatores de crescimento (e.g, feromônios e ou amônia), o que induz o crescimento de outras subpopulações e contribui para aptidão global (PALKOVA; FORSTOVA, 2000). Sendo assim, cultivar clones isolados possivelmente diminua a incidência de diferenciações benéficas que, quando somadas, configuram um ambiente simbiótico para que todas as subpopulações tenham êxito no desenvolvimento celular. Analisando da terceira etapa da ALEc em diante, percebe-se que ao se isolar os clones, o clone selecionado sempre apresentou  $\mu_{\max}$  inferior em relação ao seu cultivo em conjunto com as outras subpopulações na etapa de adaptação em que o  $\mu_{\max}$  se estabilizou (última passagem em que se verificou estabilização do  $\mu_{\max}$ ).

Os níveis de estresse aos quais as cepas foram submetidas neste trabalho são consideravelmente superiores ao que é relatado em literatura específica até o atual momento

(Tabela 3.9). Além disso, os resultados de biomassa e produção lipídica são equiparáveis ao que se tem relatado nos trabalhos semelhantes.

Kurosawa, Laser e Sinskey (2015) realizaram ALE de *Rhodococcus opacus* aplicando agentes tóxicos de maneira isolada: primeiro a lignina (0–2,0 g/l), em sequência 4-hidroxibenzaldeído (4-HB) (0 – 1 g/L) e siringaldeído (0 – 0,75 g/l). O método de adaptação teve como métrica o período de quatro dias de cultivo para cada uma das quatro concentrações do inibidor estudado. Finalizada as etapas com as concentrações de lignina, as células foram semeadas em meio sólido e o melhor clone foi utilizado para ALE utilizando 4-HB como a pressão seletiva e seguiu-se a mesma metodologia. Finalizada a ALE com 4-HB procedeu-se a ALE com siringaldeído. A cepa adaptada foi, então, cultivada em diferentes hidrolisados, porém não reportaram produtividade celular e lipídica. Segundo os dados cinéticos apresentados (OD vs tempo) em cultivo utilizando hidrolisado de palha de trigo, a fase lag foi de 48 horas, muito superior às 8 e 11 h observadas para Rtc e Rth, respectivamente. A hidrolisado utilizado por Kurosawa, Laser e Sinskey (2015) continha 500 e 87,5 vezes menos furfural e HMF, respectivamente, que o HHBCc utilizado no presente trabalho (Tabela 3.1). Além disso o hidrolisado utilizado pelos autores era composto majoritariamente de glicose, um substrato mais facilmente assimilado pelo microrganismo em comparação com a xilose (composto majoritário no HHBCc).

Díaz *et al.* (2018) desenvolveram técnica de ALE para *R. toruloides* de maneira que as concentrações do hidrolisado de palha de trigo fossem aumentadas gradativamente (25, 50, 75 até 100%). Os cultivos eram renovados a cada 24 h até que OD maior que 20 fosse observada. Após isto, procedia-se ALE com aumento na concentração de hidrolisado. Ao fim da ALE com 100% de hidrolisado, a colônia era semeada em meio sólido e fazia-se seleção de clones. Neste trabalho, Díaz *et al.* (2018) também utilizaram a técnica de engenharia genética na cepa escolhida com intuito de amplificar o consumo de xilose e aumentar produção lipídica. Entretanto, mesmo com cepa modificada geneticamente e hidrolisado contendo cerca de 10, 100 e 70 vezes menos furfural, fenóis e HMF, respectivamente, que o HHBCc utilizado neste presente, as produções lipídicas foram análogas às obtidas com a cepa Rth. Os autores contabilizaram 59% de conteúdo lipídico, semelhante aos 60% observados no presente trabalho, porém a produção celular verificada por Díaz *et al.* (2018), 8,5 g/l, foi superior às 6,51 g/l produzidas com a Rth. Assim como Kurosawa, Laser e Sinskey (2015), Díaz *et al.* (2018) também utilizaram hidrolisado majoritariamente composto por glicose.

**Tabela 3.9** - Composição parcial de hidrolisados utilizados durante adaptação de leveduras oleaginosas.

Hidrolisado	Composição em g/l (razão entre concentrações no HHBCc e no hidrolisado específico)							Referência
	Xilose	Glicose	Arabinose	Ácido acético	Furfural	Fenol	HMF	
HHBCc	55,0	1,5	1,5	2,3	1,0	6,4	1,4	Este trabalho
Palha de milho	13,9	34,4	1,7	0,329 (7)	0,002 (500)	-	0,016 (87,5)	(KUROSAWA; LASER; SINSKEY, 2015)
Palha de trigo	42	61	-	5,2 (-2,3)	0,1 (10)	0,06 (106)	0,02 (70)	(DÍAZ <i>et al.</i> , 2018)
HHBCA*	5,3	0,4	1,4	1,4 (1,6)	1,7 (-0,6)	-	0,2 (7)	(BONTURI <i>et al.</i> , 2017b)

\* hidrolisado hemicelulósico de bagaço da cana de açúcar

Bonturi (2017) como já discutido no item 2.9, também executou ALE da cepa parental *R. toruloides* CCT0783, porém em hidrolisado de bagaço da cana de açúcar não dopado com inibidores. Diferente de Díaz *et al.* (2018) e Kurosawa; Laser e Sinskey (2015), Bonturi (2017) utilizou ALE sem seleção de clones e também verificou ganhos expressivos em relação à cepa parental, quantificados até em nível transcricional. Em cultivo com hidrolisado suplementado com glicerol com intuito de aumentar a razão C/N, a autora reportou produção de 6,7 g/l de massa celular com 55% de conteúdo lipídico, resultado de biomassa semelhante à obtida com a Rth, porém com produção lipídica 5% inferior.

A cepa de *R. toruloides* adaptada por Bonturi (2017) foi cultivada em meios de cultivo contendo inibidores testados de maneira isolada. Ao fim do estudo a autora relatou que o ácido acético na concentração de 5,9 g/l causou produção de biomassa até 39% menor que o meio controle. Em relação ao furfural, concentrações de 1,25 g/l foram suficientes para inibir o crescimento da cepa em até 78%, o que demonstra o alto poder inibitório deste composto. Análogo ao observado nos cultivos do presente trabalho, Bonturi (2017) também observou o consumo de HMF pela levedura; entretanto, a autora relata que a presença deste composto proporcionou produção de biomassa 20% menor que o cultivo controle. Dentre os potenciais inibidores estudados, o composto fenólico vanilina foi o mais nocivo, visto que, acima da concentração de 1,25 g/l o cultivo foi completamente inibido. Vale destacar que, no presente estudo, mesmo com concentração de fenóis de 6,4 g/l, todas as cepas se desenvolveram, incluindo a parental. Entretanto, ao se utilizar hidrolisado hemicelulósico pode ocorrer um efeito sinérgico devido à complexidade do meio, o que pode reduzir o efeito nocivo de determinados compostos, fato este também observado em Bonturi (2017).

### 3.4. Conclusão

As duas estratégias utilizadas neste estudo, com e sem seleção de clones, foram capazes de promover melhorias nas cepas obtidas utilizando a métrica de estabilização de  $\mu_{\max}$  para continuidade das próximas etapas de ALE. Em comparação com a cepa parental, observou-se maiores produções celulares e lipídicas pelas cepas adaptadas, além de relativo maior consumo de xilose, principal composto HHBC. Comparou-se duas estratégias de ALE presentes em literatura específica e observou-se qual estratégia foi melhor para adaptação evolutiva de *R. toruloides* em HHBC contendo altas concentrações de inibidores. A estratégia de ALE utilizando cultura heterogênea proporcionou obter uma cepa mais robusta (Rth) em comparação com as cepas parentais e a Rtc. O  $\mu_{\max}$  da cepa Rth foi 54% superior ao da cepa parental durante

o cultivo em HHBCc. Em relação à produtividade celular e lipídica, os ganhos foram de 15% e 7%, respectivamente, para 120 h de cultivo. A Rtc apresentou ganho pouco expressivo em relação a taxa máxima de crescimento celular. Entretanto, a cepa apresentou fase lag 30% mais curta em relação à cepa parental.

#### **4. HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE *Eucalyptus urograndis* COMO SUBSTRATO PARA CEPAS DE *R. toruloides* ADAPTADAS EM HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DA CANA DE AÇÚCAR**

##### **4.1. Introdução**

Como apresentado na seção 2.5, a indústria de papel e celulose processa grandes quantidades de biomassa de eucalipto, sendo a fração hemicelulósica não eficientemente aproveitada (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2011). No processo de polpação kraft, os cavacos de madeira junto com o licor branco são cozidos a altas temperaturas (145-170 °C) para deslignificação da biomassa e obtenção da celulose. Após o cozimento, o material é lavado e a celulose obtida segue para a etapa de polpação. A fase líquida (licor negro), composto majoritariamente de lignina solubilizada e hemicelulose, é concentrado até 65% de sólidos (FERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2019). Este licor é comumente queimado para geração de calor e fornecimento de energia para a planta (ENGELBERTH; VAN WALSUM, 2012; VILA *et al.*, 2011). A lignina tem um calor específico relativamente alto, em torno de 25 J/kg, enquanto a hemicelulose possui calor específico correspondente à metade deste valor. Sendo assim, a hemicelulose contribui minimamente para eficiência das caldeiras durante a geração de calor. Desta maneira, há uma oportunidade de desenvolvimento de novas estratégias de utilização da fração hemicelulósica buscando agregar maior valor à esta fração da biomassa lenhosa. Uma possibilidade é utilizar o hidrolisado da fração hemicelulósica de eucalipto como fonte de carbono para processos biológicos na obtenção de produtos com relativo alto valor agregado (ENGELBERTH; VAN WALSUM, 2012), como exemplo óleo microbiano para produção de biodiesel.

O Brasil é o segundo maior produtor de polpa celulósica do mundo, em grande parte a partir de *Eucalyptus urograndis*, tendo 5,7 milhões de hectares de árvores plantadas, o que o coloca, como um dos países com maior plantação de madeira de lei no mundo (INSTITUTO BRASILEIRO DE ÁRVORES, 2017). Sendo assim, reporta-se neste capítulo estudo do cultivo de *R. toruloides* para produção de óleo microbiano em fração hemicelulósica de *E. urograndis*.

Para tal, devido à ausência de métodos pré-estabelecidos para a produção de hidrolisados ricos em xilose a partir de eucalipto, iniciou-se este estudo com extrações hidrotérmicas da fração hemicelulósica de *E. urograndis* em diferentes tempos, temperaturas e razões sólido:líquido. Os resultados foram comparados em termos de rendimento mássico de xilose após hidrólise ácida e conteúdo de açúcar redutor. A condição de extração escolhida como mais adequada foi utilizada para obtenção do hidrolisado hemicelulósico de eucalipto, denominado aqui HHE. Com a melhor condição de hidrolisado definida, prosseguiu-se com os cultivos utilizando HHE como fonte de carbono para cepas adaptadas de *R. toruloides*.

Os estudos contidos neste capítulo, desde as verificações para melhor condição de extração da fração hemicelulósica, até definição das melhores condições de cultivo, foram desenvolvidos em paralelo à ALE apresentada no Capítulo 3. Em razão deste paralelismo, os primeiros cultivos foram realizados com a cepa adaptada *R. toruloides* CCT7815, pois foi adquirida previamente aos estudos de adaptação, sendo assim, os primeiros ensaios em relação aos cultivos com HHE, foram feitos utilizando a cepa *R. toruloides* CCT7815.

## **4.2. Materiais e métodos**

### **4.2.1. Amostras de *E. urograndis***

Cavacos de *E. urograndis*, gentilmente doados pela Fibria (Jacareí, Brasil), foram moídos em moinho de facas, gerando um material com 82% das partículas com tamanho entre 65 e 32 mesh.

### **4.2.2. Microrganismos**

A cepa de *Rhodotorula toruloides* CCT 7815 utilizada neste trabalho foi adquirida da Coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello (Campinas, SP). Esta cepa foi adaptada por Bonturi *et al.* (2017) em hidrolisado hemicelulósico do bagaço da cana de açúcar. A outra cepa de *R. toruloides* utilizada foi a Rth, obtida através de ALE heterogênea em HHBCd conforme descrito no Capítulo 3. As células, antes mantidas a -80 °C foram reativadas em meio YPD para condução da adaptação evolutiva de laboratório.

### **4.2.3. Reator para extração da fração hemicelulósica de eucalipto**

As extrações da fração hemicelulósica de eucalipto foram executadas em uma estufa rotativa modelo TE-028 (Tecnal, Piracicaba, Brasil) utilizando cilindros de aço

inoxidável como vasos de extração. Os cilindros (100 ml de volume útil), contendo a mistura de água e cavacos, eram fixados no eixo rotativo da estufa que, por tombamento dos cilindros a 60 rpm realizava a agitação da massa em extração. Como estabelecido pelo fabricante, 160 °C é a temperatura máxima de operação.

#### **4.2.4. Outros materiais**

Todos os reagentes utilizados neste estudo eram de grau analítico. Todas as soluções foram preparadas utilizando água purificada em equipamento (MilliQ Millipore, Bedford, EUA). Os cultivos foram executados em frascos tipo Erlenmeyer de 250 ml utilizando 20% do volume total. Os frascos foram mantidos em incubadora com agitação orbital modelo TE-4200 (Tecnal, Piracicaba, Brasil) a 28 °C e 200 rpm. Uma centrífuga modelo 5804R (Millipore, Bedford, EUA) foi operada a 4 °C, 8.228g por 15 min para recuperação de células. Para determinação de biomassa seca e lipídios foram utilizados frascos tipo Schott âmbar de 100 ml. Para recuperação do solvente utilizado na extração de lipídios da biomassa foi utilizada bomba a vácuo modelo LR-271C (Grieve, Illinois, EUA) e um evaporador rotativo modelo TE-211 (Tecnal, Piracicaba, Brasil). A esterilização de material foi realizada a 121 °C por 15 min em autoclave. Todas as soluções para cultivo foram esterilizadas com filtro de poro 0,22 µm marca JetBiofil (Guangzhou Jet Bio-Filtration, Guangzhou, China). O Software Statistica® 7.0 foi utilizado para projeto experimental e cálculos estatísticos.

#### **4.2.5. Extração da hemicelulose de cavacos de madeira**

Dentro dos cilindros de extração contendo 10 g de cavacos de madeira moído, adicionou-se água para se alcançar razões sólido:líquido (S:L) desejadas. Os cilindros eram fechados e mantidos na estufa de extração durante temperaturas e tempos específicos. Após isto, filtrava-se a mistura reacional em papel filtro (Unifil, Alemanha) e a fração líquida, contendo hemicelulose solubilizada, era então hidrolisada a 121 °C por 60 min com adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5% (v/v) de acordo com método apresentado por (SLUITER *et al.*, 2006). Os hidrolisados tiveram os valores de pH ajustados com adição de CaO (calagem) para 5,0 ou 6,2. Após a calagem, filtrava-se o material com papel quantitativo e este era esterilizado de acordo com o descrito no item 4.2.4.

As primeiras extrações foram feitas de acordo com planejamento fatorial 2<sup>2</sup> com intuito de investigar como as variáveis razão S:L, tempo e temperatura poderiam afetar a solubilização da fração hemicelulósica de eucalipto (Tabela 4.1).

**Tabela 4.1** - Variáveis do planejamento experimental 2<sup>2</sup> do primeiro estudo de extração

Variável	-1	0	+1
Temperatura (°C)	120	140	160
Tempo (min)	60	105	150
Razão S:L	1:4	1:6	1:8

#### 4.2.6. Cultivo das cepas adaptadas

A reativação das células foi feita em tubos tipo Falcon contendo 10 ml de meio YPD e 1 ml de células durante 24 h a 200 rpm e 28 °C. As células reativadas foram transferidas para frascos tipo Erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml de meio YPD e incubadas por 24 h a 28 °C e 200 rpm. Após este período, as células foram coletadas por centrifugação e ressuspensas em solução de NaCl 0,9% (m/v) para uma OD (absorbância a 600 nm) de 20 para serem utilizadas como inóculo nos ensaios com hidrolisados.

Os cultivos em HHE foram feitos em triplicata em frascos tipo Erlenmeyer de 250 ml contendo 44 ml de HHE, 5 ml de inóculo e 1 ml de solução mineral (MEESTERS; HUIJBERTS; EGGINK, 1996). Para o primeiro estudo envolvendo o uso de HHE, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e extrato de levedura (3,8% de nitrogênio amoniacal e 10,5% de nitrogênio total) foram utilizados para se alcançar as razões molares de C/P e C/N desejadas para o início do cultivo, sendo os frascos incubados por 96 h. Os cultivos subsequentes, com hidrolisado hemicelulósico de eucalipto concentrado (HHEc), duraram 120 h, 24 h a mais que o primeiro cultivo com HHE em virtude da maior concentração da fonte de carbono. Em todos os cultivos a amostragem para quantificação de massa celular e lipídios ocorreram apenas ao final dos ensaios; já as amostragens para monitoramento de consumo dos substratos foram feitas em intervalos de 24 h.

Os primeiros cultivos com a cepa CCT7815 também avaliaram os efeitos das razões C/N e C/P. Para tal, fez-se experimentos baseados em um planejamento composto central utilizando EHH (Tabela 4.2).

#### 4.2.7. Métodos analíticos

A quantificação de açúcares redutores totais foi feita utilizando-se o método proposto por (MILLER, 1959) tendo-se xilose como padrão. As concentrações de xilose, ácido acético, glicose, HMF e furfural foram determinadas por HPLC (equipamento modelo Dionex

**Tabela 4.2** - Planejamento composto central para cultivos da cepa CCT7815 utilizando sob diferentes razões C/N e C/P com EHH como fonte de carbono.

Variável	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	+1,41
<b>Razão C/N</b>	38,5	100	250	400	461,5
<b>Razão C/P</b>	50,8	100	220	340	389,2

Ultimate 3000, ThermoScientific, Sunnyvale, EUA) equipado com coluna HPX-87H (Biorad, Hercules, EUA) operando a 50 °C, utilizando solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mmol/l como fase móvel a vazão de 0,6 ml/min.

O crescimento celular foi monitorado por OD em intervalos de 24 h (espectrofotômetro Quimis, Diadema, Brasil). A quantificação de massa celular foi feita por gravimetria: as amostras de 30 ml coletadas ao fim dos cultivos foram secadas em estufa por 24 h a 100 °C. A quantificação de lipídios também foi executada por gravimetria após extração dos lipídios utilizando clorofórmio e metanol seguindo o método proposto por Folch, Lees e Stanley (1957).

### 4.3. Resultados e discussão

As extrações feitas de acordo com planejamento fatorial 2<sup>2</sup> permitiram concluir que na faixa de temperatura estudada, apenas o tempo e temperatura afetaram os rendimentos em termos de açúcares redutores (Tabela 4.3). Porém, dependendo da biomassa lignocelulósica utilizada a razão S:L pode ter forte efeito nos rendimentos de xilose extraídas em temperaturas mais elevadas (160-190°C) (SANTUCCI *et al.* 2015).

Uma condição de máxima extração de açúcares para se obter uma superfície de resposta com máximo global não foi alcançada. De acordo com dados fornecidos pela Fibria a fração hemicelulósica da amostra de *E. urograndis* era composta parcialmente por (% m/m): pentoses (15,9), galactose (0,85) e manose (1,14). Considerando as 10 g de biomassa lenhosa utilizadas para extrações, o máximo teórico de açúcares totais redutores seriam por volta de 1,8 g, pois a glicose também pode estar presente nesta fração hemicelulósica (SUN *et al.* 2014). Entretanto, os resultados indicaram que maiores concentrações de hemicelulose solubilizada poderiam ser alcançadas com maiores tempos e temperaturas de extração.

