

PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS POR *Yarrowia lipolytica* EM
BIORREATOR ASSISTIDO POR CAMPO MAGNÉTICO

NATHÁLIA FERREIRA DOS SANTOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2022

PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS POR *Yarrowia lipolytica* EM
BIORREATOR ASSISTIDO POR CAMPO MAGNÉTICO

NATHÁLIA FERREIRA DOS SANTOS

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal”

Orientador: Prof. Victor Haber Perez

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2022

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

S237

Santos, Nathália Ferreira dos.

PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS POR *Yarrowia lipolytica* EM BIORREATOR ASSISTIDO POR CAMPO MAGNÉTICO / Nathália Ferreira dos Santos. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2022.

84 f. : il.

Bibliografia: 59 - 66.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2022.

Orientador: Victor Haber Perez.

1. Lipídios. 2. Single Cell Oil. 3. Bioprocesso. 4. Microrganismo. 5. Campo magnético. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS POR *Yarrowia lipolytica* EM
BIORREATOR ASSISTIDO POR CAMPO MAGNÉTICO

NATHÁLIA FERREIRA DOS SANTOS

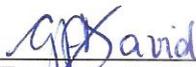
“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal”

Aprovada em 10 de fevereiro de 2022

Comissão Examinadora:



Antônio Jesus Dorighetto Cogo (D.Sc., Biotecnologia) – UENF



Geraldo Ferreira David (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF



Prof. Luís Guilherme Mansor Basso (D.Sc., Física) – USP



Prof. Victor Haber Perez (D.Sc., Engenharia Química) – UNICAMP
Orientador

SUMÁRIO

RESUMO	iv
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Microrganismos oleaginosos	3
2.2. <i>Yarrowia lipolytica</i>	8
2.3 Produção de lipídios por <i>Y. lipolytica</i>	10
2.4 Estratégias para maximizar a produção de lipídios	13
2.5 Aplicação de campo magnético na produção de lipídios.....	14
2.5.1 Sistemas de fermentação assistidos por campo magnético	14
2.5.2 Aplicações em processos de fermentação para produção de lipídios...	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1. Materiais	22
3.2 Seleção do microrganismo	22
3.3 Métodos experimentais.....	23
3.3.1 Preparo do inóculo	23
3.3.2 Crescimento celular de <i>Y. lipolytica</i> em <i>shaker</i>	23
3.3.3 Crescimento celular em biorreator assistido por campo magnético	23
3.4 Métodos analíticos.....	26
3.4.1. Concentração celular	26
3.4.2. Quantificação do consumo do substrato	26

3.4.3. Monitoramento do pH.....	27
3.4.4. Análise morfológica da célula	27
3.4.5. Extração de lipídios.....	27
3.4.6. Determinação da composição dos ácidos graxos dos lipídios totais....	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 Seleção da cepa de <i>Y. lipolytica</i>	30
4.2 Cultura da <i>Y. lipolytica</i> em <i>shaker</i> usando glicerol como fonte de carbono.	31
4.2.1 Cinética de crescimento.....	31
4.2.2 Avaliação da extração de lipídios.....	32
4.2.3 Avaliação do perfil dos ácidos graxos do lipídio produzido pela <i>Y. lipolytica</i> em <i>shaker</i>	34
4.3 Cultura da <i>Y. lipolytica</i> em fermentador assistido por campo magnético	36
4.3.1 Morfologia	36
4.3.2 Cinética de crescimento.....	38
4.3.3 Produção de lipídios.....	44
4.3.4 Composição dos ácidos graxos	47
4.3.5 Monitoramento da temperatura das bobinas.....	50
5. RESUMO E CONCLUSÕES	57
6. RECOMENDAÇÕES.....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
APÊNDICE.....	67

RESUMO

dos SANTOS, F. N.; Msc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Fevereiro de 2022; PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS POR *Yarrowia lipolytica* EM BIORREATOR ASSISTIDO POR CAMPO MAGNÉTICO; Orientador: Prof. D.Sc. Victor Haber Perez.

Yarrowia lipolytica é uma levedura que possui múltiplas aplicações industriais e biotecnológicas, pois através dela é possível obter diferentes produtos, tais como ácidos orgânicos, lipases, proteases, lipídios, entre outros. Os lipídios microbianos têm sido considerados uma matéria-prima alternativa para a geração de biodiesel e, com isso, despertou-se o interesse em realizar estudos para maximizar a produção deste metabólito. Dado que a aplicação de campo magnético pode estimular a produção de metabólitos de interesse industrial em microrganismos, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a produção de lipídios por *Y. lipolytica* sob campo magnético de baixa frequência e intensidade. Para isto, foram monitorados a formação do produto, a cinética de crescimento celular, consumo de substrato, assim como, o pH do meio de cultura durante o cultivo da levedura *Y. lipolytica* sob a exposição de campo magnético com diferentes configurações. As culturas microbianas foram conduzidas em biorreator assistido por campo magnético com intensidades de 3, 6 e 9 kA/m e em diferentes configurações de exposição ao campo: a) biorreator exposto ao campo; b) biorreator com reciclo externo em formato de U exposto ao campo; c) biorreator com reciclo externo em formato de espiral exposto ao campo. Foram monitoradas duas variáveis respostas: a

cinética de crescimento e a produção de lipídios. Além disso, foi determinada a composição de ácidos graxos do lipídio microbiano extraído. De acordo com os resultados experimentais foi possível verificar que a introdução do reciclo ao sistema de cultivo em biorreator impôs uma restrição na performance de crescimento da levedura, entretanto, causou um aumento de 36,4 % na produção de lipídios em relação à cultura em biorreator sem reciclo. Além disso, o campo magnético de 3 e 9 kA/m exposto às culturas em biorreator causou um efeito negativo no crescimento celular em relação ao controle. Similarmente aconteceu na cultura em biorreator com reciclo em espiral exposto ao campo de 6 kA/m. Apesar disso, a cultura em biorreator exposta ao campo magnético de 9 kA/m obteve um aumento de 29,2 % na produção de lipídios em relação ao controle. Por outro lado, o campo magnético de 3 kA/m exposto à cultura em biorreator com reciclo em U causou um efeito positivo no crescimento celular em relação ao seu respectivo controle. Contudo, ocorreu uma diminuição no crescimento quando o campo magnético de 9 kA/m foi exposto à cultura em biorreator com reciclo em U. Sendo assim, as condições que favoreceram o crescimento celular foram diferentes das que contribuíram para a produção de lipídios. Neste contexto, embora trate-se de resultados preliminares, este estudo aponta o potencial da aplicação de campos magnéticos em sistemas biológicos de importância industrial.

ABSTRACT

dos SANTOS, F. N.; Msc.; State University of Northern of Rio de Janeiro; February 2022; LIPIDS PRODUCTION OF *Yarrowia lipolytica* IN A MAGNETIC FIELD ASSISTED BIOREACTOR; Advisor: D.Sc. Victor Haber Perez.

Yarrowia lipolytica is a yeast that has multiple industrial and biotechnological applications, because through it is possible to obtain different products, such as organic acids, lipases, proteases, lipids, among others. Microbial lipids have been considered an alternative feedstock for the generation of biodiesel and, therefore, the interest in carrying out studies to maximize the production of this metabolite has been aroused. Since the application of a magnetic field can stimulate the production of metabolites of industrial interest in microorganisms, the objective of the present work was to evaluate the production of lipids by *Y. lipolytica* under a magnetic field of low frequency and intensity. For this, product formation, cell growth kinetics, substrate consumption, as well as the pH of the culture medium during the cultivation of the yeast *Y. lipolytica* under magnetic field exposure with different configurations were monitored. Microbial cultures were carried out in a bioreactor assisted by a magnetic field with intensities of 3, 6 and 9 kA/m and in different configurations of exposure to the field: a) bioreactor exposed to the field; b) bioreactor with external recycle in U-shaped exposed to the field; c) bioreactor with external recycle in spiral exposed to the field. Two response variables were monitored: growth kinetics and lipid production. In addition, the fatty acid composition of the extracted microbial lipid was determined. According to the

experimental results, it was possible to verify that the introduction of the recycle to the culture system in bioreactor imposed a restriction on the growth performance of the yeast, however, it caused an increase of 36.4% in the production of lipids in relation to the culture in a bioreactor without recycle. In addition, the magnetic field of 3 and 9 kA/m exposed to bioreactor cultures caused a negative effect on cell growth compared to the control. It similarly happened in the bioreactor culture with recycle in spiral exposed to the 6 kA/m field. Despite this, the culture in a bioreactor exposed to a magnetic field of 9 kA/m obtained a 29.2% increase in lipid production compared to the control. On the other hand, the magnetic field of 3 kA/m exposed to the culture bioreactor with recycle in U-shaped had a positive effect on cell growth in relation to its respective control. However, there was a decrease in growth when the magnetic field of 9 kA/m was exposed to culture in bioreactor with recycle U-shaped. Thus, the conditions that favored cell growth were different from those that contributed to the production of lipids. In this context, although these are preliminary results, this study points out the potential of applying magnetic fields in biological systems of industrial importance.

1. INTRODUÇÃO

A crescente busca por matérias-primas renováveis e que não competem com a indústria alimentícia para geração de biocombustíveis como o biodiesel, despertou o interesse pelos lipídios produzidos por microrganismos oleaginosos, também conhecidos como *single cell oils* (SCO) (Beopoulos *et al.*, 2009^b).

Dentre as leveduras oleaginosas encontra-se a *Yarrowia lipolytica*, que em comparação com outras espécies oleaginosas acumula lipídios em níveis mais baixos, porém com alto teor de ácido graxo C16 e ácidos graxos insaturados C18, sendo a composição de ácidos graxos semelhante aos óleos de soja e milho (Zhu e Jackson, 2015).

Com isso, estudos direcionados a maximizar a produção de lipídios por *Y. lipolytica* têm sido realizados. Dentre eles, destacam-se os estudos que utilizam como estratégias a engenharia metabólica (Lazar *et al.*, 2018) e o estresse ambiental à célula (Sestric *et al.*, 2014).

Recentemente, resultados promissores têm sido obtidos através do emprego de campos magnéticos, como estresse físico, integrado a processos convencionais em muitas áreas como engenharia química, tecnologia de alimentos, agricultura e, inclusive, na biotecnologia (Benavente-Valdés *et al.*, 2016). Todavia, ainda são poucos os trabalhos sobre a aplicação de campo magnético em processos biotecnológicos sobre a produção de lipídios por microrganismos. Dentre eles, os estudos sobre alterações no crescimento celular e na produção de lipídios por microalgas como efeitos do campo magnético têm

se destacado (Costa *et al.*, 2020; Chu *et al.*, 2020; Feng *et al.*, 2020; Bauer *et al.*, 2017).

Dessa forma, o presente trabalho visou avaliar o efeito da exposição do campo magnético de intensidade e frequência extremamente baixa às culturas de *Y. lipolytica*, levando em consideração o crescimento celular, consumo de substrato, produção de lipídios e composição de ácidos graxos. Para isto, foram utilizadas diferentes intensidades de campo magnético (3, 6 e 9 kA/m) e configurações do biorreator (biorreator sem reciclo e biorreator com reciclo em formato de U e com formato de espiral).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Microrganismos oleaginosos

Os microrganismos considerados oleaginosos possuem a capacidade de acumular acima de 20 % de lipídios em sua biomassa. Também podem ser denominados como *Single Cell Oils* (SCO). SCO são os óleos produzidos por microrganismos, que possuem composição de ácidos graxos semelhante aos óleos e gorduras de plantas oleaginosas ou de fonte animal (Tabela 1) (Beopoulos *et al.*, 2009^b).

Estes microrganismos podem ser bactérias, leveduras, fungos filamentosos e microalgas. Os microrganismos oleaginosos mais conhecidos são *Rhodococcus* sp., *Chlorella pyrenoidosa*, *Nannochloropsis oceânica*, *Rhodotorula glutinis*, *Lipomyces kononenkoae*, *Yarrowia lipolytica*, entre outros (Tabela 1).

Os lipídios produzidos por microrganismos oleaginosos possuem um grande potencial biotecnológico, dependendo da sua composição de ácidos graxos podem ser utilizados para produção de nutracêuticos, como também podem ser uma promissora alternativa de matéria-prima renovável para produção de biodiesel considerado de terceira geração pela indústria de biocombustíveis (Patel *et al.*, 2020; Leong *et al.*, 2018).