**Tabela 4.3** - Resultados obtidos do planejamento fatorial  $2^2$  da extração da fração hemicelulósica de eucalipto.

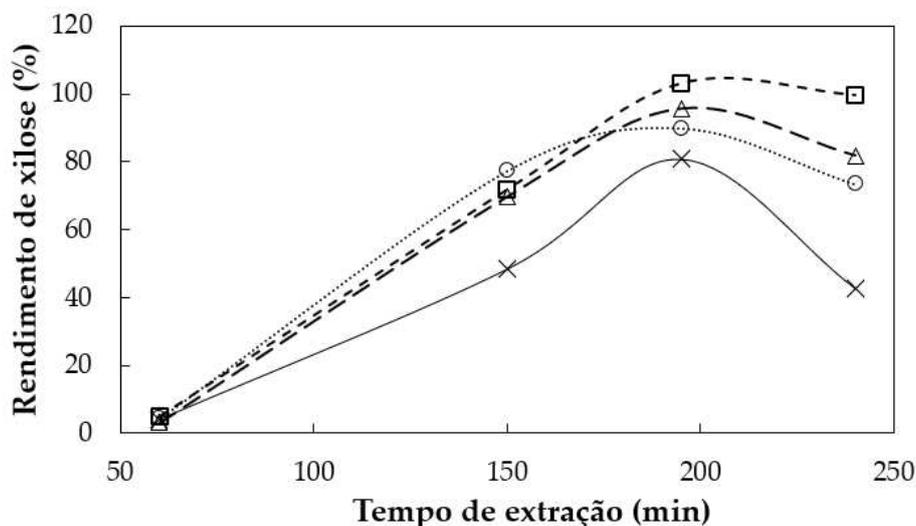
<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Razão S:L (g/g)</b>	<b>Tempo (min)</b>	<b>Açúcares redutores totais (g)</b>
120	1:4	60	0,04
120	1:8	60	0,03
120	1:4	150	0,11
120	1:8	150	0,08
140	1:6	105	0,19
140	1:6	105	0,19
140	1:6	105	0,16
160	1:4	60	0,13
160	1:8	60	0,25
160	1:4	150	1,60
160	1:8	150	1,56

O segundo estudo de extração foi conduzido a temperaturas entre 145 °C a 160 °C, tempos de extração variando de 60 até 240 min e razão S:L de 1:8 (Figura 4.1, Tabela 4.4). As extrações a 160 °C com duração de 195 e 240 min resultaram na quase completa extração da hemicelulose. Já os experimentos a 155 °C por 195 min resultaram em extração de 95% da hemicelulose. Assim como a xilose, os compostos glicose, arabinose, ácido acético, HMF e furfural também apresentaram maiores concentrações em tempos de extração maiores, alcançando concentrações máximas com 195 min de extração.

Em relação a variável tempo, extrações mais longas resultaram em maiores concentrações de açúcar (Figura 4.1). A condição de 155 °C e 195 min foi escolhida a mais eficiente, pois 95% da hemicelulose foi solubilizada em menores tempo, com conseqüente menor gasto energético, quando comparada com extração a 160 °C e 240 min.

As concentrações de açúcar redutor obtidas após 195 min foram ligeiramente superiores às obtidas após 240 min de extração. Isto possivelmente ocorreu devido à degradação dos monômeros (hexoses e pentoses) em virtude da queda de pH durante a extração e a auto-hidrólise. A queda de pH observada durante extrações hidrotérmicas de frações hemicelulósicas sob altas temperaturas e pressões é o resultado da auto-ionização da água, o que leva à maiores

**Figura 4.1** - Rendimento de xilose para as extrações da fração hemicelulósica de eucalipto sob razão S:L de 1:8 em diferentes tempos e temperaturas: (X) 145°C, (o) 150 °C, (Δ) 155°C e (□)160°C.



concentrações de  $H_3O^+$  no sistema (ZUMDAHL; ZUMDAHL, 2007). A formação de ácido acético após a clivagem dos grupos acetil também contribui para redução nos valores de pH (LIU, SHIJIE, 2010). A redução do pH em virtude da liberação de ácido acético e auto-ionização da água pode contribuir para reações de transformação de monômeros de açúcares em grupos mais reduzidos como ácido levulínico e fórmico (JUN; TSCHIRNER; TAUER, 2012; YANG; WYMAN, 2008).

A extração seletiva da hemicelulose é de suma relevância para ideia de agregar valor para essa fração lignocelulósica e manter a celulose intacta, assim, não interferindo no processo de polpação. Possivelmente, a celulose não foi atacada durante as extrações hidrotérmicas, pois a xilose representou em torno de 96% dos açúcares no hidrolisado para as extrações a 155 e 195 °C (Tabela 4.4). A glicose presente no hidrolisado muito provavelmente originou-se da hemicelulose, uma vez que a hemicelulose de *E. urograndis* pode ter em sua composição, além de xilose, manose, arabinose, ramnose e galactose, também glicose (SUN *et al.*, 2014).

Como já dito, a melhor condição de extração em termos de obtenção de xilose resultou em 96% deste açúcar dentre os compostos quantificados no hidrolisado. Mesmo em condição relativamente branda, este valor é consideravelmente superior ao de alguns trabalhos da literatura específica. Gallina *et al.* (2016) obtiveram 82% como rendimento máximo global em termos desta pentose durante extração a 285 °C. Rafiqul e Sakinah (2012) estudaram o efeito

**Tabela 4.4-** Composição parcial do EHH para extrações feitas com razão S:L de 1:8.

T (°C)	t (min)	Volume (l)	Concentração do composto em g/l					
			Glicose	Xilose	Arabinose	Ácido acético	HMF	Furfural
145	60	0,115	0,215	0,472	0,052	0,094	0,001	0,013
	150	0,135	0,326	4,668	0,073	1,137	0,017	0,249
	195	0,135	0,387	7,781	n.d.*	1,885	0,021	0,424
	240	0,13	0,293	4,264	0,081	1,075	0,000	0,212
150	60	0,105	0,153	0,541	0,045	0,094	0,000	0,017
	150	0,135	0,372	7,447	0,054	1,767	0,022	0,371
	195	0,135	0,419	8,656	n.d.*	2,129	0,023	0,516
	240	0,137	0,348	6,963	n.d.*	1,727	0,020	0,341
155	60	0,115	0,177	0,357	0,059	0,071	0,003	0,007
	150	0,133	0,344	6,809	0,052	1,649	0,017	0,334
	195	0,132	0,532	9,552	n.d.*	2,337	0,012	0,652
	240	0,130	0,390	8,177	n.d.*	2,023	0,007	0,452
160	60	0,112	0,187	0,573	0,002	1,750	0,003	0,410
	150	0,130	0,320	7,790	0,001	1,840	0,018	0,492
	195	0,115	0,421	12,196	n.d.*	2,412	0,025	0,587
	240	0,110	0,489	12,352	n.d.*	2,348	0,021	0,644

n.d.\* : não detectado, T: temperatura; t: tempo.

do tempo, concentração de ácido e razão S:L sobre a extração e hidrólise da fração hemicelulósica de serragem de madeira e reportaram rendimento máximo de 86% de xilose após extração e hidrólise a 125 °C, 60 min, razão S:L de 8 e 4 % (v/v) de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, respectivamente.

#### 4.4. Cultivos de cepas adaptadas de *R. toruloides* em hidrolisados hemicelulósicos de eucalipto

Após a escolha da condição de extração da fração hemicelulósica de eucalipto mais adequada (160 °C e 195 min), e obtenção do hidrolisado (HHE), procedeu-se com os cultivos utilizando HHE como substrato para cepas de *R. toruloides* adaptadas em hidrolisado hemicelulósico de bagaço da cana de açúcar.

Os primeiros estudos demonstraram como seria a produção lipídica e celular sob diferentes razões C/N e C/P (Tabela 4.5). Finalizado os estudos de acordo com o planejamento composto central verificou-se que os melhores resultados foram obtidos em cultivos com C/N inicial de 100. Observou-se que as maiores concentrações celular foram obtidas sob C/N inicial de 100, o que contribuiu para também se alcançar melhores valores de produtividade lipídica.

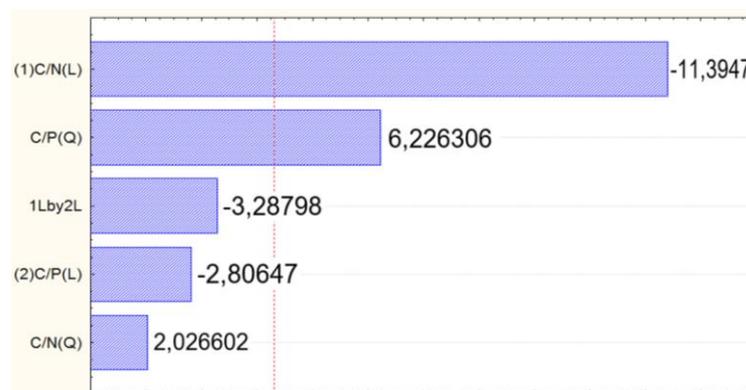
**Tabela 4.5** - Produção de biomassa e lipídios por *R. toruloides* após 96 h de cultivo em EHH sob diferentes razões C/N e C/P.

Amostra	C/N	C/P	Biomassa (g/l)	Lipídios		Produtividade (mg/(l.h))
				(g/l)	(%)	
1	100	100	5,11	1,35	26,42	14,00
2	100	340	6,52	1,45	22,24	15,00
3	400	100	3,05	0,69	22,62	7,00
4	400	340	3,02	0,39	12,91	4,00
5	38,5	220	5,96	0,81	13,59	8,00
6	461,5	220	3,16	0,64	20,25	7,00
7	250	50,8	4,81	1,04	21,62	11,00
8	250	389,2	3,88	0,84	21,65	9,00
9	250	220	5,08	0,76	14,96	8,00
10	250	220	3,25	0,66	20,31	7,00
11	250	220	3,75	0,65	17,33	7,00

Altos valores de C/N (389, 400 e 461,5) não favoreceram as produções celulares e lipídicas. Já as C/N médias (250) não resultaram em relativas boas produções celulares, mas alcançou-se conteúdos lipídicos próximos aos maiores observados neste estudo com

planejamento composto central. De acordo com o diagrama de Pareto, a 95% de certeza, o efeito da razão C/N foi expressivamente mais significativo do que a razão C/P (Figura 4.2).

**Figura 4.2** - Diagrama de Pareto para cultivos de *R. toruloides* sob diferentes razões C/N e C/P (absolute values,  $p=0.05$ ).



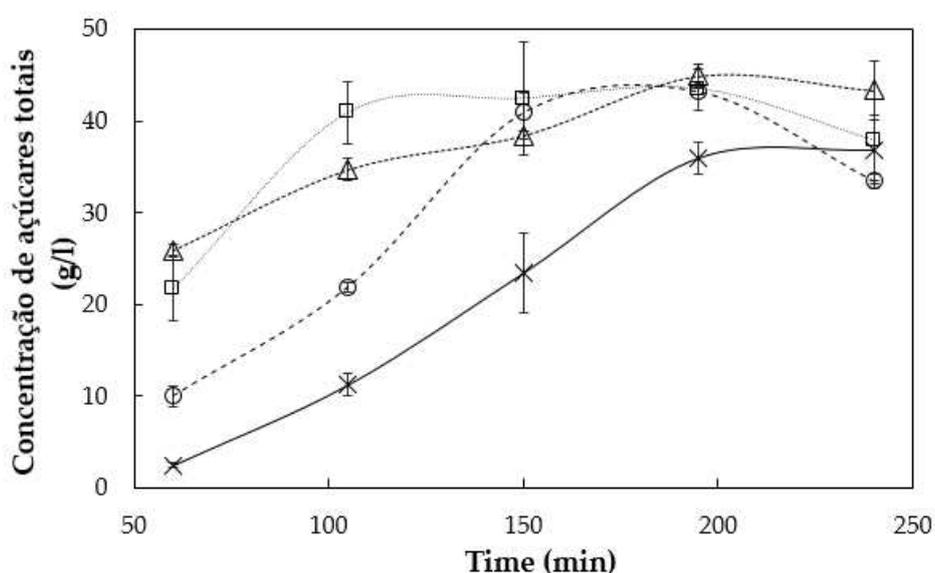
Os relativos baixos conteúdos lipídicos em todos os cultivos provavelmente ocorreram devido ao baixo conteúdo de carbono no hidrolisado, como exemplo, a concentração de xilose em torno de 12,19 g/l. Para contornar este problema, um hidrolisado com maior concentração de substratos foi obtido ao se realizar extrações com razões S:L mais elevadas. Baseado em dados que indicavam que o perfil de extração em termos de açúcar não se alterava ao se adotar S:L mais altas (Figura 4.3), um hidrolisado hemicelulósico com maior concentração de substratos (HHEc) foi preparado com razão S:L de 1:2 a 155 °C durante 195 min (Tabela 4.6). Após a calagem, este HHEc continha três vezes mais xilose que o HHE (37,399 g/l vs 12,196 g/l).

As primeiras tentativas de cultivo com HHEc em pH inicial igual a 5,0 não apresentaram desenvolvimento celular. Frente a este observado, foram feitas diluições sucessivas do hidrolisado com água (30, 50, 70% (v/v)) e novos cultivos foram realizados também a pH inicial igual a 5,0. Mesmo assim, cultivos com estes hidrolisados diluídos também não apresentaram qualquer desenvolvimento celular. Novo cultivo foi feito, porém em pH inicial de 6,2 e, então, crescimento celular foi observado (Figura 4.4), obtendo-se concentração celular de 6.0 g/l e conteúdo lipídico de 50%. A xilose, açúcar majoritário no hidrolisado, de concentração inicial de 32,00 g/l, ao fim de 120 h de cultivo foi consumida em 30%. Por outro lado, o ácido acético foi completamente consumido após 96 h de cultivo, o que resultou em aumento no pH, chegando a 7,8 ao fim do cultivo. Já a glicose foi completamente consumida após 24 h.

O HMF apresentou perfil ascendente durante as primeiras 48 h de cultivo da *R. toruloides* CCT7815. Entretanto, não se esperava geração deste composto, uma vez que sua

formação a partir da biomassa lignocelulósica ocorre somente em condições de maiores temperaturas, pressão e com pH altamente ácido. Possivelmente, este perfil ascendente deve-se a possíveis ruídos no processo de quantificação em HPLC. Ainda sobre o HMF, em relação aos cultivos em que se observaram reduções das concentrações deste composto, é factível a possibilidade de que estas reduções ocorreram apenas em virtude de seu consumo pela *R. toruloides*, pois sua degradação por outras vias ocorreria sob condições distintas das empregadas no cultivo (temperatura, pressão e pH), requerendo também presença de catalizadores metálicos, altas concentrações de  $\text{OH}^-$  e ou enzimas específicas (KONG *et al.* 2018).

**Figura 4.3** - Cinética de formação de açúcares redutores para EHH obtidos sob temperatura de 145 °C (X), 150°C (O), 155°C (□), 160°C (Δ) e razão S:L de 1:3.



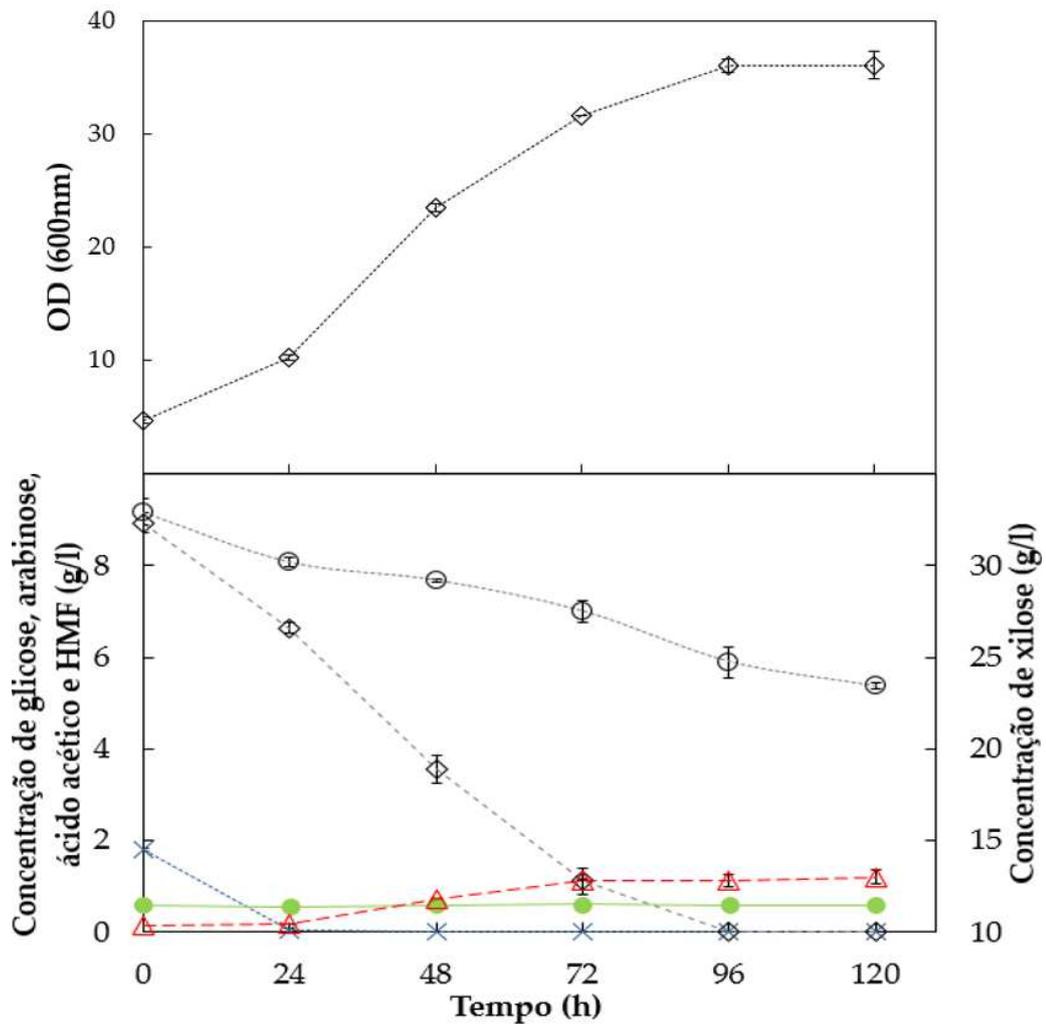
**Tabela 4.6** - Composição do HHEc obtido a 155 °C, 195 min e razão S:L de 1:2.

Hidrolisado	Concentração (g/l)				
	Xilose	Ácido acético	Glicose	Arabinose	HMF
Sem calagem	47,810	14,092	1,965	1,458	0,160
Com calagem*	37,399	9,884	1,810	0,950	0,119

O conteúdo de óleo microbiano de 24,42% obtido com a cepa *R. toruloides* cultivada em HHE extraído com razão S:L de 1:8 é baixo quando comparado com dados disponíveis na literatura, uma vez que conteúdos lipídicos em cerca de 67% já foram obtidos (LI; ZHAO; BAI, 2007). A razão para este baixo conteúdo lipídico, conforme já discutido, pode ter se dado em virtude da baixa concentração de xilose, 12,196 g/L, menos da metade do conteúdo de xilose reportado em trabalhos similares (BONTURI *et al.*, 2017b; MATSAKAS *et*

*al.*, 2017). Sendo assim, a próxima estratégia para aumentar as concentrações de biomassa e lipídio foi utilizar hidrolisado com maior concentração de xilose. Porém, a maior concentração de xilose resulta numa maior concentração de compostos secundários como furfural, HMF e ácido acético, que podem inibir o desenvolvimento de *R. toruloides*. Este efeito deletério foi verificado nas primeiras tentativas de cultivo utilizando o HHEc.