Tabela 1- Porcentagem da composição de ácidos graxos de lipídios produzidos por diferentes microrganismos oleaginosos

Microrganismo	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:5	C24:0	Outros	Conteúdo lipídico	Ref.
<i>Rhodococcus</i> sp. YHY01	12,95	21,48	61,68	2,35	0,05	-	-	-	-	-	-	Bhatia <i>et al.</i> , 2021
<i>Serratia</i> sp. ISTD04	-	59,55	2,66	22,03	5,99	-	-	-	0,77	-	66,70	Kumar e Thakur, 2018
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> NCIM 2738	-	18,81	0,95	6,47	1,98	13,22	39,78	-	-	-	30,76	Rana e Prajapati, 2021
<i>Dunaliella parva</i>	-	30,8	-	-	-	11,9	27,8	10,6	-	18,67	25,62	Fawzy e Alharthi, 2021
<i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i>	-	25,4	2,6	8,3	27,2	13,4	14,5	-	-	5,4	42,65	Atmanli <i>et al.</i> , 2020
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	-	21,3	4,2	2,8	23,4	5,8	24,3	-	-	12,6	15,87	
<i>Nannochloropsis oceanica</i> FJ-1	4,53	31,08	30,48	1,45	8,65	0,51	1,1	16,19	-	4,21	-	He <i>et al.</i> , 2020
<i>Rhodotorula glutinis</i> T13	1,91	24,52	1,89	8,69	37,6	18,84	3,58	-	-	1,29	40	Maza <i>et al.</i> , 2021
<i>Lipomyces kononenkoae</i> BF1S57	1,4	41,4	7,5	7,8	37,9	1,5	-	-	-	-	60,06	Chen <i>et al.</i> , 2020
<i>Sarocladium kiliense</i> ADH17	-	35,134	2,358	5,936	51,089	-	4,611	-	-	-	-	Nouri <i>et al.</i> , 2019
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	1,0	21,5	0,7	4,6	62,1	7,6	0,7	-	0,7	-	45	Soccol <i>et al.</i> , 2017
<i>Yarrowia lipolytica</i> Po1g	-	17,76	14,12	4,39	55,55	-	-	-	-	8,27	58,5	Tsigie <i>et al.</i> , 2011

Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), como a família Ω -6, incluindo ácido linoleico (LA), ácido γ -linolênico (ABL) e ácido araquidônico (ARA), bem como a família Ω -3, incluindo ácido α -linolênico (ALA), ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosaexaenoico (DHA), apresentam mais de uma ligação dupla na cadeia de carbono (Barta *et al.*, 2021). Esta característica torna-os altamente suscetíveis à auto-oxidação, que para a produção de biodiesel é uma propriedade indesejada, pois causa odor desagradável e inadequação do armazenamento do biocombustível em logo prazo (Patel *et al.*, 2020; Bharathiraja *et al.*, 2017).

Por outro lado, os Ω -6 e Ω -3 apresentam benefícios à saúde humana e papéis importantes em atividades metabólicas e imunológica. Dessa forma, os microrganismos produtores de alto teor de PUFA podem ser utilizados para fins nutracêuticos, visto que os seres humanos não são capazes de sintetizar estes ácidos graxos devido à falta de algumas dessaturases e elongases (Patel *et al.*, 2020). Portanto, estes são adquiridos através da ingestão de alguns alimentos, como o peixe, ou através da suplementação alimentar (Patel *et al.*, 2020).

Já os microrganismos produtores de alto teor de ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) podem ser utilizados como matéria-prima para a produção de biodiesel considerado de terceira geração. Dado que, o biodiesel de primeira geração apresenta como principal limitação o uso da matéria-prima que compete com a indústria de alimentos (Patel *et al.*, 2020). Sendo assim, o biodiesel de terceira geração é uma promissora alternativa para contornar essa limitação. Além disso, há outras vantagens, como a facilidade do cultivo do microrganismo em um ambiente controlado e a não dependência das condições climáticas, não possui conflito com o uso de solo e apresenta maior tendência de crescimento e produtividade da biomassa. Entretanto, a alta demanda de biomassa e alto custo para produção em larga escala são fatores limitantes para geração deste biocombustível (Leong *et al.*, 2018).

A estimativa da qualidade do biodiesel produzido por microrganismos através da avaliação das propriedades físicas, como o número de cetano (CN), índice de iodo (IV), índice de acidez (AV), estabilidade oxidativa (OS), viscosidade cinemática (KV); densidade (ρ), foi satisfatória às especificações da Biodiesel Europeu EN 14214 e/ou Padrões American ASTM D6751 (Tabela 2). Reforçando que o óleo microbiano é uma potencial fonte de matéria-prima alternativa para a produção de biodiesel.

Tabela 2- Predição das propriedades físicas do biodiesel produzido por lipídio microbiano

Microrganismo	CN	IV (g I ₂ 100/g)	AV (mg KOH/g)	SV (mgKOH)	FP (°C)	CP (°C)	CFPP (°C)	HHV (MJ/kg)	OS a 110 °C (h)	KV a 40 °C (mm ² /s)	ρ (g/cm ³)	SG	Ref.
ASTM D6751	≥ 47	-	≤ 0,5	-	-	-	-	-	3,0	1,9-6,0	-	-	Chen et al., 2012
EN 14214	≥ 51	≤ 120	≤ 0,5	-	-	-	-	-	6,0	3,5-5,0	0,86-0,90	-	
<i>Rhodococcus sp.</i> YHY01	56,5	63,7	-	-	-	-	-9,6	38,9	-	3,26	0,87	-	Bhatia et al., 2021
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MF 510169	-	115	-	-	151	-	-	-	-	2,57	-	0,88	Kanakdande et al., 2021
<i>Bacillus cereus</i> MF 908505	-	115±3	0,67	-	105	5	-	-	-	4,6±0,2	0,88	0,89	Kanakdande et al., 2020
<i>Serratia</i> sp. ISTD04	56	-	0,30	-	-	-10	-	45,79	-	2,13	-	-	Kumar e Thakur, 2018
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> NCIM 2738	48,19	135,54	-	168,54	-	4,90	-0,41	40,49	4,82	4,92	0,73	-	Rana e Prajapati, 2021
<i>Dunaliella parva</i>	40,2	146,1	-	204,1	-	11,2	0,99	39,3	3,48	3,6	0,88	-	Fawzy Alharthi, 2021
<i>Nannochloropsis oceanica</i> FJ-1	53,34	119,06	-	-	-	0,89	-	-	-	4,30	-	0,88	He et al., 2020

Tabela 2, Cont.

Microrganismo	CN	IV (g I ₂ 100/g)	AV (mg KOH/g)	SV (mgKOH)	FP (°C)	CP (°C)	CFPP (°C)	HHV (MJ/kg)	OS a 110 °C (h)	KV a 40 °C (mm ² /s)	ρ (g/cm ³)	SG	Ref.
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	48,4	-	-	-	-	-	-	-	-	5,38	0,910	-	Atmanli <i>et al.</i> , 2020
<i>Isochrysis galbana</i> aff.	52,7	-	-	-	-	-	-	-	-	4,20	0,872	-	Atmanli <i>et al.</i> , 2020
<i>Rhodotorula glutinis</i> T13	55,62	79,62	-	200,44	-	-	4,88	38,53	7851	3,71	0,855	-	Maza <i>et al.</i> , 2021
<i>Sarocladium kiliense</i> ADH17	57,939	60,915	-	215,349	-	13,488	3,886	40,595	28,166	-	0,9	-	Nouri <i>et al.</i> , 2019
<i>Lipomyces kononenkoae</i> BF1S57	59,65	48,67	-	-	-	13,53	-	39,385	-	4,90	-	0,8752	Chen <i>et al.</i> , 2020
<i>Rhodospiridium toruloides</i> DEBB 553	-	61,7	0,28	-	172,0	-	-	-	8,3	5,24	-	-	Soccol <i>et al.</i> , 2017
<i>Yarrowia lipolytica</i> 20460	58,1	78,0	-	185,8	-	-	1,1	-	-	-	-	-	Munch <i>et al.</i> , 2015

CN, número de cetano; IV, índice de iodo; AV, índice de acidez; SV, índice de saponificação; FP, flash point; CP, cloud point; CFPP, ponto de obstrução do filtro a frio; HHV, maior valor de aquecimento; OS, estabilidade oxidativa; KV, viscosidade cinemática; ρ , densidade; SG, gravidade específica.

Dentre os microrganismos oleaginosos, as leveduras possuem algumas vantagens em relação às microalgas, pois a composição de ácidos graxos do lipídio produzido pelas microalgas apresenta teores altos de PUFA, o que torna esses lipídios inapropriados como matéria-prima para produção de biodiesel (Tabela 1). Além disso, o cultivo das microalgas necessita de fotobiorreatores apropriados, requer grandes áreas e apresenta um longo período de crescimento, o que levanta questões técnicas e econômicas (Singh *et al.*, 2021; Barbanera *et al.*, 2021)

Por outro lado, as leveduras têm a taxa de crescimento rápida, requerendo menor tempo de processamento. Apresentam a composição de ácidos graxos semelhante aos óleos vegetais, contendo alto teor de C16 (ácido palmítico e ácido palmitoleico) e C18 (ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico) (Tabela 1). Portanto, podem ser consideradas uma boa candidata a serem utilizadas como matéria-prima para produção de biodiesel (Barbanera *et al.*, 2021).

2.2. *Yarrowia lipolytica*

Yarrowia lipolytica é uma levedura estritamente aeróbica pertencente ao filo Ascomycota, considerada não convencional. Porém, nos anos 60 despertou-se a atenção para essa levedura, sendo realizados estudos acerca da sua fisiologia, genética, biologia molecular e aplicação biotecnológica (Barth e Gaillardin, 1997). A princípio, o interesse em estudá-la se deu devido ao seu potencial de metabolizar hidrocarbonetos como a parafina, que era abundante naquela época, e a partir dessa fonte de carbono produzir *single cell protein* (SCP) e ácidos orgânicos (Spencer *et al.*, 2002; Barth e Gaillardin, 1997). Isso levou-a a ser uma das dez leveduras não convencionais mais bem estudadas atualmente (Spencer *et al.*, 2002).

Além de poder utilizar a parafina como fonte de carbono, a *Y. lipolytica* possui a capacidade de assimilar glicose, frutose, glicerol, álcool, acetato, assim como substratos hidrofóbicos (Zhao *et al.*, 2015), pois, lipases e emulsificadores extracelulares são secretados pela célula para que ocorra a hidrólise do substrato hidrofóbico do meio (Beopoulos *et al.*, 2009^a). Portanto, essa levedura é isolada principalmente de ambientes ricos em substratos hidrofóbicos e de alimentos lácteos (Bellou *et al.*, 2014).

Quando há a presença de duas fontes de carbono no meio de cultura, a *Y. lipolytica* pode apresentar o comportamento diaúxico na sua cinética de crescimento. Ou seja, ela consome preferencialmente uma fonte de carbono e reprime o outro substrato, que por sua vez só será consumido quando ocorrer o esgotamento do substrato preferencial (Lazar *et al.*, 2011). Já nos casos em que a levedura está sob condição de estresse no meio de cultura, pode apresentar comportamento dimórfico, exibindo a morfologia de levedura, pseudo-hifa e hifa (Figura 1) (Bellou *et al.*, 2014).



Figura 1- Comportamento dimórfico da levedura *Y. lipolytica*. (a) células leveduriformes; (b) células leveduriformes e pseudo-hifas; (c) células leveduriformes e hifas verdadeiras. (Fonte: Bellou *et al.*, 2014).

Y. lipolytica é uma levedura não patogênica, classificada pela *American Food and Drug Administration* (FDA) como *Generally Regarded As Safe* (GRAS) para produção de ácido cítrico (Fickers *et al.*, 2005). Possui relevância biotecnológica em consequência da capacidade de converter a fonte de carbono em outros produtos de interesse industrial além do ácido cítrico, sendo estes: ácidos orgânicos como o ácido pirúvico; biosurfactantes; γ -decalactona; lipases; proteases; proteínas (SCP); lipídios (SCO), ácidos graxos essenciais, entre outros (Bellou *et al.*, 2014; Bankar *et al.*, 2009; Barth e Gaillardin, 1997).

É classificada também como um microrganismo oleaginoso, o que significa que é capaz de acumular lipídios acima de 20% de sua biomassa na forma de triacilgliceróis e de esteróis, mas principalmente na forma de triacilgliceróis (>90%). Estes ficam armazenados em uma organela, o corpo lipídico, onde os lipídios neutros são envolvidos por uma monocamada de

fosfolipídios com proteínas especializadas incorporadas (Figura 2). Essas proteínas podem estar envolvidas no tráfico do lipídio entre o citoplasma e o corpo lipídico, como também na biossíntese e degradação de lipídios (Beopoulos *et al.*, 2009^b).

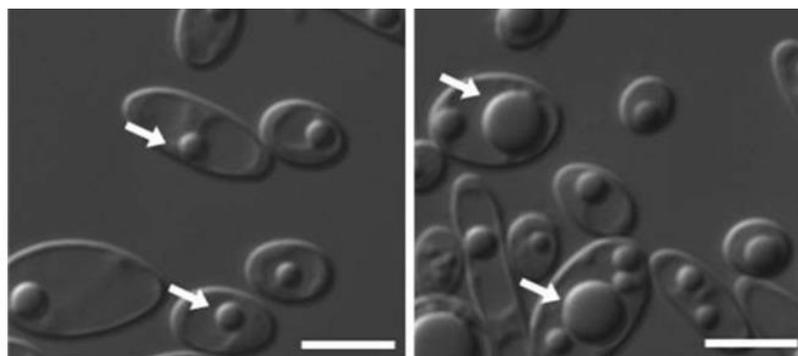


Figura 2- Microscopia óptica de imersão dos corpos lipídicos (LBs) formados por *Y. lipolytica*. Setas brancas indicam os corpos lipídicos contendo lipídios de armazenamento. Barra branca indica 5 μ m. (Fonte: Gajdoš *et al.*, 2015).

2.3 Produção de lipídios por *Y. lipolytica*

Y. lipolytica pode acumular triacilglicerol (TAG) por meio de duas vias: (i) via *de novo*, que em culturas sob condições definidas ocorre o armazenamento de lipídios por intermédio dos precursores acetil-CoA e malonil-CoA na via de biossíntese de lipídios (via Kennedy); (ii) via *ex novo*, que em culturas contendo substrato hidrofóbico ocorre a hidrólise deste no meio extracelular através de lipases e emulsificadores extracelulares que são secretados pela célula e posteriormente a sua incorporação dentro da célula, a remontagem do triacilglicerol e a acumulação no corpo lipídico (Figura 3) (Beopoulos *et al.*, 2009^b).

O ácido cítrico formado na primeira reação do ciclo de Krebs na mitocôndria pode ser transportado pelo trocador malato:citrato para fora da organela, onde é clivado em acetil-CoA e oxaloacetato pela enzima ATP-citrato liase. O oxaloacetato irá se transformar em malato através da enzima malato desidrogenase, podendo ser transportado novamente para a mitocôndria. Já o acetil-CoA dá início à síntese de ácidos graxos pela via *de novo*, em que é transformado em malonil-CoA pela ação da enzima acetil-CoA carboxilase com

gasto de ATP (Zhu e Jackson, 2015). Então, acetil-CoA é utilizado como molécula iniciadora e malonil-CoA como molécula alongadora adicionando dois carbonos ao esqueleto de ácidos graxos por meio do complexo enzimático de síntese de ácidos graxos (FAS) (Ledesma-Amaro e Nicaud, 2015).

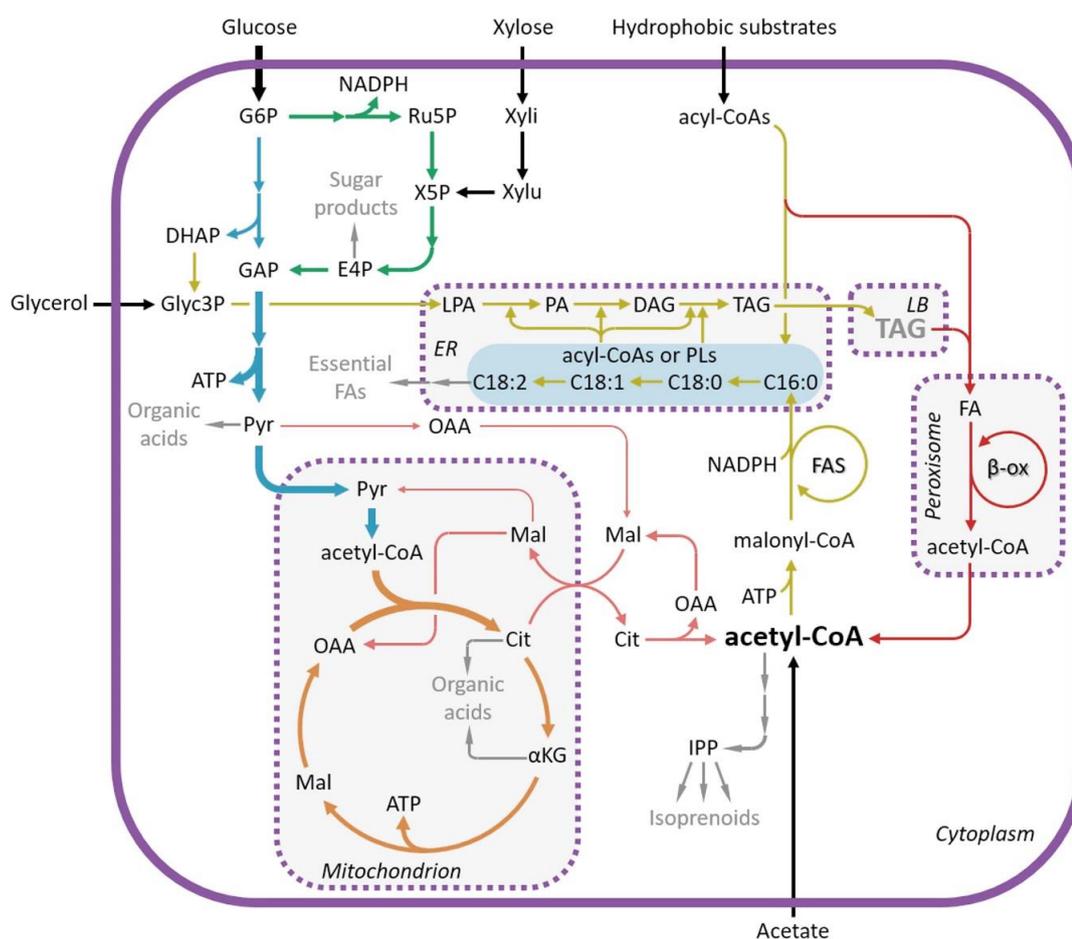


Figura 3- Visão geral das vias metabólicas de síntese de lipídios por *Yarrowia lipolytica*. Setas de diferentes cores são usadas para representar diferentes vias metabólicas: azul, glicólise; verde, via das pentoses fosfato; laranja, TCA; vermelho claro, transporte de acetil-CoA; amarelo, vias de síntese de TAG; vermelho escuro, vias de degradação lipídica; preto, vias de assimilação de substrato; cinza, principais vias de síntese de produtos. (Fonte: Abdel-Mawgoud *et al.*, 2018).

Basicamente, as proteínas transportadoras de acila (ACPs) são acopladas na molécula de acetil-CoA e malonil-CoA através da enzima malonil/acetil-CoA-ACP-transacilase, para isso ocorre o desacoplamento da

Coenzima A. Em seguida, estas moléculas sofrem uma série de ciclos de reações até formar o ácido graxo (Lehninger *et al.*, 2014). A primeira delas é a reação de condensação, em que o malonil-ACP libera uma molécula de CO₂ por intermédio da enzima β -cetoacil-ACP-sintase, formando assim o β -cetoacil-ACP. A segunda reação é a de redução, onde ocorre a quebra da ligação dupla da molécula β -cetoacil-ACP com gasto de NADPH através da enzima β -cetoacil-ACP-redutase, formando assim o β -hidroxibutiril-ACP. A próxima reação é de desidratação, na qual o β -hidroxibutiril-ACP perde de uma molécula de H₂O através da enzima β -hidroxibutiril-ACP-desidratase, dando origem ao trans- Δ^2 -butenoil-ACP, que sofrerá uma reação de redução através da quebra da ligação dupla com gasto do NADPH pela enzima enoil-ACP-redutase, formando assim o butiril-ACP. Por fim, uma nova molécula de malonil-ACP é adicionada ao FAS, dando continuidade ao ciclo de reações. Portanto, para cada passo no alongamento da cadeia acil, são necessárias duas moléculas de NADPH (Lehninger *et al.*, 2014).

No retículo endoplasmático, os acils podem sofrer ação das dessaturases, que transformam os ácidos graxos saturados em insaturados, e das alongases, que são enzimas que adicionam dois carbonos aos ácidos graxos tanto saturado quanto insaturado (Lazar *et al.*, 2018; Ledesma-Amaro e Nicaud, 2015). Como também podem ser incorporados em TAG através da via de Kennedy e posteriormente armazenados em corpos lipídicos (LB) (Beopoulos *et al.*, 2009^b).

Para ocorrer a síntese do TAG é necessário o glicerol-3-fosfato e 3 ácidos graxos livres. O glicerol-3-fosfato (Glyc3P) pode ser produzido a partir do glicerol pela ação da enzima glicerol quinase, ou a partir de glicose pela enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase produzindo dihidroxiacetona (DHAP). O DHAP através da enzima gliceral-3-fosfato desidrogenase produz Glyc3P (Wang *et al.*, 2020; Beopoulos *et al.*, 2009^b).

O primeiro acil é adicionado na posição sn-1 do Glyc3P pela enzima glicerol-3-fosfato aciltransferase produzindo 1-acil-sn-glicerol-3-fosfato, que também pode ser chamado por ácido lisofosfatídico (LPA). O segundo acil é adicionado na posição sn-2 pela enzima 1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferase produzindo 1,2-diacil-sn-glicerol-3-fosfato, que também pode ser chamado por ácido fosfatídico (PA), que sofre uma reação de desfosforilação pela enzima fosfatidato de fosfatase produzindo 1,2-diacil-sn-glicerol (DAG). O terceiro acil pode ser adicionado na posição sn-3 do 1,2-diacil-sn-glicerol de três formas:

através da enzima diacilglicerol aciltransferase formando o TAG; através da enzima colesterol aciltransferase; ou pela via independente de acil-CoA (a partir de um glicerofosfolípido, GPL) pela enzima fosfolípido: diacilglicerol aciltransferase (Wang *et al.*, 2020; Beopoulos *et al.*, 2009^b).

2.4 Estratégias para maximizar a produção de lipídios

Devido a *Y. lipolytica* possuir seu genoma sequenciado (Dujon *et al.*, 2004) e por conter extensivos estudos acerca do metabolismo lipídico (Wang *et al.*, 2020; Abdel-Mawgoud *et al.*, 2018; Lazar *et al.*, 2018), a engenharia metabólica tem sido utilizada como estratégia para aumentar o acúmulo de lipídios pela levedura. Essa estratégia inclui a superexpressão de enzimas chave na biossíntese de lipídios, assim com a deleção de enzimas chave da via de degradação de lipídios, entre outras (Qiao *et al.*, 2015).

Contudo, a otimização do acúmulo de lipídios por *Y. lipolytica* também pode ser promovida por diferentes fatores ambientais do meio de cultura como o tipo de meio de cultivo (meio rico ou meio mínimo), fonte de carbono, relação de carbono/ nitrogênio (C/N), pH, concentração de oxigênio dissolvido (DOC), entre outros. Nesse sentido, diversos estudos têm utilizado como estratégia o estresse ambiental (Zhang *et al.*, 2019; Yun *et al.*, 2018; Kuttiraja *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2015; Bellou *et al.*, 2014; Sestric *et al.*, 2014), nos quais, pode-se observar que os maiores rendimentos de TAG foram obtidos em meio de cultura mínimo contendo glicerol como fonte de carbono em comparação a diferentes composições de meios de cultura (Yun *et al.*, 2018; Sestric *et al.*, 2014).

O meio mínimo possui maior relação de C/N comparado ao meio rico, ou seja, possui excesso na fonte de carbono e limitação na fonte de nitrogênio. Quando isso ocorre no meio de cultura, há uma maior produção dos intermediários do ciclo do TAG, tais como, citrato, isocitrato, α -cetoglutarato, piruvato (Beopoulos *et al.*, 2009^b), pois a escassez de nitrogênio no meio, através de uma série de eventos regulatórios em cascata, regula positivamente a via metabólica de produção de TAG. Um desses eventos regulatórios é o decréscimo da concentração de adenosina 3,5-monofosfato cíclico intracelular (AMPC), que por sua vez, regula negativamente o ciclo do Krebs através da inibição da isocitrato desidrogenase (IDH), ocorrendo um acúmulo de citrato na mitocôndria.

Diante disso, o excesso de citrato é transportado para o citosol (Kamineni e Shaw, 2020; Lazar *et al.*, 2018).

Portanto, a limitação de nitrogênio assim como a fonte de carbono é comumente usada para induzir o acúmulo de lipídios através da modulação do fluxo metabólico, em que ocorre o retardamento do crescimento da levedura pela limitação do nitrogênio e iniciação da fase de acumulação lipídica (Yun *et al.*, 2018; Beopoulos *et al.*, 2009^a).

Mais recentemente, tem sido utilizado o emprego de campos magnéticos como fator ambiental no meio de cultura em processos biotecnológicos (Benavente-Valdés *et al.*, 2016). Foi realizado pelo nosso grupo de pesquisa um estudo sobre a atividade da lipase intracelular produzida por *Y. lipolytica* sob diferentes sistemas de campo magnético. Foi possível obter um aumento de 30% na atividade da lipase intracelular utilizando o sistema de campo magnético com linhas transversais e reciclo da suspensão celular em formato de U (David *et al.*, 2016). Entretanto, ainda não foram realizados estudos acerca da produção de lipídios por *Y. lipolytica* sob campo magnético.