**Figura 4.4** - Cinética de cultivo de *R. toruloides* CCT7815 e consumo das fontes de carbono ao longo de 120 h de cultivo. Xilose (o), glicose (x), ácido acético (◇), arabinose (●) e HMF (△).



Como o hidrolisado teve pH inicial fixado em 5,0 após a calagem, valor apenas ligeiramente superior ao pKa do ácido acético (4,75), possivelmente o ácido acético em sua forma não dissociada pode ter difundido para dentro do citoplasma levando a uma queda no pH intracelular, o que veio a inibir o crescimento da levedura (VAN DER POL *et al.*, 2014).

O ajuste do pH do HHEc para 6,2 contornou este problema e observou-se desenvolvimento celular com produção lipídica. Teoricamente, a pH 5,0, 3,56 g/l de ácido

acético estavam na forma não dissociada e, a pH 6,2, a concentração de ácido acético não dissociada seria quase 10 vezes menor que os valores observados em pH 5,0. O efeito do ácido acético em cultivos com pH relativamente baixos também foram observados por Brandenburg *et al.* (2016). Estes autores identificaram que a presença do ácido acético na concentração de 3,8 g/l e pH 4,9 inibiu o desenvolvimento da levedura *L. starkeyi*. Entretanto, neste valor de pH e 2,11 g/l de ácido acético, os autores observaram crescimento da levedura. Em outro cultivo, estes autores verificaram crescimento de *L. starkeyi* mesmo na presença de ácido acético em 3,9 g/l a pH 6,0. Comparando estes relatos com o observado no cultivo com HHEc, podemos concluir que, quando na presença de ácidos orgânicos, o pH tem influência mais forte no desenvolvimento microbiano do que a concentração do ácido em si.

Durante o cultivo com HHEc não foi detectado consumo de arabinose pela *R. toruloides* CCT7815. Repressão catabólica possivelmente não é explicação para essa observação uma vez que glicose, xilose e ácido acético foram consumidos simultaneamente (Figura 4.4). O crescimento da levedura cessou assim que todo o ácido acético foi consumido; possivelmente o consumo de ácido acético, e consequente elevação no pH para 7,8, inibiu o desenvolvimento celular. Além disso, metabólitos formados durante o cultivo podem ter contribuído para redução na aptidão celular.

Mesmo com concentração de xilose relativamente alta no HHEc, o valor de biomassa seca de 6,0 g/L, foi muito próximo daqueles observados nos cultivos com HEE (6,54 g/L) (Tabela 4.7). Contudo, o conteúdo lipídico aumentou em torno de 100% nos cultivos com HHEc, alcançando 50% de lipídios em relação à biomassa seca. A maior concentração de ácido acético no HHEc possivelmente contribuiu para o maior conteúdo lipídico, uma vez que esta fonte de carbono é relacionada à produção e acúmulo lipídico. Quando comparado com glicose e xilose, o ácido acético é assimilado por uma via mais curta para ser utilizado para manutenção celular (ZHENG *et al.*, 2012). O acetato reage com a coenzima A para formação da acetil-CoA. Já a glicose é convertida em piruvato e somente após ação da enzima piruvato desidrogenase há a formação da acetil-CoA. Quando o sistema metabólico está sob limitação de nutriente (e.g., limitação de nitrogênio), o acetil-CoA em excesso é direcionado para síntese lipídica (ZHENG *et al.*, 2012).

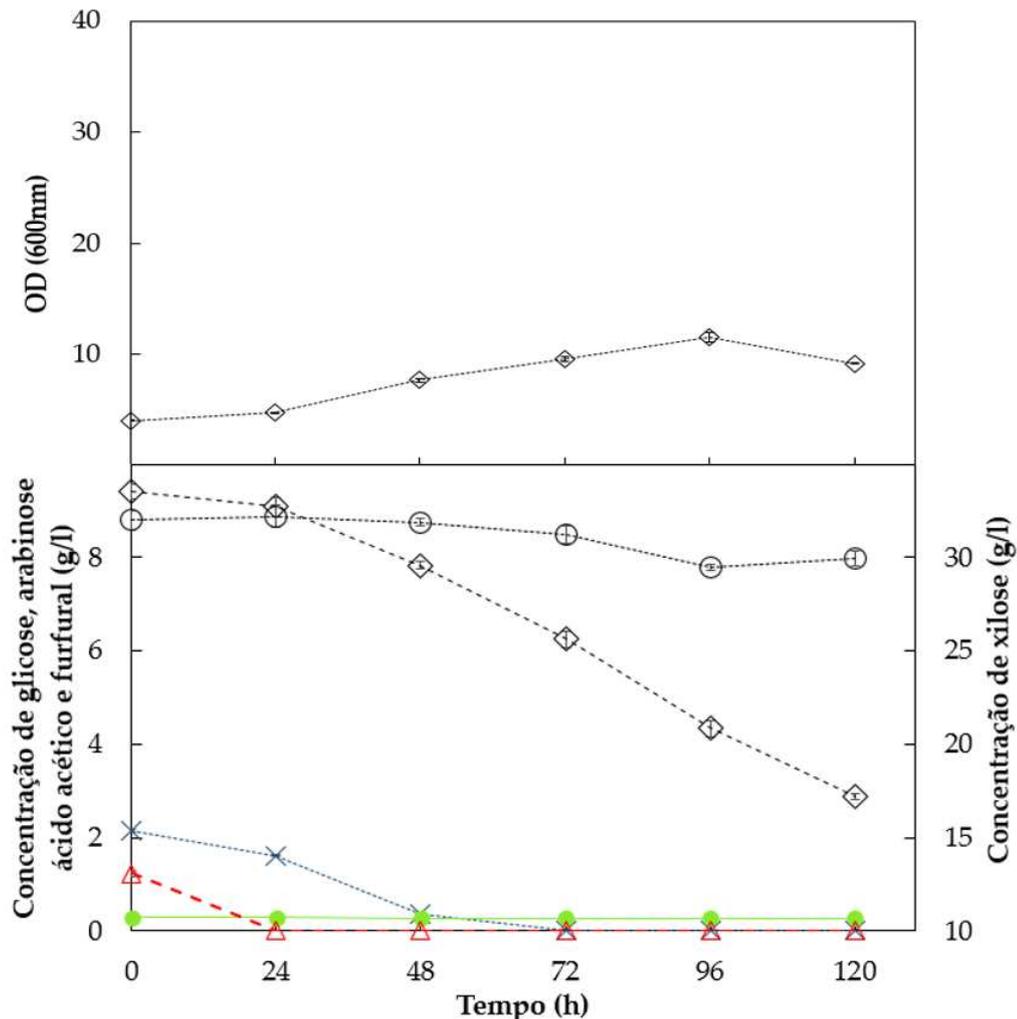
Terminada a ALE e selecionada a cepa Rth como a mais eficiente, cultivos com esta nova cepa foram desenvolvidos baseados nas informações/condições obtidas através dos estudos com a cepa CCT7815 (Tabela 4.7, Figura 4.5). Após 120 h de cultivo observa-se que os resultados de concentrações celular (2,6 g/l) e lipídica (1,7 g/l) foram baixos quando comparados com os obtidos com a cepa CCT7815, cultivada no mesmo hidrolisado (HHEc).

Entretanto, o conteúdo lipídico de 64,3 % não foi somente superior ao observado com a cepa CCT7815 e aos outros cultivos relatados nesta tese, mas também superior a todos os trabalhos focados na produção de óleo microbiano a partir de hidrolisado de biomassa lenhosa (BRANDENBURG *et al.*, 2016; LOPES; BONTURI; MIRANDA, 2020; MATSAKAS *et al.*, 2017; OSORIO-GONZÁLEZ *et al.*, 2019).

**Tabela 4.7** - Produção lipídica de cepas de *R. toruloides* em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto.

Cepa	Fonte de carbono	Biomassa (g/l)	Lipídios	
			(g/l)	(%)
CCT7815	HHE	6,5	1,4	22,2
	HHEc	6,0	3,0	50,0
Rth	HHEc	2,6	1,7	64,3

**Figura 4.5** - Cinética da cepa Rth e consumo das fontes de carbono ao longo de 120 h de cultivo. Concentrações de xilose (o), glicose (x), ácido acético (◇), arabinose (●) e furfural (△).



Possivelmente, a baixa conversão global das fontes de carbono contribuiu para os diminutos valores de biomassa e lipídios, visto que a xilose, principal composto do HHEc foi consumida em apenas 6,3% de sua concentração inicial. Já em relação ao maior conteúdo lipídico observado, faz-se aqui também necessário frisar que, o ácido acético pode favorecer a lipogênese, uma vez que é mais rapidamente convertido a acetil-CoA quando comparado com os açúcares constituintes do HHEc (ZHENG *et al.*, 2012). Além disso, infere-se que ao metabolizar ácido acético, a cepa Rth apresenta menor coeficiente de manutenção celular, vide o maior conteúdo lipídico.

O ácido acético não apresentou caráter inibitório ao desenvolvimento celular, uma vez que o mesmo foi assimilado já nas primeiras horas de cultivo amostradas e foi verificado desenvolvimento da Rth. Entretanto, possivelmente ocorreu intensa repressão catabólica do ácido acético em relação à xilose, uma vez que este açúcar não foi efetivamente metabolizado pela levedura. Comparando os dados deste cultivo com os apresentados no Capítulo 3 (Figura 3.6), pode-se inferir que, provavelmente, a concentração de ácido acético no hidrolisado faz com que a levedura assimile ou não a xilose. Os resultados obtidos para esta cepa quando cultivada em HHBCc (capítulo 3) demonstraram que a xilose só foi consumida após completo consumo da glicose e quase depleção do acético no meio. Já nos cultivos da Rth em HHEc revelaram que, mesmo após total consumo da glicose, a xilose não foi assimilada efetivamente, provavelmente em razão da maior concentração de ácido acético ainda presente no hidrolisado. Outro fato a se destacar neste cultivo foi a completa assimilação de furfural, um potencial inibidor que não fora consumido em nenhum outro cultivo com hidrolisado no presente trabalho.

No tocante ao cultivo com a cepa CCT7815, em que houve assimilação simultânea de xilose e ácido acético, observa-se que o ácido acético foi consumido mais rapidamente que a xilose, com taxas de consumo de 93,00 mg/(l·h) e 79,00 mg/(l·h), respectivamente (Figura 4.4). O consumo de ácido acético pela *R. toruloides* CCT7815 e Rth é uma característica importante, pois esta fonte de carbono é comumente presente em hidrolisados hemicelulósicos e muitas vezes até tratado como inibidor, requerendo métodos secundários de tratamento. Estudos atuais testaram o uso do ácido acético gerado durante tratamento anaeróbico de água residuária como substrato para leveduras oleaginosas (LOPES; RAMOS; SILVA, 2017; VEERAMALINI *et al.*, 2019). Seguindo esta estratégia, o ácido acético pode se tornar uma fonte de carbono potencial na produção lipídica, pois o tratamento de águas residuárias está largamente empregado em muitas indústrias (HUANG, XIANG-FENG *et al.*, 2016).

Brandenburg *et al.* (2016) verificaram a estratégia de batelada alimentada (pH-stat) durante o cultivo de *R. toruloides* usando hidrolisado hemicelulósico de bétula e reportaram biomassa de 15,63 g/l e 51,3% de conteúdo lipídico com 168 h de cultivo. Estes autores utilizaram hidrolisado com concentração de xilose similar à presente no HHEc e alcançaram concentrações celular e lipídicas superiores, mas inferiores no quesito conteúdo lipídico quando comparado com os valores obtidos com a Rth. As maiores concentrações de biomassa e lipídios possivelmente ocorreram em função do cultivo em batelada alimentada, modo de cultivo conhecido por propiciar maiores concentrações de biomassa (LOPES *et al.*, 2020; QIAN *et al.*, 2020). Somado a isto, neste modo de cultivo é possível o controle de variáveis como pH, aeração, redução da concentração dos metabólitos formados e concentração de fonte de carbono durante o cultivo, diferentemente dos cultivos em frascos. Matsakas *et al.* (2017) relataram biomassa de 7,1 g/l e produção lipídica de 2,9 g/l (conteúdo lipídico de 39%) em cultivo de *R. toruloides* utilizando hidrolisado hemicelulósico de *Betula pendula* como substrato em biorreator de tanque agitado, produção e conteúdo lipídico inferiores aos observados no presente trabalho. Além disso, Matsakas *et al.* (2017) aplicaram tratamentos secundários no hidrolisado pela ação de *Bacillus sp.* para remoção de ácido acético e tratamento com carvão ativado para remoção de furfural e fenóis, tratamentos estes não empregados no presente trabalho.

#### 4.5. Conclusão

As cepas adaptadas de *R. toruloides* foram capazes de crescer e produzir óleo microbiano quando cultivadas em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto sem pré-tratamentos secundários (apenas calagem), mostrando que este hidrolisado tem potencial para ser fonte de matéria prima de baixo custo para a cadeia de produção de biodiesel. Verificou-se também, que o pH do meio pode definir se o ácido acético será assimilado como inibidor ou fonte de carbono. Cultivos com pH acima do pKa do ácido acético impedem o efeito inibitório deste ácido e permitem que ele seja consumido pela levedura e contribua efetivamente para maiores acúmulos lipídicos. A cepa Rth alcançou o maior conteúdo lipídico reportado até o momento no tocante a leveduras oleaginosas cultivadas em hidrolisados hemicelulósicos de eucalipto.

## 5. CEPAS DE *R. toruloides* CULTIVADAS EM MODOS BATELADA E CONTÍNUO

### 5.1. Introdução

Sabendo-se que o conteúdo lipídico das células pode ser influenciado por diversos fatores, como origem da cepa oleaginosa, fonte de carbono, razão C/N, composição do meio e condições de cultivo, torna-se importante identificar a melhor condição para síntese lipídica (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2011).

Durante os cultivos em batelada, os microrganismos mudam constantemente seu estado fisiológico em resposta às alterações nas condições do ambiente externo (SHEN *et al.*, 2013). Tais mudanças podem ocorrer devido à escassez de nutrientes, acúmulo de compostos tóxicos e mudanças no balanço iônico em função de variações do pH. Todos estes fenômenos são conhecidos pelo potencial em inibir o crescimento microbiano (MONOD, 1949). Como exemplo tem-se o trabalho de caracterização fisiológica de *R. toruloides* em cultivo com glicerol realizado por Azambuja *et al.* (2018): estes autores observaram que o aumento de pH de 6,0 para 7,3 limitou o crescimento da levedura mesmo antes da exaustão da fonte de carbono.

Uma caracterização minuciosa da fisiologia do acúmulo lipídico é importante como conhecimento básico do microrganismo e é crucial para o aumento de escala do processo de obtenção de lipídios microbianos e produção oleoquímica. Uma vez que, para se adquirir dados precisos o modo de cultivo contínuo pode ser o mais adequado, pois oferecer melhor controle das variáveis que compõem o ambiente de desenvolvimento do microrganismo (SHEN *et al.*, 2017).

Apenas um pequeno número de estudos abordaram o tema de cultivo contínuo para caracterizar leveduras oleaginosas (ANSCHAU *et al.*, 2014; BÉLIGON *et al.*, 2016; KERKHOVEN *et al.*, 2016) e este número é ainda menor quando se trata da *R. toruloides* (SHEN *et al.*, 2013, 2017). Sendo assim, o estudo de cultivo de *R. toruloides* em substratos relacionados ao conceito de biorrefinaria torna-se importante para se identificar aspectos relevantes na procura de condições ótimas de cultivo e produção lipídica.

Com base no externado, este capítulo apresenta os resultados dos cultivos da levedura *R. toruloides* CCT0783 em modo contínuo utilizando diferentes fontes de carbono e razões C:N. Para este estudo, ácido acético, glicerol e xilose foram escolhidos como fontes de carbono, uma vez que a hemicelulose, fração abundante na biomassa vegetal tem como compostos formados após hidrólise moléculas de xilose e ácido acético em concentrações relativamente elevadas (CHANDEL; SILVÉRIO; SINGH, 2013). Já o glicerol é o principal subproduto na produção de biodiesel, gerado na proporção mássica glicerol:biodiesel de 1:10 (PAPANIKOLAOU *et al.*, 2008). Assim, o uso destes substratos escolhidos pode ser integrado à biorrefinaria e promover uma economia circular.

Compõe também este capítulo, o primeiro estudo de cultivo da cepa Rth em biorreator de tanque agitado utilizando hidrolisado hemicelulósico de bagaço da cana de açúcar como fonte de carbono. Este estudo, ainda fundamental, visou avaliar a produção celular e lipídica em um sistema com maior controle de parâmetros de cultivo. Além disso, este cultivo será a base para estudos futuros em que a Rth será cultivada em biorreatores de tanque agitado.

## **5.2. Materiais e métodos**

### **5.2.1. Cepa e inóculo**

As células de *R. toruloides* CCT0783 – adquiridas da Coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello (Campinas, São Paulo, Brasil) – e de Rth utilizadas neste estudo, foram mantidas a -80 °C em solução de glicerol 10% (v/v). A reativação de cada cepa foi feita em tubos tipo *Falcon* contendo 10 ml de meio YPD e 1 ml de células durante 24 h a 200 rpm e 28 °C. Então, as células reativadas foram transferidas para frascos tipo Erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml de meio YPD. Estes frascos foram incubados por 24 h a 28 °C e 200 rpm. Após este período de incubação, as células foram coletadas por centrifugação e ressuspensas em solução de NaCl 0,9% (m/v) para uma OD (absorbância a 600 nm) de 20.

### **5.2.2. Biorreatores**

O reator utilizado para os experimentos em modo contínuo e batelada alimentada foi um MiniBio 1000<sup>TM</sup> com volume de trabalho de 1,0 l (Applikon Biotechnology, Delft, Holanda) equipado com controle de temperatura, sensor de oxigênio dissolvido e monitor de biomassa modelo BugLab BE3000 (Bug Lab, Concord, EUA) e monitor de liberação de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>

(BlueInOne, BlueSens, Herten, Alemanha). Os dados foram coletados e processados com auxílio da *software* BioXpert V2 versão 2.95 (Applikon Biotechnology, Delft, Holanda).

Para o cultivo em batelada da cepa Rth foi utilizado o biorreator Bio-Tec-1 com volume útil de 1,0 l (Tecnal, Piracicaba, Brasil) equipado com controles de temperatura, pH e oxigênio. O *software* de controle e aquisição de dados utilizado foi o Bio-Tec-Ihm (Tecnal, Piracicaba, Brasil).

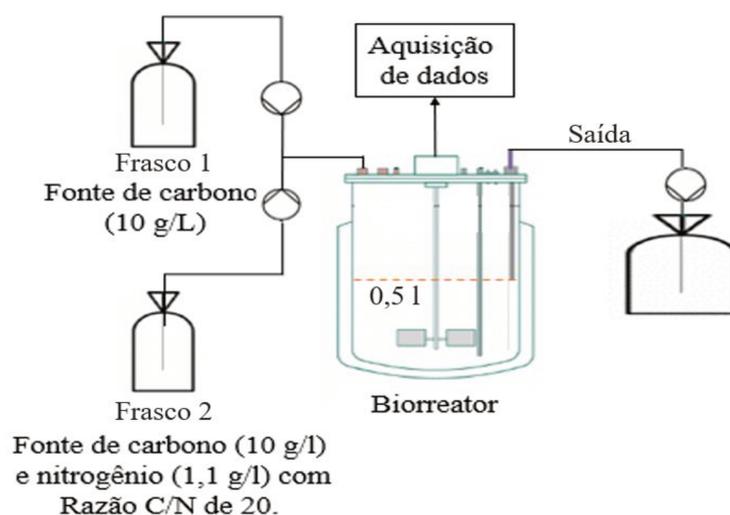
### 5.2.3. Cultivos em turbidostato

Os cultivos em turbidostato foram executados com meio basal composto por (g/l):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3,0;  $\text{MgSO}_4$ , 0,5; 1 ml de solução traços e 1 ml de solução de vitaminas (LAHTVEE *et al.*, 2017). O meio basal foi suplementado com uma fonte de nitrogênio (sulfato de amônio) e a fonte de carbono em estudo – ácido acético, glicerol ou xilose – separadamente. Para a fase inicial em batelada, 10 g de carbono e 5 g de nitrogênio foram adicionados por litro do meio basal, resultando em razão molar C/N de 4,5. Os cultivos foram e inoculados com 10% (v/v) de células. Na fase de cultivo contínuo, duas fontes de nutrientes foram preparadas em frascos distintos. O primeiro frasco (frasco 1) continha meio basal suplementado com 10 g/l de fonte de carbono (ácido acético, glicerol ou xilose) e 1,1 g/l de fonte de nitrogênio. O segundo frasco (frasco 2) continha meio basal suplementado com a mesma concentração de fonte de carbono (10 g/l), mas sem adição de nitrogênio (Figura 5.1). Esta configuração permitiu a mudança das razões C/N apenas ajustando-se à razão de alimentação das bombas dos frascos 1 e 2 enquanto a concentração de carbono no meio se mantinha constante nas linhas de alimentação do reator. O reator passou a operar em modo contínuo após a cultura alcançar densidade óptica desejada. Amostras foram coletadas apenas quando o sistema em condição específica (substrato e razão C/N) atingia o estado estacionário, ou seja, quando parâmetros como consumo de oxigênio, liberação de  $\text{CO}_2$  e densidade óptica se mantinham constantes por no mínimo três tempos de residência. O pH da cultura foi mantido em 6,0 com auxílio de soluções de KOH 2,0 mol/l e a temperatura em 30 °C. Todos os cultivos foram mantidos em condições aeróbias com a manutenção da  $p\text{O}_2$  acima de 30%.

### 5.2.4. Cultivo em batelada

Assim como o hidrolisado utilizado na adaptação, o hidrolisado hemicelulósico de bagaço da cana de açúcar (HHBCb) utilizado neste estudo também foi gentilmente doado, pelo Dr. Sílvio Silvério da Silva (Laboratório de Bioprocessos e Produtos Sustentáveis, LBios,

**Figura 5.1** - Representação do esquema montado para cultivo contínuo de *R. toruloides* com diferentes fontes de carbono.



Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Brasil). Como o HHBCb, foi doado em sua forma já concentrada, o material sofreu apenas ajuste de pH (6,0) utilizando NaOH e esterilização, com filtro de poro 0,22  $\mu\text{m}$  marca JetBiofil (Guangzhou Jet Bio-Filtration, Guangzhou, China). Após calagem o HHBCb teve a seguinte composição parcial (g/l): xilose, 65,45; ácido acético, 4,62; glicose, 4,56 e arabinose, 0,64.

O volume reacional total foi de 700 ml, sendo 88% deste total constituído de HHBCb estéril, 2% de solução de micronutrientes (MEESTERS; HUIJBERTS; EGGINK, 1996), 10% de inóculo. Para estabilização do pH em 6,0 durante o cultivo, utilizou-se soluções de HCl 3,0 mol/l e NaOH 2,5 mol/l alimentadas separadamente por bombas peristálticas. Um frasco com solução estéril de antiespumante 20% (v/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foi conectado ao reator para o caso do sistema de controle detectasse altos níveis de espuma.

O reator foi mantido com agitação constante em 500 rpm, temperatura a 28 °C e aeração a 1,0 vvm por 144 h. Fez-se a quantificação da concentração celular e produção lipídica somente ao final do cultivo, sendo assim, não houve amostragem para análises de concentrações celular e lipídica antes de 144 h.

### 5.2.5. Métodos analíticos

Para ambos os cultivos em biorreator de tanque agitado a quantificação de biomassa foi feita gravimetricamente, enquanto as quantificações de lipídios foram feitas em triplicata, seguindo a metodologia proposta por Folch; Lees; Stanley (1957), utilizando solução de clorofórmio e metanol na razão 2:1 (v/v). Os lipídios extraídos das células cultivadas em

turbidostato foram recuperados utilizando evaporador rotativo modelo R-200 (Buchi, Flawil, Alemanha); já para as células cultivadas em batelada, utilizou-se evaporador rotativo modelo TE-211 (Tecnal, Piracicaba, Brasil).

#### **5.2.6. Métodos analíticos para os estudos em modo turbidostato**

O crescimento celular foi monitorado por sensor óptico imersível (absorbância a 1300 nm) e a biomassa foi quantificada por gravimetria. Concentrações de xilose, xilitol, piruvato, ácido acético e glicerol foram quantificadas por HPLC (equipamento Prominex Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com detector refrativo RID-10A (Shimadzu, Kyoto, Japão). A coluna utilizada foi uma HPX-87H (Biorad, Hercules, EUA) a temperatura de 45 °C e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5,0 mmol a 0,6 ml/min como fase móvel.

A extração de carotenoides foi feita seguindo metodologia proposta por Lee *et al.* (2014). A quantificação e caracterização dos carotenoides foi feita em HPLC modelo Dionex Ultimate 3000 (ThermoFisher, Massachusetts, EUA) com detector de arranjo de diodo modelo DAD 3000 e coluna Acclaim 120 C18 (ThermoFisher, Massachusetts, EUA) a 40 °C, utilizando-se uma mistura de acetona e água como fase móvel nas seguintes proporções acetona:água (% v/v): 80:20 de 0-5 min (curva ascendente), 100:0 de 5-10 min (platô) e 80:20 10-11 (curva descendente) (WEBER; ANKE; DAVOLI, 2007).

#### **5.2.7. Métodos analítico para o estudo em modo Batelada**

As quantificações parciais dos compostos presentes no hidrolisado ao longo do cultivo foram feitas por HPLC (equipamento Dionex Ultimate 3000, ThermoScientific, Sunnyvale, EUA) equipado com coluna HPX-87H (Biorad, Hercules, EUA) operando a 50 °C, utilizando solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mmol/l como fase móvel a vazão de 0,6 ml/min. Cada amostra em triplicata retirada no intervalo de 24 h foi analisada por esta técnica. A densidade ótica, também monitorada a cada 24 horas, foi mensurada em espectrofotômetro modelo UV-1900 (Shimadzu Corp., Kyoto, Japão).

#### **5.2.8. Equações utilizadas para cálculos de conversões e produtividade em modo turbidostato**

Os fatores de conversão de substrato em células ( $Y_{xs}$ ) e em lipídios ( $Y_{LS}$ ), produtividade celular ( $q_x$ ), taxa de consumo de substrato ( $q_{subs}$ ) e produtividade específica de lipídios ( $r_{lip}$ ) foram calculadas conforme as equações 5.1 a 5.5:

$$Y_{xs} = \frac{s}{x} \left( \frac{g}{g} \right) \quad (5.1)$$

$$Y_{ls} = \frac{s}{l} \left( \frac{g}{g} \right) \quad (5.2)$$

$$q_x = x * \frac{1}{D} \left( \frac{g}{l * h} \right) \quad (5.3)$$

$$-q_{subs} = s * \frac{1}{D} \left( \frac{g}{l * h} \right) \quad (5.4)$$

$$r_{lip} = \frac{l}{x} * \frac{1}{D} \left( \frac{g}{g * h} \right) \quad (5.5)$$

onde s (g/l) é a concentração de substrato consumido, x (g/l) é a concentração celular, l (g/l) é a concentração lipídica. D (1/h) é o fator de diluição aplicado no momento em que o sistema se encontrava estável.

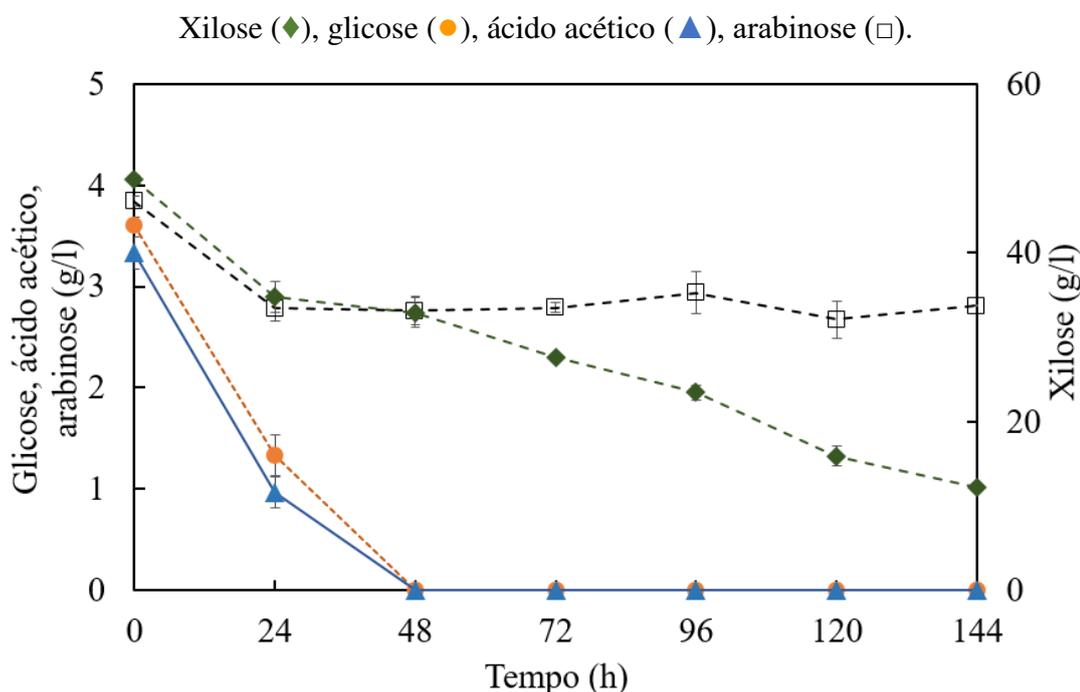
### 5.3. Resultados e discussão

#### 5.4. Cultivo em modo batelada da cepa Rth em HHBCb

O cultivo em modo batelada permitiu obter perfis de consumo das fontes de carbono presentes no hidrolisado e quantificar as produções celulares e lipídicas. Durante as primeiras 24 h de cultivo observou-se constante aumento no valor de pH, o que acarretou em elevada adição de ácido e base para manter o sistema dentro da faixa de pH desejada  $6,0 \pm 0,10$  (Figura 5.2). Isto era de certa forma esperado, pois, segundo Fei *et al.* (2016), dependendo da espécie de levedura oleaginosa, quando cultivada em hidrolisados hemicelulósicos, é provável que ocorra considerável elevação nos valores de pH durante o cultivo em virtude do consumo de ácido acético presente no meio.

Devido à constante alteração no valor de pH observada no início do cultivo e a elevada adição de ácido e base para estabilização do pH, aproximadamente 300 ml de soluções de ácido e base foram adicionados ao reator, o que causou considerável decréscimo nas concentrações dos substratos em 24 h de cultivo. Ciente da possibilidade do pH continuar subindo ao longo do cultivo, decidiu-se substituir a solução de ácido por hidrolisado *in natura* estéril, que possui pH altamente ácido (<1) em virtude da hidrólise ácida aplicada. Desta maneira, a adição de hidrolisado *in natura* para redução do pH contribuiria para menor diluição do meio, uma vez que seria adicionado mais nutrientes ao meio de cultivo concomitante à estabilização do pH. Esta estratégia de controle de pH com hidrolisado também foi utilizado por Brandenburg *et al.* (2016) e denominaram o modo de cultivo como “pH-stat”.

**Figura 5.2** - Cinética de consumo dos substratos presentes no HHBCb pela cepa Rth.



Ao final da fermentação, apenas 5,0 ml de hidrolisado *in natura* foram adicionados ao sistema, e em virtude das amostragens diárias ( $\pm 20$ ml), não houve acúmulo volumétrico no sistema após a mudança na configuração do reator, descartando-se então, a hipótese do cultivo ter sido realizado em modo batelada-alimentada.

Após 144 h de cultivo, verificou-se a concentração celular em 6,30 g/l e conteúdo lipídico de 58,2%, valores estes, superiores aos observados por Bonturi *et al.* (2017), após cultivo da cepa *R. toruloides* CCT7815 em biorreator de tanque agitado contendo hidrolisado hemicelulósico de bagaço e glicerol. Estes autores verificaram produção celular similar às alcançadas com a Rth (6,6 g/l) e conteúdo lipídico de 55% após 96 h de cultivo. Percebe-se que, mesmo cultivando a Rth em meio contendo apenas hidrolisado, sem suplementação de qualquer outra fonte de carbono, foi possível se obter resultados superiores aos de Bonturi *et al.* (2017).

Há ainda, trabalhos com *R. toruloides* em modo batelada que apresentaram resultados superiores aos relatados aqui para a Rth cultivada em modo batelada, como o trabalho de Fei *et al.* (2016) em que os autores verificaram concentração celular e conteúdo lipídico de 36,2 g/l e 58,7% respectivamente. Entretanto, estes autores utilizaram hidrolisado de palha de milho na concentração de açúcares de 110 g/l contendo majoritariamente glicose (95% em massa), um açúcar convencional facilmente assimilável pelo microrganismo. Além disso, a assimilação de glicose não é o foco do presente trabalho, uma vez que visamos a

assimilação de açúcares e outras fontes de carbono não convencionais pela levedura *R. toruloides* para produção de lipídios.

Wiebe *et al.* (2012) também cultivaram *R. toruloides* em modo batelada, porém utilizaram meio sintético misto composto por glicose, xilose e arabinose como fontes de carbono e observaram produção lipídica inferior – 5-6 g/l de biomassa e conteúdo lipídico de apenas 30% – à observada com a cepa Rth cultivada em HHBCb. Wiebe *et al.* (2012) observaram cinética de consumo dos açúcares análoga à verificada no cultivo da Rth, em que a assimilação da glicose foi favorecida em relação aos outros açúcares e, assim como a Rth, o consumo de xilose só se torna expressivo após depleção da glicose no meio.

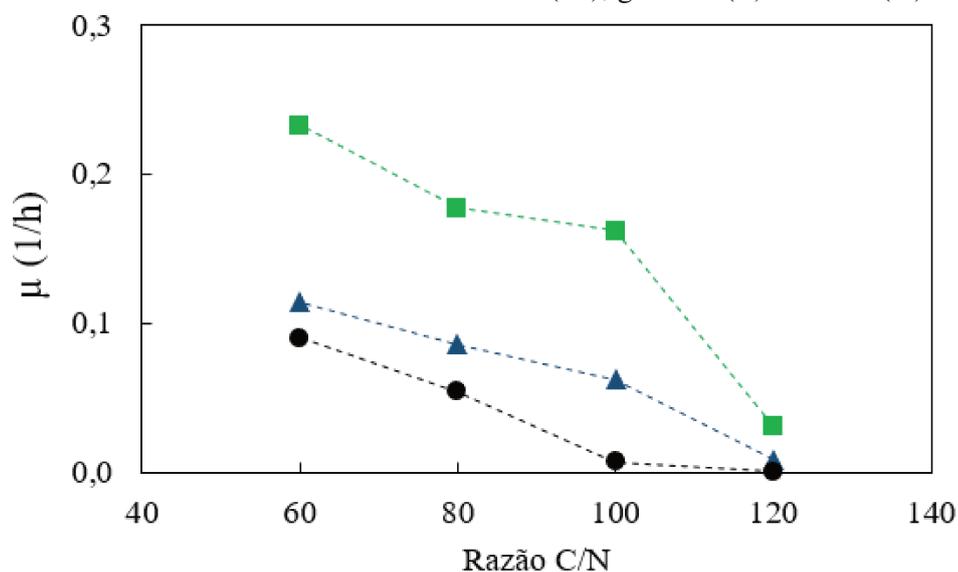
Ainda em relação ao consumo dos substratos pela Rth, percebe-se que, diferente dos cultivos com HHEc (Capítulo 4, Figura 4.5) e similar aos com HHBCc (Capítulo 3, Figura 3.13) houve assimilação efetiva de ácido acético e xilose durante o cultivo, o que leva a inferir que a provável repressão do consumo de xilose pelo ácido acético não é devido a presença do ácido e sim devido aos seis níveis de concentração, pois somente em concentrações de ácido acético abaixo de 1 g/l os mecanismos de assimilação da pentose passam a ser efetivos.

Apesar dos valores de conteúdo lipídicos serem relativamente elevados, a concentração celular foi baixa. Acredita-se que os valores biomassa e lipídios poderiam ser maiores, caso o reator tivesse o pH controlado apenas com hidrolisado *in natura* desde o início, pois isto evitaria diluição do meio de cultivo em função da adição de ácido e base no interior do reator.

#### **5.4.1. Cultivos em modo turbidostado**

Os cultivos em turbidostato foram realizados visando-se avaliar com menor interferência dos efeitos isolados de substratos e as diferentes razões C/N na produção lipídica. O estado estacionário foi alcançado e mantido em todos os cultivos com taxa de diluição (D) equivalente à taxa específica de crescimento microbiano ( $\mu$ ) da levedura sob as condições ambientais impostas. O  $\mu$  foi controlado pela vazão de alimentação do meio, ajustava-se a vazão de alimentação em razão de um valor de medida de densidade óptica pré-estabelecido, feita *on line* durante todos os cultivos. Para todos os cultivos, o aumento da razão C/N acarretou numa menor taxa de crescimento (Figura 5.3), mas com aumento dos rendimentos lipídicos (conteúdo lipídico).

**Figura 5.3** – Taxa de crescimento ( $\mu$ ) dos cultivos contínuos de *R. toruloides* sob diferentes razões C/N e substratos: ácido acético ( $\blacktriangle$ ), glicerol ( $\blacksquare$ ) e xilose ( $\bullet$ ).



#### 5.4.2. Cultivo de *R. toruloides* com ácido acético como fonte de carbono

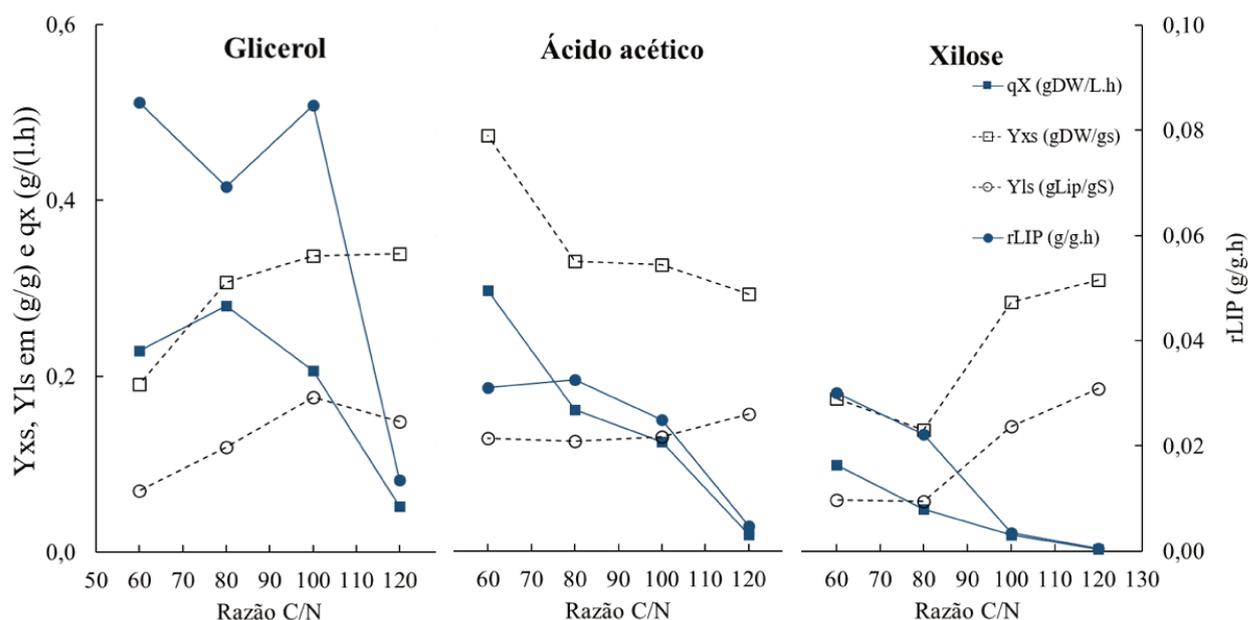
De maneira geral, razões C/N mais elevadas favoreceram a síntese lipídica, enquanto razões C/N mais baixas proporcionaram melhores resultados ligados à produção de biomassa e proteínas. Como os cultivos com razões C/N mais baixas tinham maior concentração de nitrogênio era de se esperar que a produção de biomassa e proteínas fossem favorecidas, uma vez que o N é um dos principais constituintes tanto de biomassa quanto de proteínas.