2.5 Aplicação de campo magnético na produção de lipídios

2.5.1 Sistemas de fermentação assistidos por campo magnético

O campo magnético é gerado por cargas móveis através de ímãs permanentes ou por correntes elétricas ligadas a um solenoide ou a bobinas de Helmholtz. Pode ser classificado como campo magnético constante, quando a densidade e a direção do campo magnético são constantes ao longo do tempo, ou como campo magnético oscilante, quando a densidade de fluxo magnético e a direção do campo magnético oscilam de acordo com a frequência e o tipo de onda magnética (Barbosa-Canova *et al.*, 2001). O campo magnético pode ser classificado também como homogêneo/ uniforme, quando a força magnética é constante no espaço ou como não homogêneo/ não uniforme, quando há diferença da força magnética entre o centro e as extremidades da bobina (Barbosa-Canova *et al.*, 2001).

O campo magnético estático é um tipo de campo magnético constante, que pode ser gerado com ímãs permanentes ou corrente elétrica direta (Barbosa-Canova *et al.*, 2001), enquanto o campo magnético alternado, pulsante, pulsado e rotativo são tipos de campos magnéticos oscilantes.

O campo magnético alternado é gerado por corrente elétrica alternada através de solenoide e bobinas de Helmholtz e o campo magnético pulsante é formado pela corrente elétrica pulsante através do solenoide e bobinas Helmholtz. Por outro lado, o campo magnético pulsado é gerado por um conjunto de capacitores que por uma fonte de alimentação produzem uma carga e descarga para as bobinas (Barbosa-Canovas *et al.*, 1998; Hofmann, 1985). Já o campo magnético rotativo é gerado pelo estator trifásico do motor de indução da gaiola de esquilo. Os enrolamentos trifásicos deste estator são deslocados um do outro em 120° , dessa forma, as polaridades do campo magnético são móveis, nas quais seus polos opostos giram em torno do ponto central (Konopacki e Rakoczy, 2019).

A corrente elétrica alternada gera um campo magnético alternado de mesma frequência, dado que esta corrente se alterna entre picos de tensão positiva e picos de tensão negativa passando pelo ponto de zero. Portanto, a direção do campo magnético irá mudar regularmente com o passar do tempo (Barbosa-Canovas *et al.*, 1998). Enquanto, a corrente elétrica pulsante gera uma frequência do campo magnético pulsante, essa corrente se eleva apenas para uma direção e depois diminui ao nível zero. Dessa forma, a densidade de fluxo magnético irá mudar com o passar do tempo, mas a sua direção será constante (Barbosa-Canovas *et al.*, 1998).

Já a frequência do campo pulsado é gerada pelo número de pulsos criados pelas descargas dos capacitores para as bobinas, podendo haver um intervalo de tempo entre cada pulso. Esta é determinada pela capacidade dos capacitores, a resistência e a indutância do circuito (Barbosa-Canovas *et al.*, 1998; Hofmann, 1987).

Essas frequências são mensuradas em Hertz (Hz) e classificadas como: frequência extremamente baixa na faixa menor que 300 Hz; baixa, média ou alta frequência entre 300 Hz a 30 MHz; frequência muito alta ou ultra alta entre 30 MHz a 300 MHz; frequência super alta de 300 MHz a 30 GHz (Hristov e Perez, 2011).

Quando o biorreator está operando em regime de ciclo e por sua vez este ciclo está exposto a um campo magnético há de se considerar uma frequência relativa determinada em virtude da velocidade do fluido. Neste caso, o meio de cultivo líquido irá percorrer uma distância sob efeito do campo magnético

e em seguida retornará ao biorreator mediante o auxílio da bomba peristáltica. Assim, será gerado uma exposição de frequência extremamente baixa ao campo magnético. Segundo a lei de Faraday, existe uma frequência relativa dependente do movimento do fluido e das linhas do campo magnético (Hristov e Perez, 2011). Essa frequência pode ser calculada através da velocidade e tamanho do reciclo. Portanto, se aumenta a velocidade do reciclo, maior será a frequência.

Essa configuração de campo magnético foi projetada visando à ampliação de escala dessa tecnologia não convencional, visto que seria necessário um campo magnético muito grande para recobrir os reatores de escala industrial. Já a aplicação do campo magnético apenas no reciclo, será requerido campo magnético menor, e como consequência será demandado menor custo de energia para esse tipo de processo (Alvarez *et al.*, 2006).

O reciclo do meio de cultivo pode apresentar formas diferentes, por exemplo, em formato de U, espiral, entre outros (Figura 4). Acredita-se que mudando o formato do reciclo, a cultura de microrganismos será estimulada pelo campo magnético de maneiras diferentes. Por exemplo, o reciclo em formato em U e em espiral, a cultura fica mais tempo exposta ao campo do que o reciclo com a configuração original (de Andrade *et al.*, 2021; David *et al.*, 2016; Alvarez *et al.*, 2006).

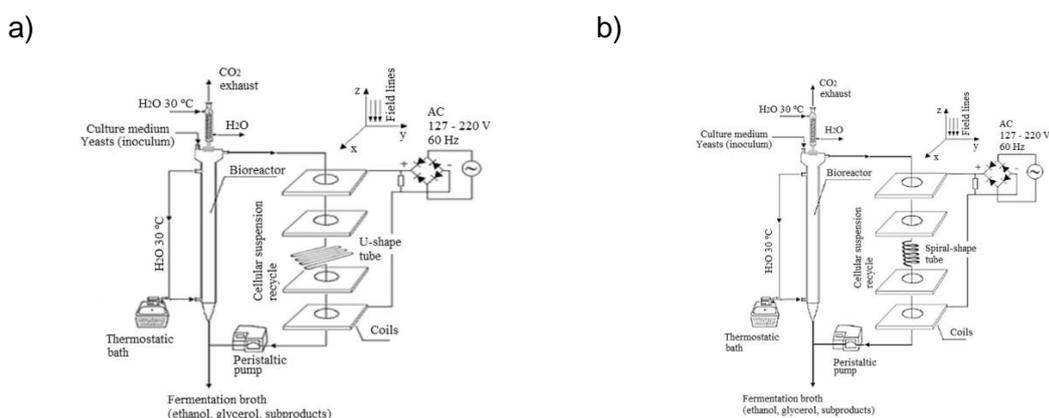


Figura 4- Sistemas de biorreator com reciclo assistido por campo magnético. a) biorreator com reciclo em U; b) biorreator com reciclo em espiral (Fonte: de Andrade *et al.*, 2021).

A orientação das linhas de campo magnético pode ser axial, transversal e perpendicular dependendo da configuração do campo magnético (Figura 5). Quando o sistema de campo magnético estiver posicionado horizontalmente, as linhas de campo serão axiais, ou seja, as linhas de campo passarão pela suspensão celular de cima para baixo. Quando o sistema de campo magnético estiver posicionado verticalmente, as linhas de campo serão transversais, ou seja, as linhas de campo irão passar pela suspensão celular de um lado para o outro. Por fim, quando o sistema de campo magnético estiver inclinado, as linhas de campo serão perpendiculares, ou seja, irão passar perpendicularmente na suspensão celular (David *et al.*, 2016).

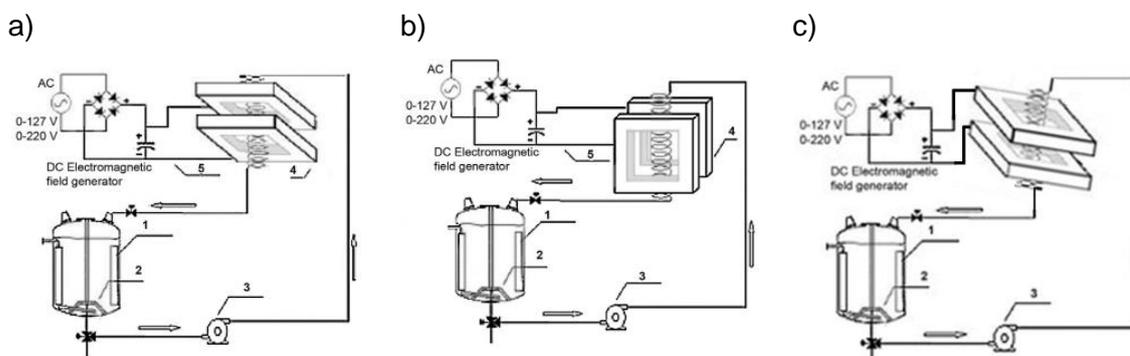


Figura 5- Sistemas de biorreator com reciclo em espiral assistido por campo magnético em diferentes orientações de linha de campo. a) linhas de campo axiais; b) linhas de campo transversais; c) linhas de campo perpendiculares (Fonte: David *et al.*, 2016).

A densidade de fluxo magnético é mensurada por um Gaussímetro na escala de Tesla (T) ou Gauss ($1 \text{ T} = 10.000 \text{ Gauss}$) e pode ser classificada como: baixa densidade, quando menor que 1 mT ; moderada, com a densidade entre 1 mT e 1 T ; alta densidade, de 1 T a 5 T e ultra alta densidade, quando maior que 5 T (Rosen, 2003).

De modo geral, os principais parâmetros do biorreator assistido por um sistema de campo magnético que influenciam na resposta biológica e que devem ser considerados no estudo são: a densidade de fluxo magnético (B), a intensidade do campo magnético (H), o tempo de exposição (t), o tipo de corrente,

a frequência (f) ou a frequência relativa associada à velocidade do reciclo da suspensão celular (v) e a orientação das linhas de campo.

2.5.2 Aplicações em processos de fermentação para produção de lipídios

Na literatura existem estudos que relatam o uso de campos magnéticos pulsados de alta intensidade utilizados em aplicações para fins de morte celular e esterilização como estratégia de tecnologia não térmica para a indústria alimentícia (Lin *et al.*, 2019; Bermúdez-Aguirre *et al.*, 2016). Essa tecnologia supera os efeitos indesejáveis da esterilização térmica no sabor e conteúdo de nutrientes dos produtos, além de eliminar os microrganismos indesejáveis que causam danos à saúde humana e impedir suas atividades fisiológicas normais. Enquanto os campos magnéticos considerados de baixa e moderada densidade são mais utilizados em pesquisas que possuem a finalidade de promover o crescimento microbiano e a produção de metabólitos de interesse industrial (Li *et al.*, 2021).

O efeito biológico de campos magnéticos de baixa e moderada densidade nos microrganismos ainda não foi esclarecido. O que vem sendo observado é que o campo magnético afeta a energia metabólica do próprio sistema biológico (Tang *et al.*, 2019), altera as características estruturais das células biológicas (Tang *et al.*, 2019; Qian *et al.*, 2016), afeta macromoléculas biológicas (Bauer *et al.*, 2017) e afeta a atividade dos radicais livres (Wang *et al.*, 2008).

Diante disso, tem sido explorado o emprego do campo magnético em culturas de microalgas e fungos visando buscar o efeito deste na produção de lipídios (Tabela 3). Estes estudos revelaram que campos magnéticos podem promover um aumento significativo na biomassa e na produção de lipídios e/ou ácidos graxos nestes microrganismos. Por exemplo, Chu *et al.* (2020) obtiveram uma maior produção de lipídios por *Nannochloropsis oculata* quando foi utilizada a menor densidade de fluxo magnético (20 mT) (Tabela 3). Por outro lado, Bauer *et al.* (2017), alcançaram uma maior produção de lipídios quando foi aplicada a maior densidade de fluxo magnético (60 mT) na cultura de *Chlorella kessleri* (Tabela 3).

Apesar das leveduras oleaginosas também possuírem a capacidade de acumular lipídios e apresentarem a forma de cultivo menos complexa que as microalgas, pois não necessitam de luz para o seu crescimento, ainda não há

estudos sobre produção de lipídios por leveduras sob campo magnético até o presente momento, e tampouco utilizando a *Y. lipolytica* para esta finalidade.

Tabela 3- Efeito da aplicação do campo magnético (CM) na produção de lipídios e/ou ácidos graxos por microrganismos

Microrganismo	Sistema de CM	Parâmetros de CM	Efeitos do CM em relação ao controle	Ref.
<i>Spirulina sp. LEB 18</i>	Campo magnético uniforme gerado por solenoide acoplado ao redor do lado de fora do fotobiorreator tubular vertical.	$B= 6 \text{ mT};$ $t= 15 \text{ d.}$	Diferença insignificativa na concentração máxima de biomassa; $\uparrow 45,5 \%$ na concentração de lipídios.	Menestrino <i>et al.</i> , 2021
	Campo magnético não homogêneo gerado por ímãs de ferrite posicionados à 180° uns dos outros em torno do fotobiorreator tubular vertical.	$B= 30 \text{ mT};$ $t= 15 \text{ d.}$ $B= 30 \text{ mT};$ $t= 50 \text{ d.}$	$\uparrow 37,3 \%$ na concentração máxima de biomassa; $\uparrow 45,5 \%$ na concentração de lipídios. Diferença insignificativa na concentração máxima de biomassa; $\uparrow 16 \%$ na concentração de lipídios	
<i>Chlorella vulgaris</i> NRMC-F 011	Campo Magnético Pulsado gerado por solenoide foi introduzido na lagoa e projetado de forma que o fluxo magnético fosse distribuído uniformemente no fluxo de água.	$B= 700 \text{ mG};$ $f= 1\text{Hz};$ $t= 4 \text{ h/d.}$	\uparrow na produção de biomassa. \uparrow no conteúdo lipídico de até 29,79 %.	Baldev <i>et al.</i> , 2021
<i>Chlorella homosphaera</i>	Ímãs de ferrite distribuídos em torno do fotobiorreator vertical.	$B= 30 \text{ mT};$ $t= 1 \text{ h/d.}$	$\uparrow 20,6\%$ na concentração de biomassa; $\uparrow 135,1\%$ na produtividade de lipídios.	Costa <i>et al.</i> , 2020
		$B= 60 \text{ mT};$ $t= 1 \text{ h/d.}$	$\uparrow 12,4 \%$ na concentração de biomassa; $\uparrow 108,4\%$ na produtividade de lipídios.	
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Ímãs de ferrite posicionado 10 cm acima da base do reator e em um lado do reator.	$B= 20 \text{ mT};$ $t= 7 \text{ d.}$	$\uparrow 22\%$ na taxa de crescimento específico; $\uparrow 64,89\%$ na produção de lipídios.	Chu <i>et al.</i> , 2020
		$B= 30 \text{ mT};$ $t= 7 \text{ d.}$	$\downarrow 11\%$ na taxa de crescimento específico; $\uparrow 30,53\%$ na produção de lipídios.	
		$B= 40 \text{ mT};$ $t= 7 \text{ d.}$	$\downarrow 44\%$ na taxa de crescimento específico; $\uparrow 12,98\%$ na produção de lipídios.	

Tabela 3, Cont.

Microrganismo	Sistema de CM	Parâmetros de CM	Efeitos do CM em relação ao controle	Ref.
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> FACHB-9	Reciclo da cultura em água residual municipal pré-tratada com CM através de dois ímãs.	$B=$ 1000-5000 Gs; $t=$ 6 d; $v=$ 50 mL/min.	↑ da produção de biomassa e lipídios quando a densidade de CM foi definida para 1000 e 5000 Gs.	Feng <i>et al.</i> , 2020
<i>Cunninghamella echinulata</i>	Tubos no centro de bobinas cilíndricas, gerando pulso de 10 ms de largura e intervalo de tempo de 5 s entre dois pulsos.	$B=$ 6 T.	↑ 26,4% no rendimento de lipídios; ↑ 46,2% no rendimento de GLA.	Al-Hawash <i>et al.</i> , 2018
<i>Chlorella kessleri</i> LEB 113	Fotobiorreator com ímãs de ferrite dispostas a 180° de distância um do outro e 15 cm acima da base.	$B=$ 30 mT; $t=$ 10 d. $B=$ 30 mT; $t=$ 1 h/d for 10 d. $B=$ 60 mT; $t=$ 10 d. $B=$ 60 mT; $t=$ 1 h/d for 10 d.	↑ 10,7% no crescimento celular; sem efeito na produção de lipídios. ↑ 36% no crescimento celular; ↑ 13,1% na produção de lipídios. ↑ 23,6% no crescimento celular; sem efeito na produção de lipídios. ↑ 83,2% no crescimento celular; ↑ 13,7% na produção de lipídios.	Bauer <i>et al.</i> , 2017
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> FACHB-9	Foi fornecido um sistema de entrada e saída da cultura de microalgas através do campo magnético estático gerado por ímãs retangulares de neodímio (180 x 150 mm).	$B=$ 0,5 T; $t=$ 5 d; $v=$ 600 mL/min;	↑ 12,3 % na produtividade de biomassa; diferença insignificante no conteúdo lipídico; ↑ 10 % na produtividade lipídica.	Han <i>et al.</i> , 2016
<i>Chlorella kessleri</i> UTEX 398	Reciclo do conteúdo do reator através de um solenoide refrigerado a água.	$B=$ 10 mT; $v=$ 200 mL/min.	↑ 20% na produção de C15:0; ↑ 40,9% na produção de C18:1n-7.	Small <i>et al.</i> , 2012

B é a densidade de fluxo do CM; t é o tempo de exposição ao CM; f é a frequência; v é a velocidade do reciclo; ↑ aumento; ↓ diminuição

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Materiais

Foram utilizadas três diferentes cepas de *Yarrowia lipolytica*: 1) NRRL Y-1095, obtida da coleção de cultura ARS, USA, que foi mantida em meio sólido YM (*yeast malt agar*); 2) Sa-1 (genótipo MatB), fornecida pelo Prof. Angel Domingues ao Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos (LFBM/ CBB/ UENF), que foi mantida em meio sólido YED (*yeast extract dextrose agar*); 3) JM-12 (genótipo MatB leu2-. 35 lys5-12 ura3-18), também fornecida pelo Prof. Angel Domingues ao LFBM/ CBB/ UENF, que foi mantida em meio sólido YED contendo aminoácidos. As culturas repicadas foram mantidas por 72 h em estufa a 30 °C e posteriormente foram congeladas a 4 °C até o momento de serem utilizadas e a cada 90 dias foram repicadas em seus respectivos meios sólidos. Desta forma, houve quantidade suficiente de microrganismos para a realização do estudo. Todos os reagentes usados como padrão, solventes e meios de cultura foram obtidos da Sigma-Aldrich, Merck e Neogen.

3.2 Seleção do microrganismo

A análise da performance de crescimento das três diferentes cepas de *Yarrowia lipolytica*: 1) NRRL Y-1095; 2) Sa-1 (genótipo MatB); 3) JM-12 (genótipo MatB leu2-. 35 lys5-12 ura3-18) foi utilizada como critério de seleção da cepa de microrganismo. Ensaios de crescimento celular foram realizados em Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio mínimo líquido modificado descrito por

Sestric *et al.* (2014), composto por: glicose, 40 g/L; extrato de levedura, 0,75 g/L; KH_2PO_4 , 0,4 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,5 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 g/L com pH ajustado para 6.5 e autoclavado a 121 °C por 15 min. Esses ensaios foram conduzidos em duplicatas no *shaker* a 175 rpm, 30 °C durante 48 h. Amostras foram coletadas a cada 2 h para análise do crescimento celular. A cepa que apresentou a melhor performance de crescimento foi utilizada nas posteriores análises.

3.3 Métodos experimentais

3.3.1 Preparo do inóculo

As culturas da levedura mantidas em meio sólido a 4 °C foram ativadas em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio mínimo líquido, descrito por Sestric *et al.* (2014), que é composto por: glicerol, 40 g/L; extrato de levedura, 0,75 g/L; KH_2PO_4 , 0,4 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,5 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 g/L com pH ajustado para 6.5 e autoclavado a 121 °C por 15 min. Esses frascos contendo o inóculo foram mantidos em *shaker* a 175 rpm, 30 °C até atingir a concentração celular de 1×10^6 cels/mL.

3.3.2 Crescimento celular de *Y. lipolytica* em *shaker*

Para a realização do crescimento celular da *Y. lipolytica* em *shaker* foram utilizados 12 frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio mínimo líquido descrito no item 4.3.1. com 10 % (v/v) do inóculo com concentração celular de 1×10^6 cels/mL e mantidos em *shaker* a 175 rpm, 30 °C. Cada frasco de Erlenmeyer correspondeu a um ponto de amostragem, que foi a cada 2 h.

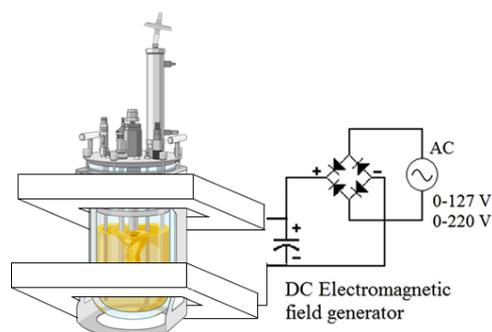
3.3.3 Crescimento celular em biorreator assistido por campo magnético

O crescimento celular da *Y. lipolytica* foi realizado no biorreator de 1,2 L (New Brunswick, BioFlo®/CelliGen® 115) contendo 800 mL de meio mínimo líquido descrito no item 4.3.1. com 10 % (v/v) do inóculo a 30 °C, 100 rpm por 48 h. A fim de avaliar o crescimento celular da *Y. lipolytica* sob campo magnético, foram conduzidos experimentos em biorreator assistido por um sistema gerador de campo magnético axial-transversal como descrito por David *et al.* (2016). Amostras das culturas em crescimento foram coletadas no intervalo de 6 h para posteriores análises.

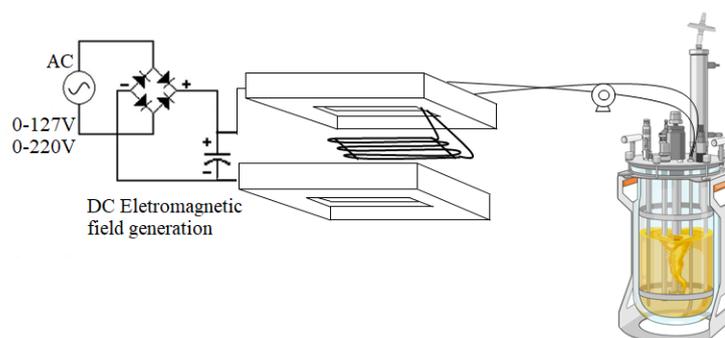
O biorreator assistido por campo magnético consiste no acoplamento de um fermentador tipo tanque agitado com um sistema gerador de campo magnético estático (DC) de linhas axial-transversal, conectado a um VARIAC interligado a um amperímetro (Figura 6). Através deste VARIAC é possível mudar o valor da corrente elétrica e conseqüentemente a força do campo magnética (David *et al.*, 2016).

Nos experimentos com exposição ao campo magnético a estratégia experimental utilizada foi: exposição de diferentes intensidades de campo magnético, isto é, 3, 6 e 9 kA/m durante 12 h/dia e três configurações do sistema de biorreator, sendo estas: a) biorreator convencional exposto ao campo; b) biorreator acoplado ao sistema de reciclo externo em formato U exposto ao campo; c) biorreator acoplado ao sistema de reciclo externo em formato de espiral exposto ao campo (Figura 6), cujo reciclo foi operado a 250 rpm. A temperatura das bobinas geradoras de campo magnético foi monitorada utilizando uma câmera de termovisor com infravermelho modelo E40 FLIR. Simultaneamente, experimentos controle foram realizados sem aplicação do campo magnético nas mesmas condições dos sistemas de cultivo acima descritos.

a)



b)



c)

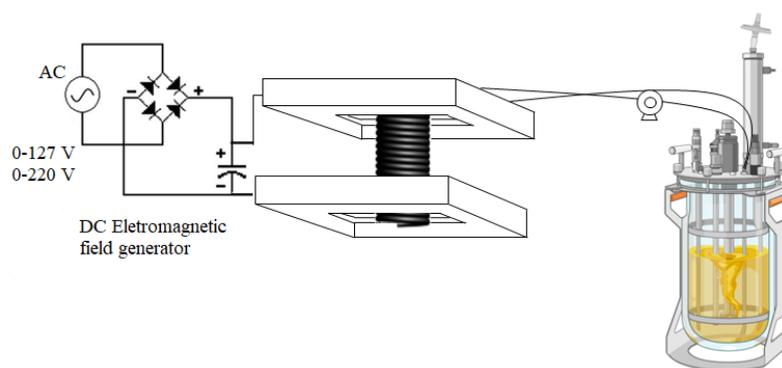


Figura 6- Configurações usadas nas fermentações de *Y. lipolytica* em biorreator assistido por campo magnético: a) biorreator sem reciclo com linhas de campo na direção axial; b) biorreator com reciclo em U com linhas de campo na direção axial; c) biorreator com reciclo em espiral com linhas de campo na direção axial.

3.4 Métodos analíticos

3.4.1. Concentração celular

A quantificação da concentração celular foi realizada através da leitura da D.O. das amostras coletadas pelo espectrofotômetro (Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis) no comprimento de onda de 600 nm. Diluições das amostras foram feitas quando necessárias e foi utilizado o próprio meio de cultura como branco.

3.4.2. Quantificação do consumo do substrato

A quantificação do consumo do substrato das amostras coletadas foi realizada através do cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC) (YL9100 HPLC System, Young Lin) com injeção manual e detecção por medida de índice de refração (IR). O método para identificação do substrato foi executado a 60 °C e com vazão de 0,7 mL/min da fase móvel (água deionizada). Para tal, a coluna Rezex RCM-Monossacarídeo Aminex HPX-87C 300 x 7,8 mm (Bio-Rad Laboratories Ltd) foi escolhida. Uma curva de calibração para o glicerol com linearidade até 40 g/L foi previamente realizada (Figura 7). As amostras foram filtradas em um filtro contendo membrana de 0,22 µm antes de serem injetadas.