Nos estudos com ácido acético como fonte de carbono, a maior taxa de crescimento específico (0,114 1/h) foi verificada em razão C/N de 60 (Figura 5.3). Nesta mesma razão C/N, observou-se o maior rendimento de biomassa em relação ao substrato consumido ( $Y_{xs}$ ) (0,473 g/g), mesma razão C/N em que a máxima taxa de crescimento foi observada (Tabela 5.1, Figura 5.4), o que também acarretou em maior taxa de consumo de substrato (0,627 g/(l·h)). No cultivo com ácido acético o maior conteúdo lipídico foi observado com a razão C/N de 120 (53,4%). Em relação a produtividade específica de lipídios (r<sub>lip</sub>), o melhor resultado foi observado com a razão C/N de 80 (0,033 g/g·h). Ao contrário dos outros estudos em modo contínuo, o rendimento de biomassa aumentou em virtude do aumento da taxa específica de crescimento e diminuiu em virtude da redução da razão C/N.

**Tabela 5.1** – Condições de cultivo, dados cinético de consumo e de produtividades para cultivos contínuos de microrganismos oleaginosos.

<i>Substrato</i>	<i>Cepa</i>	<b>Razão C/N</b>	<b>D (1/h)</b>	<b>Lipídios (%)</b>	<b>Y x/s (g/g)</b>	<b>Y l/s</b>	<b>qx (g/(l·h))</b>	<b>qsubs (g/(l·h))</b>	<b>rlip (g/(g·h))</b>	<b>CO<sub>2</sub> mmol</b>	<b>Referência</b>
Ácido acético		120	0,009	53,40	0,293	0,156	0,019	0,064	0,005	0,258	
		100	0,062	39,96	0,326	0,130	0,124	0,380	0,025	4,243	
		80	0,086	37,80	0,330	0,125	0,161	0,488	0,033	5,749	
		60	0,114	27,16	0,473	0,128	0,296	0,627	0,031	5,120	
Glicerol	<i>R. toruloides</i> CCT0783	120	0,031	43,92	0,339	0,149	0,052	0,153	0,014	0,808	Este trabalho
		100	0,162	52,33	0,337	0,176	0,206	0,613	0,085	2,312	
		80	0,178	39,02	0,307	0,120	0,280	0,911	0,069	1,869	
		60	0,240	36,60	0,191	0,070	0,229	1,199	0,085	3,000	
Xilose		120	0,001	60,00	0,309	0,186	0,002	0,008	0,001	0,103	
		100	0,007	50,00	0,284	0,142	0,019	0,067	0,004	0,615	
		80	0,054	41,23	0,139	0,057	0,048	0,348	0,022	2,488	
		60	0,090	33,42	0,174	0,058	0,098	0,566	0,030	3,088	
Glicerol	<i>Y. lipolytica</i> LGAM S(7)1		0,030	43,21	0,202	0,087	0,243	1,203	0,013	-	Papanikolaou e Aggelis (2002)
			0,040	42,25	0,228	0,096	0,284	1,244	0,017	-	
		-	0,080	22,44	0,244	0,055	0,392	1,608	0,018	-	
			0,085	10,00	0,225	0,022	0,340	1,513	0,009	-	
			0,130	7,89	0,253	0,020	0,494	1,950	0,010	-	
Ácido acético	<i>C. curvatus</i> ATCC 20509	10	0,040	16,00	0,390	0,050	-	0,801	0,005	-	Bélligon <i>et al.</i> (2016)
		50	0,040	52,99	0,270	0,130	-	2,550	0,021	-	
Glicose	<i>R. toruloides</i> AS 2.1389	61.6	0,020	61,80	-	-	0,173	0,560	0,012	-	Shen <i>et al.</i> (2013)
		38	0,040	53,10	-	-	0,229	0,688	0,021	-	

**Figura 5.4** - Rendimentos de biomassa ( $Y_{xs}$ ) e lipídios ( $Y_{ls}$ ) por substrato consumido, produtividade de biomassa ( $q_x$ ) e produtividade específica de lipídios ( $r_{lip}$ ) para cepa CCT0783.

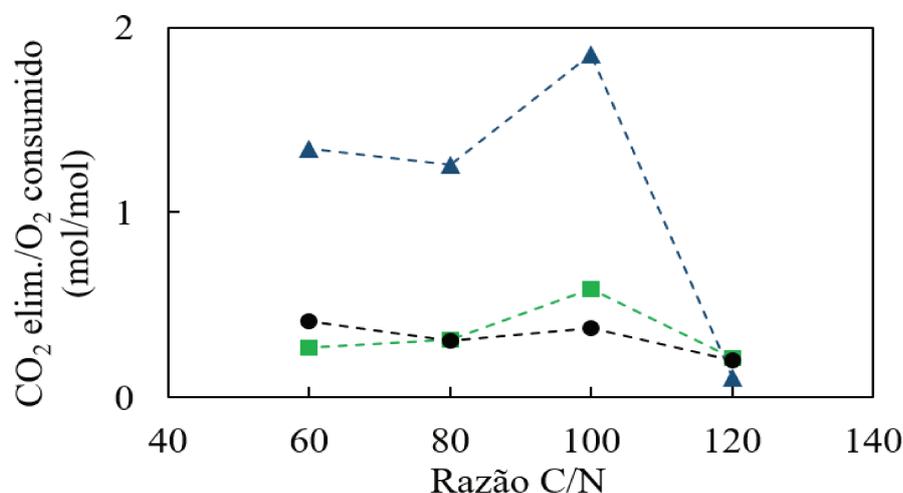


#### 5.4.1. Cultivo de *R. toruloides* com glicerol como fonte de carbono

Nestes cultivos com glicerol, o balanço de carbono baseando-se na biomassa e  $CO_2$  produzido contabilizou entre 36 e 78% do glicerol consumido. Isto indica que provavelmente a levedura excretou produtos que não foram identificados pelas análises de metabólitos solúveis em HPLC. Os valores do coeficiente respiratório (RQ) mensurados, calculados como a razão entre  $CO_2$  produzido por oxigênio consumido pelas células, foram baixos; tal fato ocorreu devido à taxa de consumo de oxigênio ter excedido a taxa de produção de  $CO_2$  de 1,5 a 5 vezes (Figura 5.5). Teoricamente, um RQ de 0,9 seria esperado para o cultivo da levedura *S. cerevisiae* cultivada em glicerol (OCHOA-ESTOPIER *et al.*, 2011), enquanto neste trabalho os valores variaram de 0,2 a 0,6 para os cultivos neste mesmo substrato.

Dentre as três fontes de carbono utilizadas neste estudo, o glicerol proporcionou a maior taxa de crescimento específico (0,240 1/h) com a razão C/N de 60 (Figura 5.3). Diferente do cultivo com ácido acético, o rendimento de biomassa em termos de substrato aumentou com elevação da razão C/N (menor  $\mu$ ) de 0,190 para 0,34 g/g (Figura 5.4). Entretanto, o conteúdo lipídico não foi alto quando comparado com os valores obtidos com os outros substratos em virtude da alta taxa de crescimento celular em glicerol (Tabela 5.2). Por outro lado, a taxa de produção específica de lipídios foi a maior observada entre todos os cultivos em turbidato. A

**Figura 5.5** - Coeficiente respiratório dos cultivos de *R. toruloides* cultivadas em turbidostado aplicando diferentes substratos e razões C/N. Ácido acético (▲), glicerol (■) e xilose (●).



máxima rlip deste estudo em turbidostato foi de 0,085 g/(g·h), observada com as razões C/N de 60 e 100, enquanto o maior rendimento de lipídios em relação aos substratos consumidos ( $Y_{l/s}$ ) foi alcançado com as razão C/N de 100 (Figura 5.4). Os valores de rlip em todas as C/N estudadas foram mais de duas vezes superiores aos rlip observados nos cultivos com ácido acético e xilose.

#### 5.4.2. Cultivo de *R. toruloides* com xilose como fonte de carbono

Dentre todas as fontes de carbono para o cultivo de *R. toruloides* CCT0785, alcançou-se o maior conteúdo lipídico (60%) com xilose em razão C/N de 120 (Tabela 5.2). Por outro lado, as rlip verificadas para os cultivos com xilose foram os mais baixos. Estes baixos valores ocorreram principalmente devido os relativos baixos valores de  $Y_{x/s}$  e taxas de crescimento específicos em todas as razões C/N estudadas (Figuras 5.3 e 5.4). Como a biomassa obtida dos cultivos com xilose apresentaram expressiva coloração quando comparada com os outros estudos (Figura 5.6), estas amostras foram selecionadas para identificação e quantificação dos carotenoides (Figura 5.7 e 5.8).

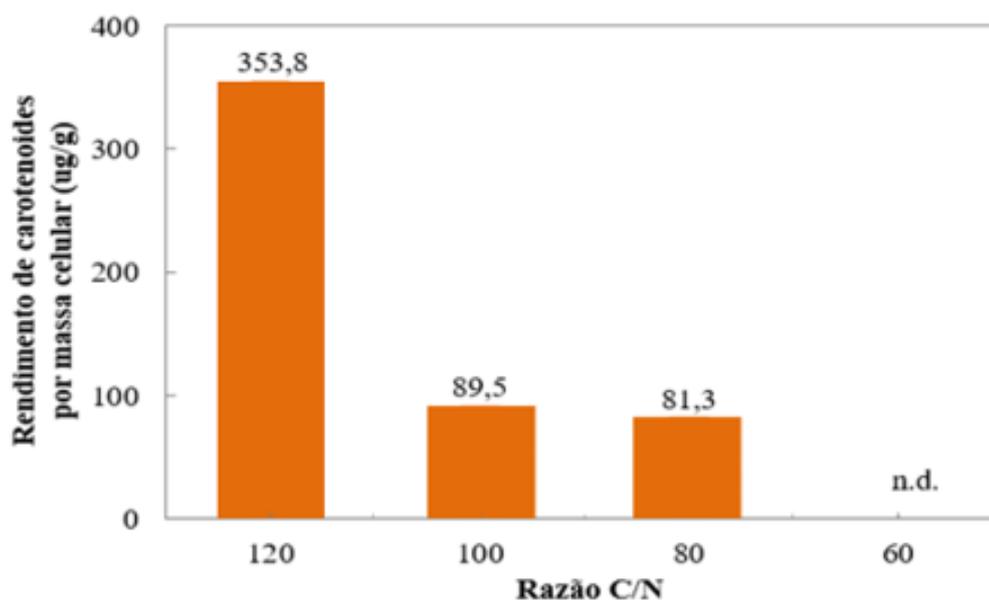
De maneira geral, os cultivos com C/N mais elevadas apresentaram coloração mais acentuada. Verificou-se que o aumento na razão C/N favoreceu a produção de carotenoides totais (Figura 5.7), alcançando a máxima produção específica de 353,8 ug/g em razão C/N de 120. Além disso, verificou-se diferença no perfil de carotenoides produzidos através da mudança na razão C/N. A proporção de  $\beta$ -caroteno:torularodina:toruleno mudou de 0,48:0,40:0,11 sob razão C/N de 80 para 0,17:0,34:0,32 sob razão C/N de 120 (Figura 5.8).

**Figura 5.6** - Amostras liofilizadas dos cultivos contínuos de *R. toruloides* sob razão C/N de 100 com diferentes substratos.



Fonte: O autor.

**Figura 5.7** - Rendimento de carotenoides para o cultivo em turbidostato de *R. toruloides* alimentado com xilose.



**Figura 5.8** - Distribuição dos carotenoides produzidos por *R. toruloides* durante cultivo em modo turbidostato sob diferentes razões C/N e xilose como substrato.



De modo geral, altas razões C/N resultaram em maiores conteúdos lipídicos e reduzidas taxas máximas de crescimento. Entretanto, esta relação parece ser comum em cultivos contínuos de microrganismos oleaginosos, pois diversos autores relatam o mesmo fenômeno observado neste trabalho (BÉLIGON *et al.*, 2016; PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2002; SHEN *et al.*, 2013).

#### **5.4.3. Discussão geral dos resultados obtidos com o cultivo de *R. toruloides* em turbidostato**

Aspectos como produtividade e taxas de produção específica devem ser consideradas no processo de desenvolvimento de tecnologias visando produção de lipídio microbiano para cadeia de produção do biodiesel. Em termos de produtividade específica de lipídios, a melhor taxa de produção neste trabalho (0,085 g/(g·h)) foi verificada quando glicerol foi utilizado como substrato com razão C/N de 100. Este valor de  $r_{lip}$  não é apenas o maior observado para cultivos contínuos em que o glicerol foi utilizado como fonte de carbono (Tabela 5.2), mas também é o maior relatado na literatura no tocante a cultivo contínuo de leveduras oleaginosas. A produção específica de lipídios obtido com ácido acético como substrato sob razão C/N de 80 foi mais de 35% superior ao verificado por Bélignon *et al.* (2016) (0,021 g/(g·h)) em cultivo contínuo de *Cryptococcus curvatus* alimentado com ácido acético sob razão C/N de 50.

A assimilação e conversão dos substratos é um aspecto importante economicamente uma vez que, mesmo sendo co-produtos agroindustriais, estes substratos terão custo de obtenção intrínseco. O glicerol tem o maior rendimento teórico em termos de produção lipídica, 69%. Contudo, apenas 25% do máximo teórico foi observado no cultivo contínuo utilizando este substrato. A maior conversão em termos de máximo teórico foi obtida com xilose, em que foi possível alcançar quase um terço da conversão teórica de carbono para lipídios.

De acordo com Koutinas *et al.* (2014), a geração de co-produtos de alto valor agregado juntamente com a produção de lipídios para produção de biodiesel é de extrema importância para viabilização econômica do conceito de biorrefinarias de terceira geração. Um exemplo destes co-produtos são os carotenoides, atualmente obtidos de fontes vegetais ou sintetizados a partir de derivados petroquímicos. Porém, os métodos atuais de obtenção não são ambientalmente sustentáveis, além de não suprirem a demanda global (MAROVA *et al.*, 2012). Com base nisso, pode-se afirmar que obtenção de carotenoides por *R. toruloides* contribuirá não somente para viabilização da biorrefinarias, mas também para preencher lacunas na demanda global por carotenoides.

Mesmo não focando em produção de carotenoides, os resultados obtidos durante o cultivo com xilose sob razão C/N de 120 apresentaram resultados superiores (0,35 mg/g) a alguns trabalhos focados na produção destas biomoléculas. Dias *et al.* (2015) observaram produção de carotenoides de 0,29 mg/g durante cultivo em batelada alimentada de *L. starkeyi* NCYC 921. Zhang *et al.* (2014), utilizando sistema de foto-biorreator para induzir a produção de carotenoides, observaram máxima produção de carotenoides de apenas 0,048 mg/g durante cultivo de *R. glutinis*. Já Martins *et al.* (2018) verificaram resultados superiores aos observados neste trabalho: os autores contabilizaram 0,420 mg/g de carotenoides durante cultivo em batelada alimentada de *R. toruloides* com xarope da polpa de alfarroba como fonte de carbono. Porém, Martins *et al.* (2018) utilizaram substrato na concentração de 548,7 g/l, muito acima das 10 g/l de xilose utilizadas no presente trabalho.

A produção de torularodina e toruleno pode ajudar a compensar os baixos  $r_{lip}$  e  $r_x$  obtidos, baseado na diversificação de produtos que sejam de alto valor agregado. Estes dois carotenoides não são produzidos em larga escala e produzidos apenas por um número limitado de leveduras e fungos (KOT *et al.*, 2018). Além disso, estudos vêm mostrando que estes carotenoides possuem propriedades contra câncer (DU *et al.*, 2016), atividade antimicrobiana (UNGUREANU *et al.*, 2016) e como antioxidantes (DIMITROVA *et al.*, 2013). Os resultados obtidos no cultivo com xilose também demonstraram que, em termos de processo, é possível controlar o perfil de carotenoides produzidos por *R. toruloides* através da alteração da razão C/N e taxa de diluição.

#### **5.4.4. Conclusão**

Os cultivos com a cepa Rth utilizando hidrolisado contribuíram para compreender o comportamento da cepa obtida neste trabalho quando cultivada em biorreator de tanque agitado. Neste cultivo foi possível obter concentração celular de 6,3 g/l e conteúdo lipídico de 54,7%, muito próximo a valores existentes em literatura específica que são considerados elevados para esta levedura quando cultivada em condições análogas (reator e substrato). A estratégia de cultivo contínuo de *R. toruloides* CCT0783 ajudou a compreender o efeito de diferentes substratos e razões C/N na indução lipídica, desenvolvimento celular e até produção de moléculas de alto valor agregado (carotenoides). Os resultados obtidos demonstraram que o aumento da razão C/N acarretou em maiores concentrações lipídicas em todos os três substratos estudados. Tanto a razão C/N quanto o tipo específico de substrato tiveram forte influência nos acúmulos lipídicos e de biomassa. Além disso, os parâmetros estudados neste capítulo

(substrato e razão C/N) demonstraram que, nos cultivos com xilose, a síntese de carotenoides pode ser controlada e manipulada através da variação da razão C/N. O cultivo com glicerol alcançou maiores taxas de diluição (maior  $\mu$ ), sendo a máxima observada em razão C/N de 60 (0,240 1/h), além de apresentar a maior produtividade específica de lipídios observada neste estudo (0,085 g/(g·h)). Os cultivos com ácido acético demonstraram que este substrato pode favorecer a formação de biomassa, pois a máxima produtividade de biomassa foi verificada com esse substrato sob razão C/N de 100 (0,296 g/(l·h)). Os cultivos com xilose forneceram maior conteúdo lipídico, alcançando 60% em razão C/N de 120.

## 6. DISCUSSÕES GERAIS

Os estudos contidos neste trabalho buscaram agregar conhecimento referente à viabilização da biorrefinaria de terceira geração no tocante à produção de óleo microbiano para a produção de biodiesel. Fez-se estudos buscando melhorias em leveduras para serem cultivadas em substratos de baixo custo, mesmo na presença de inibidores, cultivos com fontes alternativas de hemicelulose e verificações sobre efeitos de parâmetros como razão C/N e natureza de substrato na produção lipídica de *R. toruloides*.

Este trabalho comparou, de maneira ainda inédita, duas estratégias de ALE – heterogênea (ALEh) e outra com seleção de clones (ALEc) – durante a adaptação de *R. toruloides* em HHBC e utilizou a estabilização do  $\mu_{\max}$  como critério para condução da adaptação. Durante a realização das duas ALE observou-se que o aumento da concentração de hidrolisado no meio de cultivo fez com que os valores finais de  $\mu_{\max}$  de cada etapa de ALE diminuíssem, devido a maior concentração de inibidores no meio e menor concentração de meio basal.