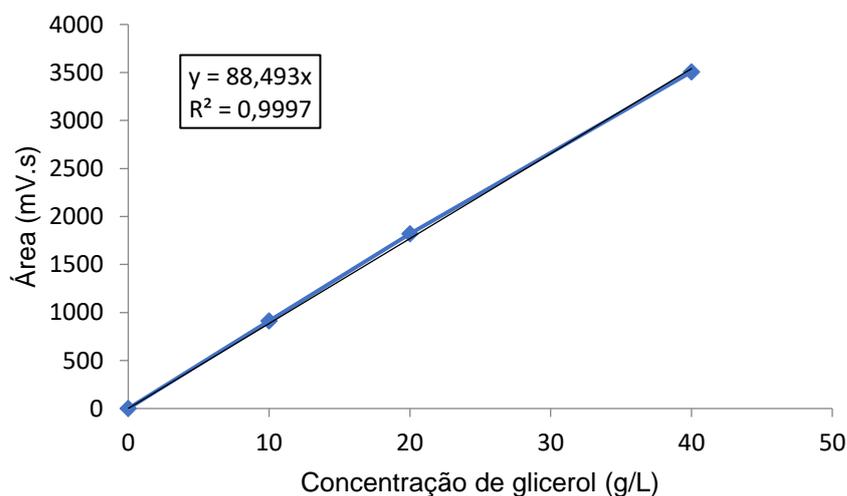


Figura 7- Curva de calibração de glicerol para a determinação de consumo deste substrato pela levedura *Y. lipolytica*.

3.4.3. Monitoramento do pH

O pH do meio de cultura das amostras coletadas durante as fermentações foi monitorado através de um pHmetro de bancada (BEL Engineering, Model W3B).

3.4.4. Análise morfológica da célula

Foram monitoradas as mudanças morfológicas das células de *Y. lipolytica* durante o crescimento através do microscópio (Nikon Eclipse E200), em intervalos de 2 h.

3.4.5. Extração de lipídios

Foi utilizado o método modificado descrito por Bligh e Dyer (1959) para extrair o lipídio intracelular produzido pela *Y. lipolytica*. Inicialmente, a biomassa seca total foi suspensa em clorofórmio e metanol na proporção 1:2 e submetida ao processo de ruptura celular através do homogeneizador (MA 102/Plus, Marconi) por 5 min e/ou disruptor de células (Qsonica Q55-110 Q55 Sonicator Ultrasonic Processor) em 5 ciclos de 1 min de operação e 1 min desligado, totalizando 5 min. O equipamento que apresentou melhor desempenho foi utilizado nas posteriores análises. Então, foi adicionado 10 mL de clorofórmio e, em seguida, foi agitado *overnight* no *shaker* a 220 rpm e posteriormente foi centrifugado a 5000g por 5 min. O sobrenadante foi transferido para um balão de boca esmerilhada previamente pesado e o solvente evaporado no rotaevaporador para obtenção da quantidade de lipídios totais produzido pela levedura. Portanto, o teor lipídico da biomassa de levedura foi determinado por peso após a evaporação do solvente.

3.4.6. Determinação da composição dos ácidos graxos dos lipídios totais

A análise da composição dos ácidos graxos dos lipídios totais foi realizada segundo a metodologia de Maia *et al.* (1994) com algumas modificações para determinar a formação de ésteres etílicos de ácidos graxos (FAEEs). Basicamente, em um balão os lipídios totais foram submetidos a uma reação de hidrólise básica através da adição de 4 mL da solução de NaOH em C₂H₅OH (0,5 M) sob aquecimento em banho-maria em ebulição e agitação por 5 min. Nessa reação, cada molécula de triacilglicerol é quebrada em uma molécula de glicerol e

três moléculas de sal de ácido carboxílico. Logo após, o balão foi esfriado em água corrente. Em seguida, os compostos formados foram submetidos a uma reação de esterificação através da adição de 5 mL da solução de esterificação (10 g de NH_4Cl , 300 mL de $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ e 15 mL H_2SO_4) sob aquecimento em banho-maria em ebulição e agitação por 5 min. Os ésteres etílicos de ácidos graxos são formados nessa reação. Logo após, o balão foi esfriado em água corrente. Em seguida, foi adicionada 4 mL de solução saturada de NaCl ao balão e agitado por 30 seg. Por fim, 5 mL de solvente foi adicionado ao tubo de ensaio e agitado por 30 seg. O balão foi deixado de repouso para que houvesse a formação de duas fases. O sobrenadante, que contém os ésteres etílicos, foi utilizado para injeção no cromatógrafo gasoso.

Para a identificação dos ácidos graxos do lipídio microbiano foram injetados diferentes padrões de ésteres etílicos de ácidos graxos saturados e insaturados no cromatógrafo gasoso e um método para a identificação desses padrões foi estabelecido. A coluna utilizada para essa análise foi a BD-ASTMD6584 de 15 m \times 0.10 mm \times 0.32 μm . O método de operação estabelecido foi com a temperatura inicial de 100 °C durante 4 min, em seguida houve um aumento 20 °C/ min até atingir 150 °C, ao qual foi mantido por 3 min e, por fim, a temperatura foi aumentada a 15 °C/ min até alcançar 250 °C, essa temperatura ficou mantida durante 10 min. A temperatura do injetor foi 260 °C. Neste método foi possível obter os 9 picos referentes ao padrão de ésteres etílicos de ácidos graxos saturados de C8-C24 e o pico do padrão dos ésteres etílicos dos ácidos graxos insaturados C18 (Figura 8).

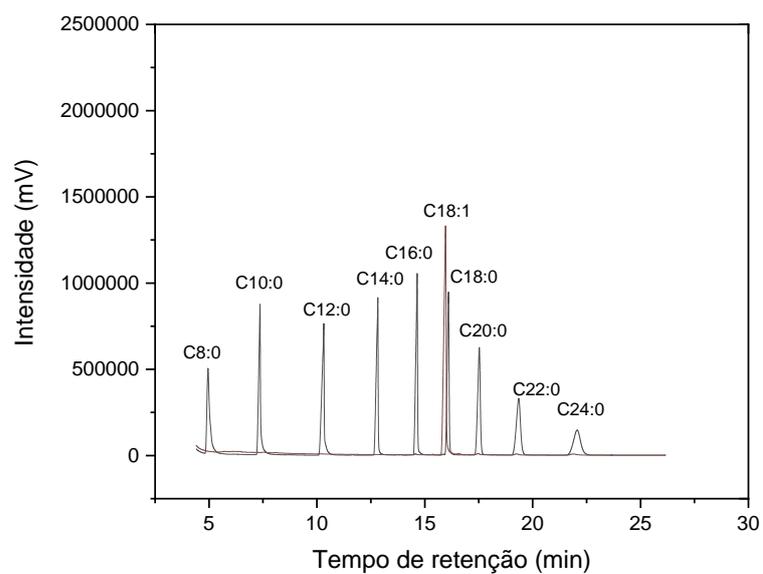


Figura 8- Cromatograma com padrões de ésteres etílicos de ácidos graxos saturados de C8-C24 e o padrão de éster etílico da mistura de ácidos graxos insaturados C18:1, C18:2 e C18:3.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Seleção da cepa de *Y. lipolytica*

A performance do crescimento celular das três diferentes cepas de *Y. lipolytica*: NRRL-Y1095, Sa-1 e Jm-12 em meio mínimo descrito por Sestric *et al.* (2014) modificado, que é um meio específico para estimular a produção de lipídios, foi adotada como critério de seleção da cepa que foi utilizada nas análises posteriores com biorreator assistido por campo magnético.

A cepa NRRL-Y1095 apresentou a melhor performance de crescimento seguida das cepas Sa-1 e Jm-12 (Figura 9). Por esse motivo, esta cepa foi selecionada para a próxima etapa do estudo na qual foram monitorados não apenas as cinéticas crescimento celular, consumo de substrato, pH e a formação do produto, mas também, a composição dos ácidos graxos dos lipídios formados sob campo magnético.

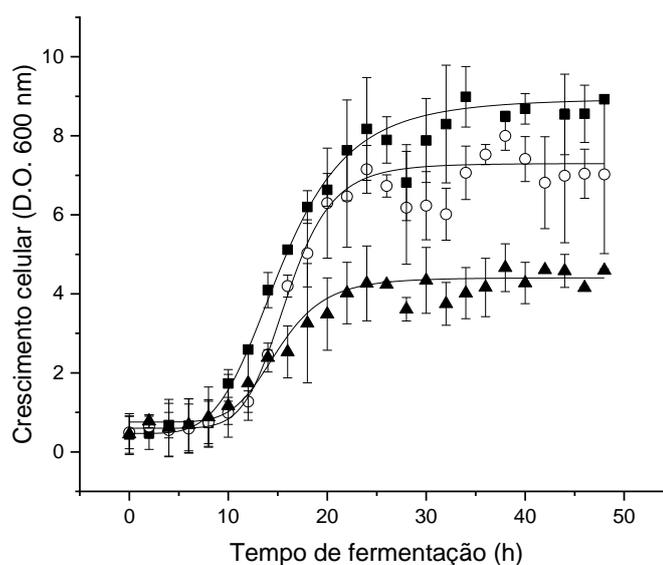


Figura 9- Cinética de crescimento de *Y. lipolytica* NRRL-Y1095, Sa-1 e Jm-12 em meio de cultura mínimo em *shaker* a 30°C, 175 rpm sem aplicação de campo magnético. Símbolos: (■) *Y. lipolytica* NRRL-Y1095; (●) *Y. lipolytica* Sa-1; (▲) *Y. lipolytica* Jm-12.

4.2 Cultura da *Y. lipolytica* em *shaker* usando glicerol como fonte de carbono

4.2.1 Cinética de crescimento

Na Figura 10 é possível observar uma cinética de crescimento típico da *Y. lipolytica*, com a variação de pH do meio de cultura, produção de lipídios em função do tempo de cultivo e consumo de substrato. A cepa NRRL-Y1095 conseguiu se adaptar ao meio mínimo de nutrientes contendo glicerol como única fonte de carbono, apresentando uma curva de crescimento típico contendo fase lag, que durou cerca de 8 h de cultivo, fase log e início da fase estacionária. O cultivo foi conduzido até o crescimento atingir a fase estacionária.

Conforme a cinética de consumo do substrato, é possível observar que o glicerol foi consumido principalmente quando a levedura atingiu a fase logarítmica do crescimento. Contudo, o consumo do substrato foi reduzido na transição da fase logarítmica para a fase estacionária. Esse comportamento é esperado, pois nessa fase de transição a levedura não está em intensa reprodução. Com isso, há

menos demanda de energia para se reproduzir e, como consequência, ocorre menos consumo do substrato.

Através do consumo do glicerol, a levedura foi capaz de produzir lipídios, que é o metabólito de interesse deste estudo. Foi possível obter o lipídio da levedura ao atingir a fase logarítmica do crescimento, a partir das 12 h de cultivo. Entretanto, a maior produção de lipídio ocorreu no início da fase estacionária, às 28 h de cultivo, atingindo cerca de 30 mg de lipídios em 50 mL de cultura.

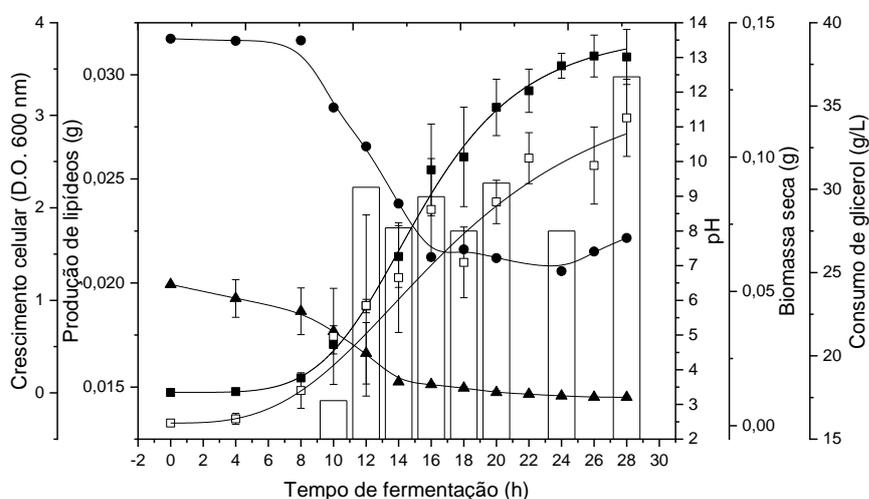


Figura 10- Cinética de crescimento da *Y. lipolytica* NRRL-Y1095 em fermentação submersa realizada em *shaker* a 30 °C, 175 rpm sem aplicação de campo magnético. Símbolos: (●) Consumo do substrato; (■) Crescimento celular (D.O. 600 nm); (□) Biomassa seca; (▲) pH; Barras brancas, Produção de lipídios.