As duas cepas foram adaptadas somente até 50% de HHBCd, pois em meio com 60% de hidrolisado as células não se desenvolveram. No entanto o hidrolisado utilizado continha altas concentrações de compostos, até então, considerados inibidores. Mesmo as células não se desenvolvendo em meio contendo 60% de HHBCd, observou-se que as ALE realizadas até 50% de HHBCd foram suficientes para promover melhorias nas cepas Rth (ALEh) e Rtc (ALEc) em relação à cepa parental. Ressalta-se que as concentrações de inibidores no meio com 50% (v/v) de HHBCd eram expressivas, maior que a concentração de inibidores em hidrolisados reportados na literatura. A cepa Rth apresentou melhores resultados em comparação com a cepa Rtc após cultivo comparativo em HHBCc. A Rth apresentou  $\mu_{\max}$  50% superior ao observado com a Rtc (0,096 1/h), além de maior concentração celular, 6,51 g/l e conteúdo lipídico, 60% (g/g). Além disso, a possibilidade de se constituir um banco de células das cepas adaptadas, do ponto de vista industrial é importante, visto que mesmo após armazenamento em criogenia, as características obtidas durante a ALE são mantidas (PORTNOY; BEZDAN; ZENGLER, 2011; SANDBERG *et al.*, 2019b).

Os estudos de utilização da fração hemicelulósica de eucalipto como fonte de substrato para cultivo da cepa *R. toruloides* adaptada em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar validou a possibilidade de redirecionar um subproduto gerado em larga escala para uma utilização de maior valor agregado. Os cultivos com a cepa CCT7815 demonstraram que, mesmo sem nenhuma otimização de cultivo foi possível se alcançar conteúdos lipídicos relativamente satisfatórios, 50%. Já com a cepa Rth cultivada sob as mesmas condições, alcançou-se conteúdo lipídico de 64,3%, maior valor relatado até o momento em trabalhos visando cultivo de leveduras oleaginosas em hidrolisados de biomassa lenhosa.

Além da melhoria de cepas, prospecção de fontes de carbono de baixo custo, estudos que ajudem a elucidar os efeitos de substratos e condições de cultivo também são de suma importância na busca por viabilização econômica das biorrefinarias de terceira geração, pois permite observar condições que proporcionem maiores rendimentos lipídicos e até, produção de moléculas de alto valor agregado.

Os estudos sobre estratégias de cultivo de *R. toruloides* em turbidostato forneceram informações importantes sobre o efeito de diferentes razões C/N e substratos durante no tocante as produtividades celulares e lipídicas. Os resultados obtidos demonstraram que o aumento da razão C/N favoreceu maiores conteúdos lipídicos em todos os substratos estudados. Além disso constatou-se que, cada substrato tem direcionamento favorecido pela *R. toruloides*, podendo eles serem direcionados em maior fluxo para formação celular ou síntese lipídica. Mesmo focando na produção lipídica, observou-se também que os cultivos alimentados com xilose favoreceram a rota de produção de carotenoides, sendo que, observou-se diferentes proporções de carotenoides produzidos em diferentes razões C/N. Os resultados obtidos cultivos com turbidostato serviram de base para modelagem metabólica da levedura *R. toruloides*, simulação de cultivo e definição de parâmetros para se realizar cultivos em batelada alimentada buscando maiores produções lipídicas (LOPES *et al.*, 2020).

Salienta-se que a cepa Rth, capaz de crescer em altas concentrações de inibidores, é de relevância geral, visto que a *R. toruloides* é considerada como “*workhorse*” para fins biotecnológicos.

Dentre os diferentes cultivos, envolvendo distintos modos de operação e hidrolisados utilizados, foi possível perceber a polivalência da cepa adaptada escolhida (Rth), uma vez que foi constatado desenvolvimento celular em todas as estratégias estudadas e altos conteúdos lipídicos quando comparado com os máximos valores presentes na literatura. No cultivo com a cepa Rth em HHEc foi possível alcançar 64,3% de conteúdo lipídico, resultado

levemente inferior aos 67,5% relatado por Li, Zhao e Bai (2007), trabalho referência em termos de conteúdo, produção e produtividade lipídica (0,54 g/L·h). Apesar do alto conteúdo lipídico alcançado pela cepa Rth, ainda são necessários resultados superiores de concentração celular e lipídica para melhorar os índices de produtividade, que podem ser alcançados através de estratégias de cultivo.

O cultivo em batelada alimentada é conhecido por propiciar alta densidade celular, inclusive em cultivos com *R. toruloides* (FEI *et al.*, 2016; LI; ZHAO; BAI, 2007; LOPES *et al.*, 2020; WIEBE *et al.*, 2012). Caso seja possível manter os conteúdos lipídicos obtidos com a Rth em cultivos com alta densidade celular, um grande passo para viabilização deste processo será dado. Em 2014, Koutinas *et al.* (2014) afirmavam que, mesmo com produtividade lipídica de 0,54 g/l.h (LI, ZHAO e BAI, 2007), o biodiesel microbiano a US\$ 1,4/l ainda era inviável frente aos US\$ 1,06/l do biodiesel vegetal. Entretanto, Soccol *et al.* (2017) afirmaram que, com produtividade de 0,44 g/l.h o biodiesel baseado em óleo microbiano poderia ser obtido a US\$ 0,76/l e se tornaria competitivo a frente ao de origem vegetal (US\$ 0,81/l).

Koutinas *et al.* (2014) e Soccol *et al.* (2017) adotaram a batelada alimentada como modo de cultivo para obtenção de melhores resultados. Entretanto, estes autores utilizaram fontes de carbono estrategicamente inviáveis. Koutinas *et al.* (2014) utilizaram glicose, substrato de alto custo, enquanto Soccol *et al.* (2017) utilizaram caldo de cana, substrato utilizado massivamente utilizado para produção de açúcar e álcool a nível nacional. Utilizar substratos de alto custo ou que competem com setores estratégicos, dificultará a viabilização e perpetuação da proposta de biodiesel microbiano. Sendo assim, os resultados obtidos com Rth cultivada em substratos de baixo custo e sem competição com setores da industrial ganham ainda mais valor. Caso seja alcançado maiores resultados de concentração celular em cultivos de Rth com HHBCAb, HHBCd ou HHEc o processo de viabilização da produção de biodiesel a partir de lipídios produzidos pela Rth pode ser alcançado.

## 7. CONCLUSÕES

Este trabalho permitiu executar e comparar duas estratégias de ALE, prospecção na utilização de fontes alternativas de biomassa vegetal para serem utilizadas como fonte de carbono na produção de óleo microbiano e estratégias de cultivo que permitam alcançar altos rendimentos lipídicos.

No tocante aos estudos envolvendo a comparação das duas técnicas de adaptação evolutiva de laboratório é possível concluir que:

- (1) As duas estratégias de ALE se mostraram efetivas.
- (2) Mesmo não conseguindo prosseguir com as ALE até 100% de hidrolisado, obteve-se cepas capazes de se desenvolver em hidrolisado hemicelulósico contendo altas concentrações de inibidores e que apresentaram melhorias – cinéticas e de produtividade – em relação à cepa parental.
- (3) A ALEh se mostrou superior à ALEc, uma vez que se observou para a população de cepas obtidas pela ALEh um  $\mu_{\max}$  50% superior aos verificados com a cepa Rtc e a parental. Além disso, a cepa Rtc também forneceu resultados superiores em termos de produção lipídica e celular.

No tocante ao uso de fontes hemicelulósicas alternativas ao bagaço da cana de açúcar, no caso específico o eucalipto, conclui-se que:

- (1) Estudos demonstraram que a cepa adaptada Rth foi capaz de se desenvolver em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto concentrado (HHE) e alcançar conteúdo lipídico dos mais altos relatados na literatura (64,3 %).
- (2) Observou-se que, em cultivos com hidrolisado contendo ácido acético o valor de pH possui papel fundamental na inibição celular por ácido acético. Cultivos realizados com valores de pH acima do pKa deste ácido permitiram sua assimilação como substrato pela célula.

Com relação aos cultivos de cepas de *R. toruloides* em biorreator de tanque agitado conclui-se que:

- (1) Razões C/N mais elevadas propiciaram maiores conteúdos lipídicos.

- (2) Cultivos alimentados com ácido acético propiciaram maiores rendimentos e produtividade de biomassa.
- (3) Cultivo alimentado com glicerol proporcionou a maior produtividade específica de lipídios (0,085 g/(g.h)), maior valor relatado em literatura específica até o atual momento.
- (4) Nos cultivos utilizando xilose como fonte de carbono maiores conteúdo lipídico, 60%.
- (5) As maiores concentrações de carotenoides foram verificadas em cultivos alimentados com xilose, além disso, o perfil de carotenoides produzidos se alterou com diferentes razões C/N.
- (6) A cepa adaptada Rth cultivada em HHBCb sem qualquer procedimento secundário de detoxificação apresentou conteúdo lipídico (58,2 %) promissor.

## 8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nas verificações presentes neste deste trabalho, sugere-se como possíveis trabalhos futuros:

- (1) Estudos envolvendo estratégias de cultivo como batelada alimentada e modo contínuo da cepa Rth para se alcançar maior produtividade lipídica durante a utilização de hidrolisados hemicelulósicos como substratos.
- (2) Utilização co-substratos como como sacarose (melaço) como estratégia para controle das fases de produção celular e indução da lipogênese, vide o efeito do ácido acético como auxiliar para maiores produções lipídicas.
- (3) Estudos utilizando glicerol como co-substrato durante o cultivo da cepa Rth. O glicerol é o principal subproduto gerado durante a transesterificação no processo de obtenção de biodiesel.
- (4) Adaptação de *R. toruloides* em outros subprodutos gerados em biorrefinarias, como a vinhaça, gerado em larga escala na produção de etanol de primeira geração.
- (5) Estudos visando a produção de carotenoides pelas cepas Rtc e Rth, sejam eles meio sintético ou hidrolisados. A produção de biomoléculas de alto valor agregado contribuirá diretamente na viabilização do conceito de produção de biodiesel a partir de lipídios microbiano.
- (6) Comparação da expressão gênica das duas populações de cepas obtidas neste trabalho com a cepa parental *R. toruloides* 0783. Através deste estudo será capaz de comparar e verificar como as duas estratégias de ALE silenciaram, ativaram ou amplificaram expressões gênicas, principalmente aquelas ligadas à lipogênese e resistência a inibidores.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, Gás Natural e Biocombustíveis. *Dados de Entregas e de Aquisições de Biodiesel*. . [S.l: s.n.], 2020. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/distribuicao-e-revenda/leiloes-de-biodiesel/dados-de-entregas-e-de-aquisicoes-de-biodiesel?view=default>>.
- ALMEIDA, João R M *et al.* Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 82, n. 4, p. 340–349, 1 abr. 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jctb.1676>>.
- ALVES, Lourdes A *et al.* Pretreatment of Sugarcane Bagasse Hemicellulose Hydrolysate for Xylitol Production by *Candida guilliermondii* BT - Biotechnology for Fuels and Chemicals: Proceedings of the Nineteenth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held May 4-8. 1997, . In: FINKELSTEIN, MARK; DAVISON, BRIAN H (Org.). . Totowa, NJ: Humana Press, 1998. p. 89–98. Disponível em: <[https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1814-2\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1814-2_9)>.
- ANSCHAU, Andréia *et al.* Effect of feeding strategies on lipid production by *Lipomyces starkeyi*. *Bioresource Technology*, v. 157, p. 214–222, 2014.
- ARNOLD, Frances H. Directed Evolution: Bringing New Chemistry to Life. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 57, n. 16, p. 4143–4148, 9 abr. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/anie.201708408>>.
- AROUS, Fatma *et al.* Potential utilization of agro-industrial wastewaters for lipid production by the oleaginous yeast *Debaryomyces etchellsii*. *Journal of Cleaner Production*, v. 133, p. 899–909, 1 out. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095965261630717X>>. Acesso em: 20 out. 2019.
- ATWOOD, K C; SCHNEIDER, L K; RYAN, F J. Periodic selection in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 37, n. 3, p. 146–155, mar. 1951. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14808170>>.
- AXE, D D; BAILEY, J E. Transport of lactate and acetate through the energized cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biotechnology and bioengineering*, v. 47, n. 1, p. 8–19, jul. 1995.
- AZAD, A.K. *et al.* Prospect of biofuels as an alternative transport fuel in Australia. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 43, p. 331–351, 1 mar. 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032114009782>>. Acesso

em: 9 nov. 2019.

- AZAMBUJA, Suéllen Patricia Held *et al.* Physiology and lipid accumulation capacity of different *Yarrowia lipolytica* and *Rhodospiridium toruloides* strains on glycerol. *bioRxiv*, p. 1–18, 2018.
- AZAPAGIC, A.; PERDAN, S. Sustainable chemical engineering: Dealing with “wicked” sustainability problems. *AIChE Journal*, v. 60, n. 12, p. 3998–4007, 2014.
- BÉLIGON, Vanessa *et al.* Validation of a predictive model for fed-batch and continuous lipids production processes from acetic acid using the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*. *Biochemical Engineering Journal*, v. 111, p. 117–128, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2016.01.016>>.
- BELLISSIMI, Eleonora *et al.* Effects of acetic acid on the kinetics of xylose fermentation by an engineered, xylose-isomerase-based *Saccharomyces cerevisiae* strain. *FEMS yeast research*, v. 9, n. 3, p. 358–364, maio 2009.
- BENNETT, A F; DAO, K M; LENSKI, R E. Rapid evolution in response to high-temperature selection. *Nature*, v. 346, n. 6279, p. 79–81, jul. 1990.
- BERRY, David B; GASCH, Audrey P. Stress-activated genomic expression changes serve a preparative role for impending stress in yeast. *Molecular biology of the cell*, v. 19, n. 11, p. 4580–4587, nov. 2008.
- BITTENCOURT, Gustavo Amaro *et al.* Fractionation of sugarcane bagasse using hydrothermal and advanced oxidative pretreatments for bioethanol and biogas production in lignocellulose biorefineries. *Bioresource Technology*, v. 292, p. 121963, 1 nov. 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852419311939>>. Acesso em: 9 nov. 2019.
- BONTURI, Nemailla *et al.* Microbial oil production in sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate without nutrient supplementation by a *Rhodospiridium toruloides* adapted strain. *Process Biochemistry*, v. 57, p. 16–25, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2017.03.007>>.
- BONTURI, Nemailla. *Produção de óleo microbiano por cepas adaptadas de leveduras oleaginosas a partir de materiais hemicelulósicos visando a sua aplicação em biorrefinarias*. 2016. 184 f. Universidade Estadual de Campinas, 2016.
- BRANDENBURG, Jule *et al.* Lipid production from hemicellulose with *Lipomyces starkeyi* in a pH regulated fed-batch cultivation. *Yeast (Chichester, England)*, v. 33, n. 8, p. 451–62, ago. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26945827>>. Acesso em: 21 out. 2016.
- BRAUNWALD, Teresa *et al.* Economic assessment of microbial biodiesel production using heterotrophic yeasts. *International Journal of Green Energy*, v. 13, n. 3, p. 274–282, 19 fev. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/15435075.2014.940957>>.

- BÜCHERT, Johanna; PULS, Jürgen; POUTANEN, Kaisa. The use of steamed hemicellulose as substrate in microbial conversions. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 20, n. 1, p. 309, 1989. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/BF02936491>>.
- CAKAR, Z Petek *et al.* Evolutionary engineering of multiple-stress resistant *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research*, v. 5, n. 6–7, p. 569–578, abr. 2005.
- CALVEY, Christopher H. *et al.* Nitrogen limitation, oxygen limitation, and lipid accumulation in *Lipomyces starkeyi*. *Bioresource Technology*, v. 200, p. 780–788, 1 jan. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852415015230>>. Acesso em: 9 nov. 2019.
- CAMBERO, C.; SOWLATI, T. Assessment and optimization of forest biomass supply chains from economic, social and environmental perspectives - A review of literature. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 36, p. 62–73, 2014.
- CARMAN, George M; HAN, Gil-Soo. Phosphatidic acid phosphatase, a key enzyme in the regulation of lipid synthesis. *The Journal of biological chemistry*, v. 284, n. 5, p. 2593–2597, jan. 2009.
- CARPIO, Lucio Guido Tapia; SIMONE DE SOUZA, Fábio. Optimal allocation of sugarcane bagasse for producing bioelectricity and second generation ethanol in Brazil: Scenarios of cost reductions. *Renewable Energy*, v. 111, p. 771–780, 1 out. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960148117304007>>. Acesso em: 9 nov. 2019.
- CAUSTON, H C *et al.* Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Molecular biology of the cell*, v. 12, n. 2, p. 323–337, fev. 2001.
- CHANDEL, Anuj K; SILVÉRIO, Silvio; SINGH, Om V. Detoxification of Lignocellulose Hydrolysates: Biochemical and Metabolic Engineering Toward White Biotechnology. p. 388–401, 2013.
- CHASMAN, Deborah *et al.* Pathway connectivity and signaling coordination in the yeast stress-activated signaling network. *Molecular systems biology*, v. 10, p. 759, nov. 2014.
- CHEN, Fang; DIXON, Richard A. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. *Nature Biotechnology*, v. 25, n. 7, p. 759–761, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nbt1316>>.
- CHERUBINI, F. *et al.* Toward a common classification approach for biorefinery systems. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, v. 3, n. 5, p. 534–546, 2009.
- CHOE, Donghui *et al.* Adaptive laboratory evolution of a genome-reduced *Escherichia coli*. *Nature Communications*, v. 10, n. 1, p. 935, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41467-019-08888-6>>.
- CHOUDHARY, Vineet; JACQUIER, Nicolas; SCHNEITER, Roger. The topology of the

triacylglycerol synthesizing enzyme Lro1 indicates that neutral lipids can be produced within the luminal compartment of the endoplasmic reticulum: Implications for the biogenesis of lipid droplets. *Communicative & Integrative Biology*, v. 4, n. 6, p. 781–784, 1 nov. 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.4161/cib.17830>>.

COELHO, M.A. *et al.* Identification of mating type genes in the bipolar basidiomycetous yeast *Rhodospodium toruloides*: First insight into the MAT locus structure of the Sporidiobolales. *Eukaryotic Cell*, v. 7, n. 6, p. 1053–1061, 2008.

COLEMAN, Mark; STANTURF, John. Biomass feedstock production systems: Economic and environmental benefits. *Biomass & Bioenergy - BIOMASS BIOENERG*, v. 30, p. 693–695, 1 ago. 2006.

CORDERO-RAVELO, Virginia; SCHALLENBERG-RODRIGUEZ, Julieta. Biodiesel production as a solution to waste cooking oil (WCO) disposal. Will any type of WCO do for a transesterification process? A quality assessment. *Journal of Environmental Management*, v. 228, p. 117–129, 15 dez. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479718309836>>. Acesso em: 20 nov. 2019.

CUNHA, Joana T *et al.* Xylose fermentation efficiency of industrial *Saccharomyces cerevisiae* yeast with separate or combined xylose reductase/xylytol dehydrogenase and xylose isomerase pathways. *Biotechnology for Biofuels*, v. 12, n. 1, p. 20, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13068-019-1360-8>>.

DA SILVA CÉSAR, Aldara *et al.* Competitiveness analysis of “social soybeans” in biodiesel production in Brazil. *Renewable Energy*, v. 133, p. 1147–1157, 1 abr. 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960148118310589>>. Acesso em: 9 nov. 2019.

DAI, C -. C *et al.* Biodiesel generation from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity. *file:///C:/Users/helbe/Downloads/10.1186%252F1472-6750-12-26.bib*, v. 6, 2007.

DIAS, Carla *et al.* New dual-stage pH control fed-batch cultivation strategy for the improvement of lipids and carotenoids production by the red yeast *Rhodospodium toruloides* NCYC 921. *Bioresource technology*, v. 189, p. 309–318, 2015a.