4.2.2 Avaliação da extração de lipídios

Antes de extrair o lipídio da célula com solventes é preciso rompê-las. Há diferentes maneiras para tentar realizar a ruptura da membrana celular, como a hidrólise ácida, disruptura celular utilizando o sonicador, choque osmótico, pasteurização, homogeneização com bolas de zircônia e congelamento/descongelamento são algumas delas (Kot *et al.*, 2020). Neste estudo foram avaliados dois diferentes equipamentos para ruptura celular, a fim

de determinar o método mais eficaz para a posterior extração do lipídio microbiano. Sendo estes, a utilização de um disruptor celular (Qsonica Q55 Sonicator Ultrasonic Processor) e um homogeneizador (MA 102/Plus, Marconi).

Na Figura 11 apresenta a produção de lipídios da *Y. lipolytica* a partir das 12 h de cultivo obtidos através da ruptura celular realizado pelo disruptor celular por sonicador (barra preta) e pelo homogeneizador (barra cinza). É possível observar que a partir de 16 h houve diferença na quantidade de lipídios obtidos após a ruptura celular entre os diferentes equipamentos. Foi possível obter um acréscimo de cerca de 11 mg, 18 mg, 13 mg e 0,4 mg de lipídios em 16 h, 20 h, 24 h e 28 h, respectivamente, quando a ruptura foi realizada com o homogeneizador em relação a ruptura realizada com o disruptor celular por sonicador. Foi estabelecido o método de ruptura celular através do homogeneizador para as posteriores análises de extração de lipídios das culturas de *Y. lipolytica*.

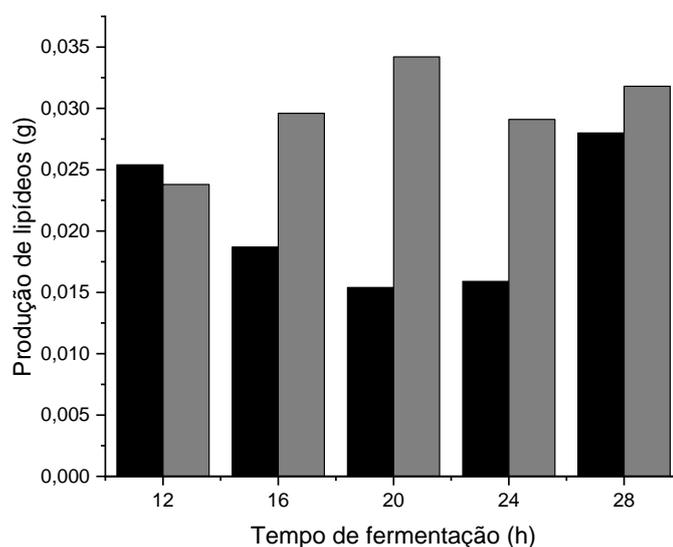


Figura 11- Gráfico da quantificação de lipídios por *Y. lipolytica* em diferentes equipamentos para realizar ruptura da célula e para posterior extração do lipídico. Legenda: ■- Ruptura celular com o disruptor celular; ■- Ruptura celular com o homogeneizador.

4.2.3 Avaliação do perfil dos ácidos graxos do lipídio produzido pela *Y. lipolytica* em *shaker*

A fim de confirmar que a extração do lipídio tinha sido realizada corretamente e identificar a composição de ácidos graxos dos lipídios foi realizada a análise da composição dos ácidos graxos do lipídio microbiano obtido da cultura de *Y. lipolytica* em *shaker* através da comparação com os ácidos graxos padrões injetados previamente no cromatógrafo gasoso.

Através dessa análise, foram identificados 8 ácidos graxos diferentes, sendo estes: ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoleico (C16:1), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1), ácido araquidônico (C20:0), ácido beénico (C22:0), ácido lignocérico (C24:0). Dentre os ácidos graxos identificados, os mais abundantes foram o ácido oleico, ácido palmítico, ácido esteárico e ácido palmitoleico (Tabela 4). Essa composição de ácidos graxos de lipídios produzidos pela levedura *Y. lipolytica* NRRL-Y1095 utilizando glicerol como fonte de carbono está de acordo com o que tem sido descrito na literatura (Tabela 4).

Tabela 4- Composição de ácidos graxos do lipídio produzido por diferentes cepas de *Y. lipolytica* utilizando glicerol como fonte de carbono

Cepa	Substrato	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C22:0	C24:0	Outros	Conteúdo lipídico (% w/w)	Ref.
NRRL-Y1095	Glicerol	2,045	16,82	5,92	3,93	53,7*	-	-	0,59	0,57	1,11	-	27,7	Neste estudo
W29	Glicerol e	-	12,6±0,8	4,8±0,2	6,5±0,3	36±1	35±1	-	-	-	-	-	7,9±0,4	Pereira
NCYC 2904	VFAs	-	11,9±0,5	7,1±0,3	5,8±0,4	45±1	28±2	-	-	-	-	-	21,8±0,3	<i>et al.</i> , 2021
ACA-DC 5033	Glicerol	-	11,6	-	10,8	60,9	6,8	-	-	-	-	9,9	32,2	Sarantou <i>et al.</i> , 2021
LFMB Y19		-	15,6	-	7,6	49,2	14,9	2,2	-	-	-	10,5	48,0	
SM7	Glicerol bruto	-	14,50	0,97	12,98	45,0	20,1	-	-	-	-	-	61,3±0,9	Magdouli <i>et al.</i> , 2020
S6	Glicerol puro	0,61	17,97	11,38	2,21	52,14	12,25	0,44	-	-	-	1,96	29	Juszczuk <i>et al.</i> , 2019

*Mistura dos ácidos graxos insaturados C18.

4.3 Cultura da *Y. lipolytica* em fermentador assistido por campo magnético

4.3.1 Morfologia

A levedura *Y. lipolytica* pode apresentar comportamento dimórfico durante o seu crescimento, isto é, a sua morfologia pode transitar de levedura a hifa, ou vice-versa (Bellou *et al.*, 2014). Diante disso, o monitoramento morfológico da levedura *Y. lipolytica* foi realizado em todas as condições experimentais (Figura 12).

O dimorfismo celular é um fenômeno complexo que envolve modificações reversíveis da célula em resposta a diferentes perturbações do ambiente. O pH do meio externo, a temperatura, a presença de componentes no meio de cultura como a fonte de carbono, nitrogênio utilizada são alguns fatores considerados importantes que podem contribuir com o dimorfismo celular (Ruiz-Herrera e Sentandreu, 2002).

Na levedura *Y. lipolytica*, a transição dimórfica pode ser controlada pelo pH. O crescimento na forma de hifas da *Y. lipolytica* é favorecido pela incubação em meio próximo ao pH neutro, enquanto o crescimento na forma de levedura é favorecido pela incubação em meio com pH ácido (< pH 4,5) (Cogo *et al.*, 2020; Ruiz-Herrera e Sentandreu, 2002). Similarmente, o fungo *Candida albicans* apresentou o mesmo comportamento dimórfico em resposta ao pH (Ruiz-Herrera e Sentandreu, 2002).

Este comportamento pode ser observado neste estudo, em que, quando o pH do meio de cultura estava próximo ao pH neutro, às 12 h de cultivo da levedura *Y. lipolytica* nas diferentes condições experimentais (Figura 14, 15 e 16), ocorreu a predominância do crescimento de células alongadas, pseudo-hifas, e nas condições em que o biorreator sem reciclo foi exposto ao campo magnético de 3 e 9 kA/m, a cultura apresentou morfologia de hifas também (Figura 12). Já quando o pH do meio de cultura estava acidificado, a partir das 24 h de cultivo nas diferentes condições experimentais (Figura 14, 15 e 16), ocorreu a predominância do crescimento celular na forma de levedura (Figura 12).

O monitoramento morfológico possibilitou não apenas observar a transição dimórfica da levedura, como também a formação do corpo lipídico. Após 24 h de cultivo da levedura em todas as condições foi possível observar o corpo lipídico intracelular com mais evidência através do microscópio óptico (Figura 12).

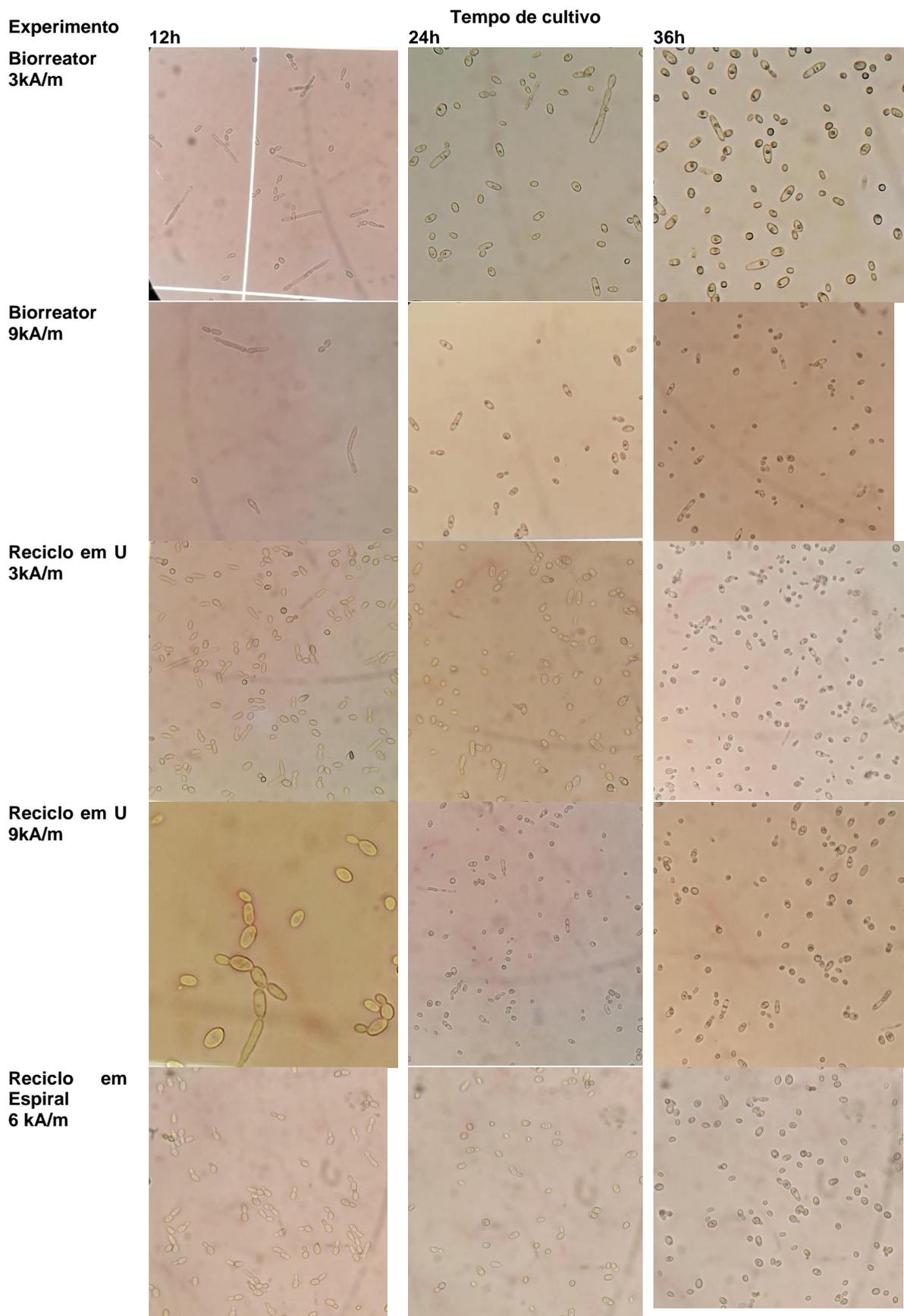


Figura 12- Microscopia óptica da levedura *Y. lipolytica* em diferentes condições experimentais e em diferentes tempos de cultivo.

4.3.2 Cinética de crescimento

Na Figura 13 apresenta a performance da cinética de crescimento da levedura *Y. lipolytica* em biorreator e em biorreator com reciclo em formato U sem exposição de campo magnético (controle). É possível observar que a condição do reator com reciclo em formato em U impôs uma diferença na performance do crescimento celular em relação à cultura em biorreator.

Este resultado corrobora com os estudos de cultivo com reciclo encontrados na literatura (David *et al.*, 2016; Alvarez *et al.*, 2006). David *et al.* (2016) e Alvarez *et al.* (2006) também puderam observar que o reciclo impõe um estresse mecânico às células e, como consequência, afeta no desempenho do crescimento celular do microrganismo.