DIAZ, Teresa *et al.* Combining evolutionary and metabolic engineering in *Rhodospodium toruloides* for lipid production with non-detoxified wheat straw hydrolysates. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 102, n. 7, p. 3287–3300, abr. 2018.

DIMITROVA, Stela *et al.* Production of metabolites with antioxidant and emulsifying properties by antarctic strain *sporobolomyces salmonicolor* AL1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 169, n. 1, p. 301–311, 2013.

DOBROWOLSKI, Adam *et al.* Efficient conversion of crude glycerol from various industrial wastes into single cell oil by yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource technology*, v. 207, p. 237–243, maio 2016.

- DONOT, F. *et al.* Single cell oils (SCOs) from oleaginous yeasts and moulds: Production and genetics. *Biomass and Bioenergy*, v. 68, p. 135–150, 1 set. 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953414003183>>. Acesso em: 20 nov. 2019.
- DRAGOSITS, Martin *et al.* Evolutionary potential, cross-stress behavior and the genetic basis of acquired stress resistance in *Escherichia coli*. *Molecular systems biology*, v. 9, p. 643, 2013.
- DRAGOSITS, Martin; MATTANOVICH, Diethard. Adaptive laboratory evolution – principles and applications for biotechnology. *Microbial Cell Factories*, v. 12, n. 1, p. 64, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-64>>.
- DU, Chao *et al.* The suppression of torulene and torularhodin treatment on the growth of PC-3 xenograft prostate tumors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 469, n. 4, p. 1146–1152, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.12.112>>.
- ENGELBERTH, Abigail; VAN WALSUM, G. Adding Value to the Integrated Forest Biorefinery with Co-Products from Hemicellulose-Rich Pre-Pulping Extract. *Biorefinery Co-Products: Phytochemicals, Primary Metabolites and Value-Added Biomass Processing*. [S.l.: s.n.], 2012. p. 287–310.
- FEI, Qiang *et al.* Enhanced lipid production by *Rhodospiridium toruloides* using different fed-batch feeding strategies with lignocellulosic hydrolysate as the sole carbon source. *Biotechnology for Biofuels*, v. 9, n. 1, p. 130, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13068-016-0542-x>>.
- FEI, Qiang *et al.* The effect of volatile fatty acids as a sole carbon source on lipid accumulation by *Cryptococcus albidus* for biodiesel production. *Bioresource technology*, v. 102, n. 3, p. 2695–2701, fev. 2011.
- FERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, Javier *et al.* Lignin Separation and Fractionation by Ultrafiltration. *Separation of Functional Molecules in Food by Membrane Technology*. [S.l.]: Academic Press, 2019. p. 229–265. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128150566000073>>. Acesso em: 7 nov. 2019.
- FERNANDO, S. *et al.* Biorefineries: Current status, challenges, and future direction. *Energy and Fuels*, v. 20, n. 4, p. 1727–1737, 2006.
- FOLCH, J; LEES, M; STANLEY, G H S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. v. 226, 1957.
- FUESS, Lucas Tadeu; GARCIA, Marcelo Loureiro; ZAIAT, Marcelo. Seasonal characterization of sugarcane vinasse: Assessing environmental impacts from fertirrigation and the bioenergy recovery potential through biodigestion. *Science of The Total Environment*, v. 634, p. 29–40, 1 set. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969718310866>>. Acesso em: 9 nov. 2019.

- GALLINA, Gianluca *et al.* Optimal conditions for hemicelluloses extraction from *Eucalyptus globulus* wood: hydrothermal treatment in a semi-continuous reactor. *Fuel Processing Technology*, v. 148, p. 350–360, 1 jul. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378382016301175>>. Acesso em: 26 maio 2019.
- GAO, Qiuqiang *et al.* Lipid fermentation of corncob residues hydrolysate by oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum*. *Bioresource technology*, v. 152, p. 552–556, 2014.
- GARAY, Luis A; BOUNDY-MILLS, Kyria L; GERMAN, J Bruce. Accumulation of High-Value Lipids in Single-Cell Microorganisms: A Mechanistic Approach and Future Perspectives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 62, n. 13, p. 2709–2727, 2 abr. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/jf4042134>>.
- GONZALEZ-RAMOS, Daniel *et al.* A new laboratory evolution approach to select for constitutive acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of causal mutations. *Biotechnology for biofuels*, v. 9, p. 173, 2016.
- GONZALEZ, Andrew; BELL, Graham. Evolutionary rescue and adaptation to abrupt environmental change depends upon the history of stress. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, v. 368, n. 1610, p. 20120079, jan. 2013.
- GORKE, Boris; STULKE, Jorg. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nature reviews. Microbiology*, v. 6, n. 8, p. 613–624, ago. 2008.
- GRESHAM, David *et al.* The Repertoire and Dynamics of Evolutionary Adaptations to Controlled Nutrient-Limited Environments in Yeast. *PLOS Genetics*, v. 4, n. 12, p. e1000303, 12 dez. 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000303>>.
- HEIPIEPER, Hermann J. *et al.* Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. *Trends in Biotechnology*, v. 12, n. 10, p. 409–415, 1 out. 1994. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0167779994900299>>. Acesso em: 12 nov. 2019.
- HODGE, D. B. Anderson *et al.* Detoxification requirements for bioconversion of softwood dilute acid hydrolyzates to succinic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, 44 (5), 309-316.
- HOHMANN, Stefan; MAGER, Willem H. *Yeast Stress Responses*. 1. ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2003. v. 1. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/3-540-45611-2>>. (Topics in Current Genetics).
- HONIGBERG, Saul M. Cell signals, cell contacts, and the organization of yeast communities. *Eukaryotic cell*, v. 10, n. 4, p. 466–473, abr. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21296916>>.
- HU, Cuimin *et al.* Effects of biomass hydrolysis by-products on oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresource technology*, v. 100, n. 20, p. 4843–4847,

out. 2009.

- HUA, Qiang *et al.* Metabolic Characterization of *Escherichia coli* Strains Adapted to Growth on Lactate. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, n. 14, p. 4639 LP – 4647, 15 jul. 2007. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/73/14/4639.abstract>>.
- HUANG, Hua-Jiang *et al.* Process modeling and analysis of pulp mill-based integrated biorefinery with hemicellulose pre-extraction for ethanol production: A comparative study. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 2, p. 624–631, 1 jan. 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852409010402>>. Acesso em: 29 maio 2019.
- HUANG, Xiang-Feng *et al.* Culture strategies for lipid production using acetic acid as sole carbon source by *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresource technology*, v. 206, p. 141–149, abr. 2016.
- HUGHES, Bradley S; CULLUM, Alistair J; BENNETT, Albert F. Evolutionary adaptation to environmental ph in experimental lineages of *Escherichia coli*. *Evolution*, v. 61, n. 7, p. 1725–1734, 1 jul. 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2007.00139.x>>.
- IBARRA, Rafael U; EDWARDS, Jeremy S; PALSSON, Bernhard O. *Escherichia coli* K-12 undergoes adaptive evolution to achieve in silico predicted optimal growth. *Nature*, v. 420, n. 6912, p. 186–189, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nature01149>>.
- INTERNATIONAL ENERGY AGENCY, IEA. 2019. Disponível em: <[https://webstore.iea.org/download/direct/2710?fileName=World\\_Energy\\_Balances\\_2019\\_Overview.pdf](https://webstore.iea.org/download/direct/2710?fileName=World_Energy_Balances_2019_Overview.pdf)>.
- INTERNATIONAL ENERGY OUTLOOK 2018. Disponível em: <<https://www.eia.gov/outlooks/ieo/>>. Acesso em: 4 set. 2018.
- ISNTITUTO BRASILEIRO DE ÁRVORES, IBA. *Dados do relatório ibá 2018*. 2017.
- JUGWANTH, Yanchal; SEWSYNKER-SUKAI, Y.; GUEGUIM KANA, E.B. Valorization of sugarcane bagasse for bioethanol production through simultaneous saccharification and fermentation: Optimization and kinetic studies. *Fuel*, p. 116552, 9 nov. 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016236119319064>>. Acesso em: 20 nov. 2019.
- JUN, Ai; TSCHIRNER, Ulrike W.; TAUER, Zachary. Hemicellulose extraction from aspen chips prior to kraft pulping utilizing kraft white liquor. *Biomass and Bioenergy*, v. 37, p. 229–236, 1 fev. 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953411006155>>. Acesso em: 26 maio 2019.
- KAMM, B.; KAMM, M. Biorefinery - systems. *Chemical and Biochemical Engineering*

*Quarterly*, v. 18, n. 1, p. 1–6, 2004.

- KAO, Katy; SHERLOCK, Gavin. Molecular Characterization of Clonal Interference During Adaptive Evolution in Asexual Populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature genetics*, v. 40, p. 1499–1504, 1 dez. 2008.
- KERKHOVEN, Eduard J *et al.* Regulation of amino-acid metabolism controls flux to lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*. *npj Systems Biology and Applications*, v. 2, n. 1, p. 16005, 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/npjbsba20165>>.
- KITCHA, Suleeporn; CHEIRSILP, Benjamas. Screening of Oleaginous Yeasts and Optimization for Lipid Production Using Crude Glycerol as a Carbon Source. *Energy Procedia*, v. 9, p. 274–282, 1 jan. 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1876610211017826>>. Acesso em: 9 nov. 2019.
- KONG, Xiao *et al.* Catalytic conversion of 5-hydroxymethylfurfural to some value-added derivatives. *Green Chemistry*, v. 20, n. 16, p. 3657–3682, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/C8GC00234G>.
- KOSA, Matyas; RAGAUSKAS, Arthur J. Lipids from heterotrophic microbes: advances in metabolism research. *Trends in biotechnology*, v. 29, n. 2, p. 53–61, fev. 2011.
- KOT, Anna M. *et al.* Torulene and torularhodin: “New” fungal carotenoids for industry? *Microbial Cell Factories*, v. 17, n. 1, p. 1–14, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12934-018-0893-z>>.
- KOUTINAS, Apostolis A. *et al.* Design and techno-economic evaluation of microbial oil production as a renewable resource for biodiesel and oleochemical production. *Fuel*, v. 116, p. 566–577, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2013.08.045>>.
- KUMAR, Dipesh; SINGH, Bhaskar; KORSTAD, John. Utilization of lignocellulosic biomass by oleaginous yeast and bacteria for production of biodiesel and renewable diesel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 73, p. 654–671, 1 jun. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032117300199#s0115>>. Acesso em: 7 nov. 2019.
- KUMAR, S. *et al.* Genome sequence of the oleaginous red yeast *Rhodospiridium toruloides* MTCC 457. *Eukaryotic Cell*, v. 11, n. 8, p. 1083–1084, 2012.
- KUNDU, Sharmistha; HORN, Peter J; PETERSON, Craig L. SWI/SNF is required for transcriptional memory at the yeast GAL gene cluster. *Genes & development*, v. 21, n. 8, p. 997–1004, 15 abr. 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17438002>>.
- KUROSAWA, Kazuhiko; LASER, Josephine; SINSKEY, Anthony J. Tolerance and adaptive evolution of triacylglycerol-producing *Rhodococcus opacus* to lignocellulose-derived inhibitors. *Biotechnology for biofuels*, v. 8, p. 76, 13 maio 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26052344>>.

- KUYPER, Marko *et al.* Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain. *FEMS yeast research*, v. 5, n. 10, p. 925–934, jul. 2005.
- LAHTVEE, Petri-Jaan *et al.* Absolute Quantification of Protein and mRNA Abundances Demonstrate Variability in Gene-Specific Translation Efficiency in Yeast. *Cell Systems*, p. 1–10, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405471217300881>>.
- LEE, Jaslyn Jie Lin *et al.* Metabolomic profiling of *Rhodospiridium toruloides* grown on glycerol for carotenoid production during different growth phases. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 62, n. 41, p. 10203–10209, out. 2014.
- LENSKI, R E; TRAVISANO, M. Dynamics of adaptation and diversification: a 10,000-generation experiment with bacterial populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 91, n. 15, p. 6808–6814, jul. 1994.
- LENSKI, Richard E *et al.* Long-Term Experimental Evolution in *Escherichia coli*. I. Adaptation and Divergence During 2,000 Generations. *The American Naturalist*, v. 138, n. 6, p. 1315–1341, 1991. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/2462549>>.
- LEON, Dacia *et al.* Innovation in an *E. coli* evolution experiment is contingent on maintaining adaptive potential until competition subsides. *PLOS Genetics*, v. 14, n. 4, p. e1007348, 12 abr. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007348>>.
- LEVY, Sasha F; ZIV, Naomi; SIEGAL, Mark L. Bet hedging in yeast by heterogeneous, age-correlated expression of a stress protectant. *PLoS biology*, v. 10, n. 5, p. e1001325, 2012.
- LI, Han-Yin *et al.* Structural characterization of hemicelluloses and topochemical changes in Eucalyptus cell wall during alkali ethanol treatment. *Carbohydrate Polymers*, v. 123, p. 17–26, 5 jun. 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861714012697>>. Acesso em: 12 nov. 2019.
- LI, Han-Yin *et al.* The effect of ionic liquids pretreatment on the distribution and structure of alkali-soluble hemicelluloses from Eucalyptus. *Separation and Purification Technology*, v. 191, p. 364–369, 31 jan. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586617313540>>. Acesso em: 12 nov. 2019.
- LI, Yonghong; ZHAO, Zongbao (Kent); BAI, Fengwu. High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 41, n. 3, p. 312–317, 2 ago. 2007a. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022907000798>>. Acesso em: 9 nov. 2019.
- LI, Yonghong; ZHAO, Zongbao (Kent); BAI, Fengwu. High-density cultivation of oleaginous

- yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 41, n. 3, p. 312–317, 2 ago. 2007b. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022907000798>>. Acesso em: 11 nov. 2019.
- LIANG, Yanna *et al.* Lipid production from sweet sorghum bagasse through yeast fermentation. *Renewable Energy*, v. 40, n. 1, p. 130–136, 1 abr. 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960148111005659>>. Acesso em: 8 dez. 2019.
- LIU, Rongming *et al.* Genome scale engineering techniques for metabolic engineering. *Metabolic Engineering*, v. 32, p. 143–154, 1 nov. 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1096717615001238>>. Acesso em: 30 nov. 2019.
- LIU, Shijie. Woody biomass: Niche position as a source of sustainable renewable chemicals and energy and kinetics of hot-water extraction/hydrolysis. *Biotechnology advances*, v. 28, n. 5, p. 563–582, 2010.
- LIU, Tiangang; KHOSLA, Chaitan. Genetic engineering of *Escherichia coli* for biofuel production. *Annual review of genetics*, v. 44, p. 53–69, 2010.
- LIU, Yating *et al.* Enhanced lipid production with undetoxified corncob hydrolysate by *Rhodotorula glutinis* using a high cell density culture strategy. *Bioresource technology*, v. 180, p. 32–39, mar. 2015.
- LONDOS, C *et al.* Role of PAT proteins in lipid metabolism. *Biochimie*, v. 87, n. 1, p. 45–49, jan. 2005.
- LONG, Allan P *et al.* Lipid droplet de novo formation and fission are linked to the cell cycle in fission yeast. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, v. 13, n. 5, p. 705–714, maio 2012.
- LOPES, H. J. S. *et al.* C/N ratio and carbon source-dependent lipid production profiling in *Rhodotorula toruloides*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00253-020-10386-5>>.
- LOPES, H. J. S.; BONTURI, N.; MIRANDA, E. A. *Rhodotorula toruloides* Single Cell Oil Production Using *Eucalyptus urograndis* Hemicellulose Hydrolysate as a Carbon Source. *Energies*, v. 13, n. 4, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1996-1073/13/4/795>>.
- LOPES, H. J. S.; RAMOS, L. R.; SILVA, E. L.. Co-Fermentation of Cheese Whey and Crude Glycerol in EGSB Reactor as a Strategy to Enhance Continuous Hydrogen and Propionic Acid Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 183, n. 3, p. 712–728, 2017. Disponível em: <<https://www.cheric.org/research/tech/periodicals/view.php?seq=1589332>>.
- MADDAMSETTI, Rohan; LENSKI, Richard E; BARRICK, Jeffrey E. Adaptation, Clonal Interference, and Frequency-Dependent Interactions in a Long-Term Evolution Experiment with *Escherichia coli*; *Genetics*, v. 200, n. 2, p. 619 LP – 631, 1 jun. 2015. Disponível em: <<http://www.genetics.org/content/200/2/619.abstract>>.

- MAITY, Sunil K. Opportunities, recent trends and challenges of integrated biorefinery: Part I. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 43, p. 1427–1445, 1 mar. 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1364032114010399>>. Acesso em: 6 nov. 2019.
- MANAF, Intan Shafinaz Abd *et al.* A review for key challenges of the development of biodiesel industry. *Energy Conversion and Management*, v. 185, p. 508–517, 1 abr. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196890419302018>>. Acesso em: 26 nov. 2019.
- MAROVA, I. *et al.* Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production. *Journal of Environmental Management*, v. 95, n. SUPPL., p. S338–S342, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.06.018>>.
- MARQUES, Gisela *et al.* Evaluation of the Chemical Composition of Different Non-Woody Plant Fibers Used for Pulp and Paper Manufacturing. *The Open Agriculture Journal*, v. 4, p. 93–101, 13 mar. 2010.
- MARTINS, Vasco *et al.* Carob pulp syrup: A potential Mediterranean carbon source for carotenoids production by *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921. *Bioresource Technology Reports*, v. 3, n. August, p. 177–184, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2018.07.008>>.
- MAST, B. MAST, B. ET AL. Lipid production for microbial biodiesel by the oleagenous yeast *Rhodotorula glutinis* using hydrolysates of wheat straw and miscanthus as carbon sources. *Waste and biomass valorization*, V. 5, N. 6, P. 955–962, 2014.
- MATSAKAS, Leonidas *et al.* Acetate-detoxification of wood hydrolysates with alkali tolerant *Bacillus* sp. as a strategy to enhance the lipid production from *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresource Technology*, v. 242, p. 287–294, 1 out. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852417304832>>. Acesso em: 29 maio 2019.
- MATSAKAS, Leonidas *et al.* Use of dried sweet sorghum for the efficient production of lipids by the yeast *Lipomyces starkeyi* CBS 1807. *Industrial Crops and Products*, v. 62, p. 367–372, 1 dez. 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669014005561>>. Acesso em: 20 nov. 2019.
- MEESTERS, P A E P; HUIJBERTS, G N M; EGGINK, G. High-cell-density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 45, n. 5, p. 575–579, jun. 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s002530050731>>.
- MILLER, G L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1 mar. 1959. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>>.
- MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, MME. No Title. 2019. Disponível em: <http://www.mme.gov.br/>>.

- MONCADA B., Jonathan; ARISTIZÁBAL M., Valentina; CARDONA A., Carlos A. Design strategies for sustainable biorefineries. *Biochemical Engineering Journal*, v. 116, p. 122–134, 15 dez. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X16301620>>. Acesso em: 6 nov. 2019.
- MONOD, Jacques. The growth of bacterial cultures. *Annual Reviews in Microbiology*, v. 3, p. 371–394, 1949.
- MURPHY, Denis J. The dynamic roles of intracellular lipid droplets: from archaea to mammals. *Protoplasma*, v. 249, n. 3, p. 541–585, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00709-011-0329-7>>.
- NAIK, S.N. *et al.* Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, n. 2, p. 578–597, 2010.
- NAM, Hojung; CONRAD, Tom M; LEWIS, Nathan E. The role of cellular objectives and selective pressures in metabolic pathway evolution. *Current opinion in biotechnology*, v. 22, n. 4, p. 595–600, ago. 2011.
- NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY, NREL. *What is a biorrefinery?*
- NICOL, R W; MARCHAND, K; LUBITZ, W D. Bioconversion of crude glycerol by fungi. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 93, n. 5, p. 1865–1875, mar. 2012.
- NIEHUS, Xochitl *et al.* Engineering *Yarrowia lipolytica* to enhance lipid production from lignocellulosic materials. *Biotechnology for Biofuels*, v. 11, n. 1, p. 11, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13068-018-1010-6>>.
- NIELSEN, Fredrik *et al.* Short-term adaptation during propagation improves the performance of xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous saccharification and co-fermentation. *Biotechnology for biofuels*, v. 8, p. 219, 2015.
- OCHOA-ESTOPIER, A. *et al.* Kinetic analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* strain adapted for improved growth on glycerol: Implications for the development of yeast bioprocesses on glycerol. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 2, p. 1521–1527, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.08.003>>.
- OECD/FAO. *Agricultural Outlook - Biofuels*. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1787/agr\\_outlook-2016-en](http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2016-en)>. Acesso em: 24 set. 2018.
- OHARA, H. Biorefinery. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 62, n. 5–6, p. 474–477, 2003.
- OSORIO-GONZÁLEZ, Carlos S. *et al.* Lipid production in *Rhodospiridium toruloides* using C-6 and C-5 wood hydrolysate: A comparative study. *Biomass and Bioenergy*, v. 130, p. 105355, 1 nov. 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953419303046?via%3Dihub>>. Acesso em: 20 out. 2019.
- OUR WORLD IN DATA. *Global population growth*. Disponível em:

<<https://ourworldindata.org/future-population-growth>>.

PACKER, Michael S; LIU, David R. Methods for the directed evolution of proteins. *Nature Reviews Genetics*, v. 16, n. 7, p. 379–394, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrg3927>>.

PALKOVA, Z; FORSTOVA, J. Yeast colonies synchronise their growth and development. *Journal of cell science*, v. 113 ( Pt. 1), p. 1923–1928, jun. 2000.

PALMEROS PARADA, Mar; OSSEWEIJER, Patricia; POSADA DUQUE, John A. Sustainable biorefineries, an analysis of practices for incorporating sustainability in biorefinery design. *Industrial Crops and Products*, v. 106, p. 105–123, 1 nov. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669016305659>>. Acesso em: 6 nov. 2019.

PALMQVIST, Eva; HAHN-HÄGERDAL, Bärbel. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, v. 74, n. 1, p. 25–33, 1 ago. 2000a. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852499001613>>. Acesso em: 12 nov. 2019.

PALMQVIST, Eva; HAHN-HÄGERDAL, Bärbel. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, v. 74, n. 1, p. 25–33, 1 ago. 2000b. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852499001613>>. Acesso em: 7 nov. 2019.

PAMPULHA, M E; LOUREIRO-DIAS, M C. Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 31, n. 5, p. 547–550, out. 1989. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/BF00270792>>.

PANDEY, A. *et al.* Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: Sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, v. 74, n. 1, p. 69–80, 2000.

PAPANIKOLAOU, Seraphim *et al.* Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel ( fatty acid methyl esters ) manufacturing process : Production of 1, 3-propanediol , citric acid and single cell oil. v. 32, p. 60–71, 2008.

PAPANIKOLAOU, Seraphim; AGGELIS, George. Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single stage continuous culture. *Bioresource Technology*, v. 82, n. 1, p. 43–49, 2002.

PAPANIKOLAOU, Seraphim; AGGELIS, George. Review Article Lipids of oleaginous yeasts . Part II : Technology and potential applications. p. 1052–1073, 2011.

PARK, Young-Kyoung *et al.* Efficient expression vectors and host strain for the production of recombinant proteins by *Yarrowia lipolytica* in process conditions. *Microbial Cell Factories*, v. 18, n. 1, p. 167, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12934-019-1218-6>>.

- PARK, Young-Kyoung; NICAUD, Jean-Marc; LEDESMA-AMARO, Rodrigo. The Engineering Potential of *Rhodospiridium toruloides* as a Workhorse for Biotechnological Applications. *Trends in Biotechnology*, v. 36, n. 3, p. 304–317, 1 mar. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779917302779>>. Acesso em: 13 jun. 2019.
- PATEL, A. *et al.* Sustainable biodiesel production from oleaginous yeasts utilizing hydrolysates of various non-edible lignocellulosic biomasses. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 62, p. 836–855, 2016.
- PATEL, Alok; MATSAKAS, Leonidas. A comparative study on de novo and ex novo lipid fermentation by oleaginous yeast using glucose and sonicated waste cooking oil. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 52, p. 364–374, 1 abr. 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350417718311544?via%3Dihub#b0200>>. Acesso em: 9 nov. 2019.
- PETERS, J.; THIELMANN, S. Promoting biofuels: Implications for developing countries. *Energy Policy*, v. 36, n. 4, p. 1538–1544, 2008.
- PETERSON, W J *et al.* Quantitative determination of the carotenoids in yeasts of the genus *Rhodotorula*. *Journal of bacteriology*, v. 75, n. 5, p. 586–591, maio 1958. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13538929>>.
- PFAU, Swinda *et al.* Visions of Sustainability in Bioeconomy Research. *Sustainability*, v. 6, p. 1222–1249, 1 mar. 2014.
- PIENKOS, Philip T; ZHANG, Min. Role of pretreatment and conditioning processes on toxicity of lignocellulosic biomass hydrolysates. *Cellulose*, v. 16, n. 4, p. 743–762, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10570-009-9309-x>>.
- PORTNOY, Vasiliy A; BEZDAN, Daniela; ZENGLER, Karsten. Adaptive laboratory evolution—harnessing the power of biology for metabolic engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 22, n. 4, p. 590–594, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166911000590>>.
- QIAN, Xiujuan *et al.* Continuous self-provided fermentation for microbial lipids production from acetate by using oleaginous yeasts *Cryptococcus podzolicus* and *Trichosporon porosum*. *Renewable Energy*, v. 146, p. 737–743, 1 fev. 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096014811931033X#undfig1>>. Acesso em: 24 out. 2019.
- RAFIQUL, I.S.M.; SAKINAH, A.M. Mimi. Design of process parameters for the production of xylose from wood sawdust. *Chemical Engineering Research and Design*, v. 90, n. 9, p. 1307–1312, 1 set. 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0263876211004813>>. Acesso em: 26 maio 2019.
- RAJAKUMARI, Sona; GRILLITSCH, Karlheinz; DAUM, Gunther. Synthesis and turnover of non-polar lipids in yeast. *Progress in lipid research*, v. 47, n. 3, p. 157–171, maio 2008.

- RATLEDGE, C. Microbial lipids: commercial realities or academic curiosities. In: RATLEDGE, D. KYLE & C. (Org.). *Journal of Chemical Information and Modeling*. [S.l.]: AOCS Press, 2013. v. 53. p. 1689–1699.
- RATLEDGE, C. Microbial oils and fats: an assessment of their commercial potential. *Progress in Industrial Microbiology*, v. 16, p. 119–126, 1982.
- REZENDE, Camila Alves *et al.* Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. *Biotechnology for Biofuels*, v. 4, n. 1, p. 54, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-54>>.
- RIEHLE, Michelle M *et al.* Evolutionary changes in heat-inducible gene expression in lines of *Escherichia coli* adapted to high temperature. *Physiological genomics*, v. 14, n. 1, p. 47–58, jun. 2003.
- RODRIGUEZ-FROMETA, Rosa Amarilis *et al.* Malic enzyme activity is not the only bottleneck for lipid accumulation in the oleaginous fungus *Mucor circinelloides*. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 97, n. 7, p. 3063–3072, abr. 2013.
- ROLLAND, Filip; WINDERICKX, Joris; THEVELEIN, Johan M. Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Research*, v. 2, n. 2, p. 183–201, 1 maio 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2002.tb00084.x>>.
- ROTTENBERG, Hagai. [64] The measurement of membrane potential and  $\Delta\text{pH}$  in cells, organelles, and vesicles. *Methods in Enzymology*, v. 55, p. 547–569, 1 jan. 1979. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0076687979550666>>. Acesso em: 12 nov. 2019.
- RYU, Byung-Gon *et al.* High-cell-density cultivation of oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* for biodiesel production using organic waste from the brewery industry. *Bioresource technology*, v. 135, p. 357–364, maio 2013.
- SANDBERG, Troy E. *et al.* The emergence of adaptive laboratory evolution as an efficient tool for biological discovery and industrial biotechnology. *Metabolic Engineering*, v. 56, p. 1–16, 1 dez. 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1096717619301533>>. Acesso em: 20 nov. 2019.
- SANTOS, Valdilene Canazart Dos. *Engenharia evolutiva da levedura Kluyveromyces marxianus UFV-3 para fermentação de xilose; Evolutionary engineering of Kluyveromyces marxianus UFV-3 for xylose fermentation*. 2011. UFV, 2011. Disponível em: <<http://www.locus.ufv.br/handle/123456789/6579>>.
- SANTUCCI, B. S. *et al.* Autohydrolysis of Hemicelluloses from Sugarcane Bagasse During Hydrothermal Pretreatment: A Kinetic Assessment. *Bioenergy Res.* 2015, 8, 1778–1787.
- SAUER, Uwe. Evolutionary Engineering of Industrially Important Microbial Phenotypes BT -

Metabolic Engineering. In: NIELSEN, JENS *et al.* (Org.). . Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2001. p. 129–169. Disponível em: <[https://doi.org/10.1007/3-540-45300-8\\_7](https://doi.org/10.1007/3-540-45300-8_7)>.

SCHNEIDER, K H *et al.* Enzyme evolution in *Rhodobacter sphaeroides*: selection of a mutant expressing a new galactitol dehydrogenase and biochemical characterization of the enzyme. *Microbiology (Reading, England)*, v. 141 ( Pt 8, p. 1865–1873, ago. 1995.

SCHWEIZER, Eckhart; HOFMANN, Jorg. Microbial type I fatty acid synthases (FAS): major players in a network of cellular FAS systems. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, v. 68, n. 3, p. 501–17, table of contents, set. 2004.

SEVERO, Ihana Aguiar *et al.* Biodiesel facilities: What can we address to make biorefineries commercially competitive? *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 112, p. 686–705, 1 set. 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032119304137>>. Acesso em: 6 nov. 2019.

SHEN, Hongwei *et al.* Compositional profiles of *Rhodospiridium toruloides* cells under nutrient limitation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 101, n. 9, p. 3801–3809, 2017.

SHEN, Hongwei *et al.* Kinetics of continuous cultivation of the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Journal of Biotechnology*, v. 168, n. 1, p. 85–89, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.08.010>>.

SHEN, Qi *et al.* Sweetpotato vines hydrolysate promotes single cell oils production of *Trichosporon fermentans* in high-density molasses fermentation. *Bioresource technology*, v. 176, p. 249–256, 31 jan. 2015.

SITEPU, Irnayuli R *et al.* Oleaginous yeasts for biodiesel: current and future trends in biology and production. *Biotechnology advances*, v. 32, n. 7, p. 1336–1360, nov. 2014.

SLUITER, A. *et al.* *Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples.* . [S.l.: s.n.], 2006.

SOCCOL, Carlos Ricardo *et al.* Pilot scale biodiesel production from microbial oil of *Rhodospiridium toruloides* DEBB 5533 using sugarcane juice: Performance in diesel engine and preliminary economic study. *Bioresource Technology*, v. 223, p. 259–268, 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852416314614>>.

SPANOVA, Miroslava *et al.* Influence of squalene on lipid particle/droplet and membrane organization in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1821, n. 4, p. 647–653, abr. 2012.

STOEBEL, Daniel M *et al.* Compensatory Evolution of Gene Regulation in Response to Stress by *Escherichia coli* Lacking RpoS. *PLOS Genetics*, v. 5, n. 10, p. e1000671, 2 out. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000671>>.

STOUTHAMER, A H. The search for correlation between theoretical and experimental growth

- yields. *Quayle, J R (Ed ) International Review Of Biochemistry, Vol*, v. 21 Micr, n. Ed, p. Baltimore, Md , Usa Illus P1-48, 1 jan. 1979. Disponível em: <<https://eurekamag.com/research/029/418/029418933.php>>.
- SUN, Shao-Ni *et al.* Structural characterization of residual hemicelluloses from hydrothermal pretreated Eucalyptus fiber. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 69, p. 158–164, 1 ago. 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014181301400333X>>. Acesso em: 26 maio 2019.
- TEHLIVETS, Oksana; SCHEURINGER, Kim; KOHLWEIN, Sepp D. Fatty acid synthesis and elongation in yeast. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1771, n. 3, p. 255–270, mar. 2007.
- THIELE, Jurgen H; CHARTRAIN, M; ZEIKUS, J Gregory. Control of Interspecies Electron Flow during Anaerobic Digestion: Role of Floc Formation in Syntrophic Methanogenesis. *Applied and environmental microbiology*, v. 54, n. 1, p. 10–19, jan. 1988.
- TSIGIE, Yeshitila Asteraye *et al.* Lipid production from *Yarrowia lipolytica* Po1g grown in sugarcane bagasse hydrolysate. *Bioresource technology*, v. 102, n. 19, p. 9216–9222, out. 2011.
- TSIGIE, Yeshitila Asteraye *et al.* Oil Production from *Yarrowia lipolytica* Po1g Using Rice Bran Hydrolysate. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2012, p. 1–10, 2012. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2012/378384/>>.
- UNGUREANU, Camelia *et al.* Enhancing antimicrobial activity of TiO<sub>2</sub>/Ti by torularhodin bioinspired surface modification. *Bioelectrochemistry*, v. 107, p. 14–24, 2016.
- UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. *Dados de moagem de cana-de-açúcar e produção de etanol*. . São Paulo: [s.n.], 2018. Disponível em: <<http://unicadata.com.br/>>.
- VAN DER POL, Edwin C *et al.* By-products resulting from lignocellulose pretreatment and their inhibitory effect on fermentations for (bio)chemicals and fuels. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 98, n. 23, p. 9579–9593, dez. 2014.
- VANHOLME, Ruben *et al.* Lignin biosynthesis and structure. *Plant physiology*, v. 153, n. 3, p. 895–905, jul. 2010.
- VEERAMALINI, J.B. *et al.* Continuous production of biohydrogen from brewery effluent using co-culture of mutated *Rhodobacter* M 19 and *Enterobacter aerogenes*. *Bioresource Technology*, v. 286, p. 121402, 1 ago. 2019a. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852419306327>>. Acesso em: 20 nov. 2019.
- VERDUYN, Cornelis *et al.* A theoretical evaluation of growth yields of yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 59, n. 1, p. 49–63, 1991. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/BF00582119>>.

- VILA, C. *et al.* Extracting value from Eucalyptus wood before kraft pulping: Effects of hemicelluloses solubilization on pulp properties. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 8, p. 5251–5254, 1 abr. 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852411001878>>. Acesso em: 27 mar. 2019.
- VISHTAL, Alexey Grigorievich; KRASLAWSKI, Andrzej. Challenges in industrial applications of technical lignins. *BioResources; Vol 6, No 3 (2011)*, 6 jun. 2011. Disponível em: <[https://ojs.cnr.ncsu.edu/index.php/BioRes/article/view/BioRes\\_06\\_3\\_c\\_Vishtal\\_K\\_Challenges\\_Indus\\_Appl\\_Technical\\_Lignins](https://ojs.cnr.ncsu.edu/index.php/BioRes/article/view/BioRes_06_3_c_Vishtal_K_Challenges_Indus_Appl_Technical_Lignins)>.
- WANG, Yanan *et al.* Overexpression of Delta12-Fatty Acid Desaturase in the Oleaginous Yeast *Rhodospiridium toruloides* for Production of Linoleic Acid-Rich Lipids. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 180, n. 8, p. 1497–1507, dez. 2016.
- WANG, Zhi *et al.* Furfural wastewater pretreatment of corn stalk for whole slurry anaerobic co-digestion to improve methane production. *Science of The Total Environment*, v. 674, p. 49–57, 15 jul. 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969719316821>>. Acesso em: 20 nov. 2019.
- WEBER, Roland W.S.; ANKE, Heidrun; DAVOLI, Paolo. Simple method for the extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of carotenoid pigments from red yeasts (*Basidiomycota*, Fungi). *Journal of Chromatography A*, v. 1145, n. 1–2, p. 118–122, 23 mar. 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967307000969>>. Acesso em: 20 set. 2018.
- WIEBE, Marilyn G *et al.* Lipid production in batch and fed-batch cultures of *Rhodospiridium toruloides* from 5 and 6 carbon carbohydrates. v. 12, n. 1, p. 26, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1472-6750-12-26>>.
- WU, S. *et al.* Microbial lipid production by *Rhodospiridium toruloides* under sulfate-limited conditions. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 2, p. 1803–1807, 2011.
- WU, Siguo *et al.* Phosphate-limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 15, p. 6124–6129, 1 ago. 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852410004578>>. Acesso em: 9 nov. 2019.
- WYNN, J P *et al.* Biochemical events leading to the diversion of carbon into storage lipids in the oleaginous fungi *Mucor circinelloides* and *Mortierella alpina*. *Microbiology (Reading, England)*, v. 147, n. Pt 10, p. 2857–2864, out. 2001.
- XAVIER, M.C.A. *et al.* Lipid production from hemicellulose hydrolysate and acetic acid by *Lipomyces starkeyi* and the ability of yeast to metabolize inhibitors. *Biochemical Engineering Journal*, v. 118, p. 11–19, 15 fev. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X16303138>>. Acesso em: 20 out. 2019.

- XU, Jingyang; LIU, Dehua. Exploitation of genus *Rhodospiridium* for microbial lipid production. *World journal of microbiology & biotechnology*, v. 33, n. 3, p. 54, mar. 2017.
- YANG, Bin; WYMAN, Charles E. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, v. 2, n. 1, p. 26–40, 1 jan. 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/bbb.49>>.
- YOO, Chang Geun *et al.* The critical role of lignin in lignocellulosic biomass conversion and recent pretreatment strategies: A comprehensive review. *Bioresource Technology*, v. 301, p. 122784, 1 abr. 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852420300535#b0035>>. Acesso em: 26 fev. 2020.
- YU, Xiaochen *et al.* Oil production by oleaginous yeasts using the hydrolysate from pretreatment of wheat straw with dilute sulfuric acid. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 10, p. 6134–6140, 1 maio 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852411002872>>. Acesso em: 8 dez. 2019.
- ZHAN, Jumei *et al.* Potential utilization of waste sweetpotato vines hydrolysate as a new source for single cell oils production by *Trichosporon fermentans*. *Bioresource technology*, v. 135, p. 622–629, maio 2013.
- ZHANG, Jinming *et al.* Effects of lignin-derived phenolic compounds on xylitol production and key enzyme activities by a xylose utilizing yeast *Candida athensensis* SB18. *Bioresource Technology*, v. 121, p. 369–378, 1 out. 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096085241201067X>>. Acesso em: 12 nov. 2019.
- ZHANG, Zhiping; ZHANG, Xu; TAN, Tianwei. Bioresource Technology Lipid and carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* under irradiation / high-temperature and dark / low-temperature cultivation. *Bioresource Technology*, v. 157, p. 149–153, 2014.
- ZHENG, Yubin *et al.* Oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* for biofuel production: Ammonia's effect. *Biomass and Bioenergy*, v. 37, p. 114–121, 1 fev. 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953411006416>>. Acesso em: 27 ago. 2019.
- ZHU, L Y; ZONG, Meihan; WU, Hong. Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation. *Bioresource technology*, v. 99, p. 7881–7885, 1 dez. 2008.
- ZHU, Zhiwei *et al.* A multi-omic map of the lipid-producing yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Nature communications*, v. 3, p. 1112, 2012.
- ZUMDAHL, Steve S.; ZUMDAHL, Susan A. *Chemistry*. 7. ed. Boston: Houghton Mifflin Company, 2007.