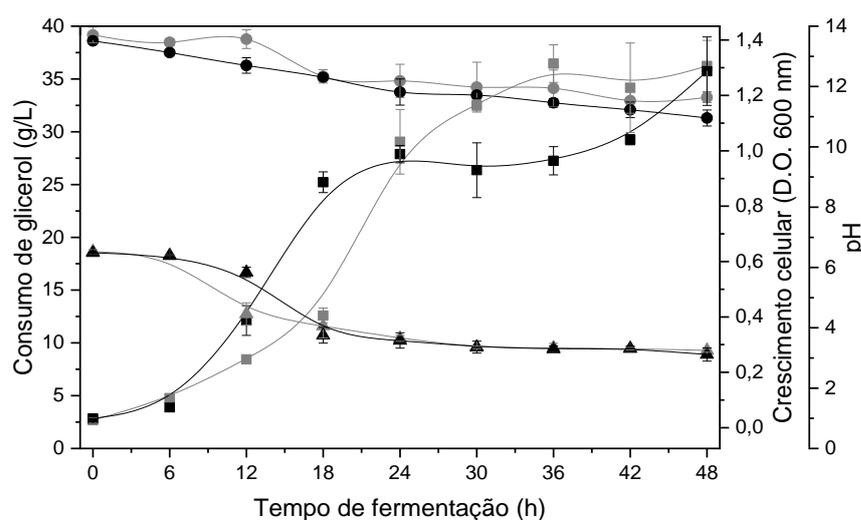


Figura 13- Cinética de crescimento de *Y. lipolytica* NRRL-Y1095 em biorreator e biorreator com reciclo em formato em U contendo meio mínimo a 30 °C, 100 rpm sem aplicação de campo magnético (CONTROLE). Símbolos: I) Cultura em biorreator: (●) Consumo de substrato; (■) Crescimento celular; (▲) pH; II) Culturas em biorreator com reciclo em formato em U: (●) Consumo de substrato; (■) Crescimento celular; (▲) pH.

Também é possível observar na Figura 13 que houve um aumento de 2,18 vezes no crescimento celular na fase logarítmica (18 h) da cultura em

biorreator com reciclo em formato em U em relação à cultura em biorreator, que acarretou um encurtamento da fase logarítmica. Entretanto, a cultura em biorreator com reciclo em formato em U atingiu a fase estacionária após 24 h de cultivo, que foi 12 h antes da cultura em biorreator sem reciclo. Isso resultou em uma diminuição de 26,69 % no crescimento da cultura em biorreator com reciclo em formato em U em relação à cultura em biorreator em 36 h de cultivo. Apesar da diferença na performance do crescimento celular das diferentes condições controle, ambas atingiram o mesmo valor de densidade óptica no tempo de 48 h.

Isso foi possível porque a performance da cinética de crescimento celular da cultura em biorreator com reciclo em formato em U apresentou um comportamento típico diaúxico, em que de 24 h às 36 h não houve variação no crescimento, indicando que esse período corresponde à fase estacionária do crescimento. Entretanto, a partir das 42 h, a levedura começa a crescer novamente, sugerindo que a levedura precisou de um período longo de adaptação a alguma fonte de nutriente para posterior crescimento.

Os experimentos em biorreator em que o campo magnético de 3 kA/m e 9 kA/m foi aplicado durante 12 h por dia revelaram que a exposição ao campo causou uma diminuição do crescimento celular em relação ao controle. Sendo esta diminuição de 26,2 % e 27,2 % para a cultura exposta ao campo magnético de 3 kA/m e 9 kA/m em 30 h de cultivo, respectivamente, em relação ao controle (Figura 14). Portanto, nessas condições o campo magnético influenciou negativamente no crescimento da levedura.

Chu *et al.* (2020) também observaram que a aplicação do campo magnético de 30 e 40 mT afetou negativamente a taxa de crescimento da cultura de microalga *Nannochloropsis oculata*, resultando em uma diminuição de 11 % e 44 %, respectivamente, em relação ao controle. Por outro lado, outros estudos relatam que o campo magnético afeta positivamente o crescimento celular de diferentes microrganismos oleaginosos (Baldev *et al.*, 2021; Costa *et al.*, 2020; Feng *et al.*, 2020; Bauer *et al.*, 2017; Han *et al.*, 2016). Mas, vale ressaltar que as condições experimentais utilizadas pelos autores foram diferentes das utilizadas no presente estudo, assim como o tipo de microrganismo. Por exemplo, para se obter um aumento de 83,2 % no crescimento celular da microalga *Chlorella kessleri*, Bauer *et al.* (2017) precisaram aplicar um campo magnético de 60 mT por 1 h/d durante 10 d.

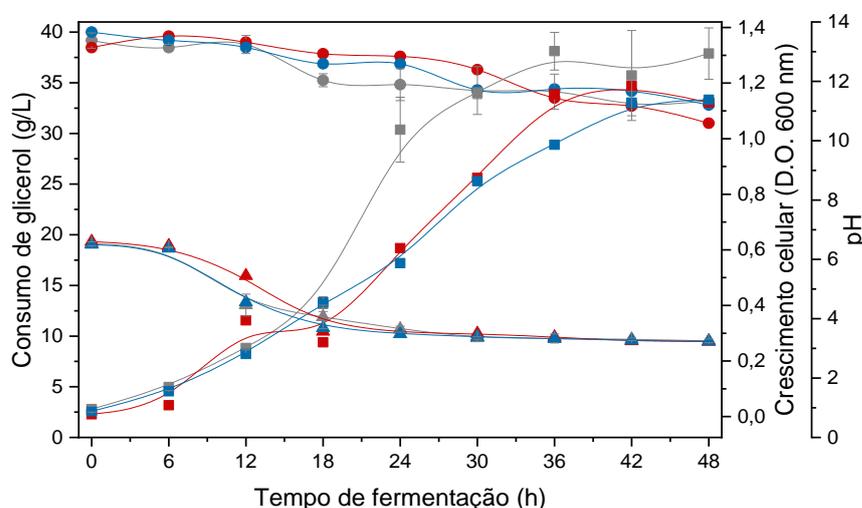


Figura 14- Cinética de crescimento de *Y. lipolytica* NRRL-Y1095 em biorreator contendo meio mínimo a 30 °C, 100 rpm sem e com aplicação de campo magnético. Símbolos: I) Cultura sem exposição ao campo magnético: (●) Consumo de substrato; (■) Crescimento celular; (▲) pH; II) Cultura com exposição de 3 kA/m: (●) Consumo de substrato; (■) Crescimento celular; (▲) pH; III) Cultura com exposição de 9 kA/m: (●) Consumo de substrato; (■) Crescimento celular; (▲) pH.

Já os experimentos da cultura de *Y. lipolytica* em biorreator com reciclo em formato em U mostraram uma performance da cinética de crescimento diaúxico, em que a levedura possui duas fases logarítmicas do crescimento. Sugerindo que a levedura esteja consumindo uma fonte diferente do substrato disponível no meio ao longo do crescimento (Figura 15).

Entretanto, somente foi fornecido uma fonte de carbono no meio de cultura. Como nas primeiras horas do crescimento quase não há consumo do glicerol, provavelmente a levedura estaria utilizando alguma segunda fonte durante essa fase de crescimento. Isso indica que, provavelmente, a levedura esteja consumindo outro nutriente que esteja disponível no meio para poder crescer, podendo esta ser a fonte de nitrogênio, o extrato de levedura ou até mesmo alguma fonte endógena.

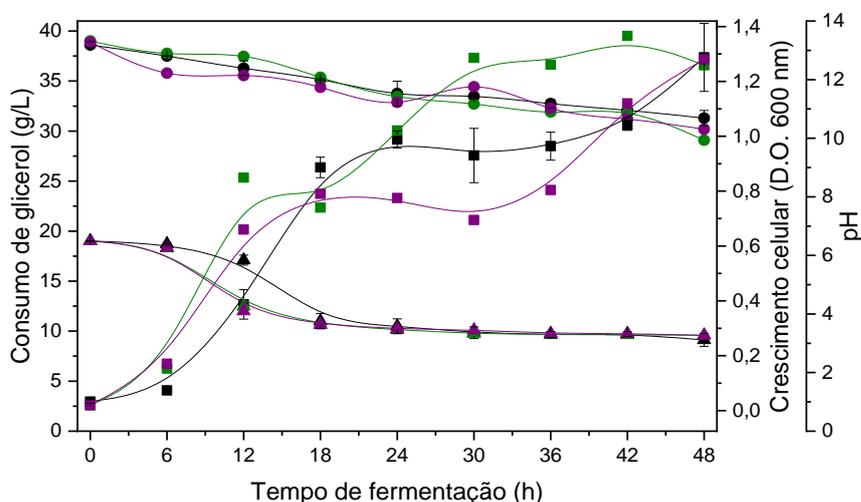


Figura 15- Cinética de crescimento de *Y. lipolytica* NRRL-Y1095 em biorreator com reciclo em formato de U contendo meio mínimo a 30 °C, 100 rpm sem e com aplicação de campo magnético. Símbolos: I) Cultura sem exposição ao campo magnético: (●) Consumo de substrato; (■) Crescimento celular; (▲) pH; II) Cultura com exposição de 3 kA/m: (●) Consumo de substrato; (■) Crescimento celular; (▲) pH; III) Cultura com exposição de 9 kA/m: (●) Consumo de substrato; (■) Crescimento celular; (▲) pH.

Ainda na Figura 14, foi possível observar que houve um aumento de 30,8 % e uma diminuição de 16,6 % no crescimento da cultura de *Y. lipolytica* em biorreator com reciclo em formato em U exposta ao campo magnético de 3 kA/m e 9 kA/m em 30 h de cultivo, respectivamente, em relação ao controle.

As três condições experimentais da cultura em biorreator com reciclo: sem exposição ao campo (controle) e com exposição ao campo de 3 kA/m e 9 kA/m, alcançaram o mesmo valor de densidade óptica no tempo final de cultivo (48 h). Entretanto, a cultura exposta ao campo magnético de 3 kA/m atingiu essa densidade óptica desde as 30 h de cultivo enquanto as demais ainda estavam crescendo. Isto sugere que a cultura em biorreator com reciclo exposta ao campo de 3 kA/m foi a condição que favoreceu o crescimento celular de *Y. lipolytica*.

Similarmente, David *et al.* (2016) obtiveram um aumento no crescimento celular da levedura *Y. lipolytica* quando um campo magnético de 1,5 kA/m foi aplicado ao biorreator acoplado ao sistema de reciclo formato U em relação às demais condições experimentais estudadas. Além disso, os autores puderam observar que nesta condição a fase estacionária do crescimento foi alcançada às 15 h de cultivo, enquanto o controle ainda estava crescendo.

A Figura 16 apresenta a cinética de crescimento da cultura de *Y. lipolytica* em biorreator com reciclo em espiral exposto ao campo magnético de 6 kA/m. Pode-se observar que ocorreu uma restrição no crescimento celular, em que a fase estacionária foi atingida a partir das 12 h de cultivo, não apresentando o comportamento característico de crescimento diaúxico, portanto ocorreu apenas a formação de uma fase logarítmica e estacionária. Nesta condição também não ocorreu consumo do substrato fornecido no meio durante as primeiras 12 h de cultivo.

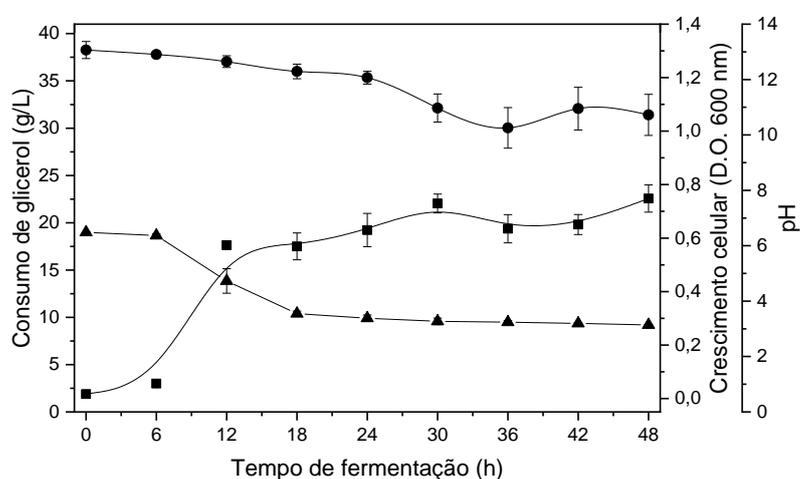


Figura 16- Cinética de crescimento de *Y. lipolytica* NRRL-Y1095 em biorreator com reciclo em espiral contendo meio mínimo a 30 °C, 100 rpm com aplicação de campo magnético de 6 kA/m. Símbolos: (●) Consumo de substrato; (■) Crescimento celular; (▲) pH.

Em relação às demais condições estudadas, a cultura em biorreator com reciclo em espiral exposto ao campo magnético de 6 kA/m apresentou o menor crescimento celular no tempo final do cultivo, sendo este 1,8 vezes menor, aproximadamente, comparado à cultura em biorreator com reciclo em U exposto ao campo magnético de 3 kA/m (Figura 17). Enquanto a cultura em biorreator com reciclo em formato em U exposto ao campo magnético de 3 kA/m apresentou maior crescimento celular em relação às demais condições experimentais estudadas.

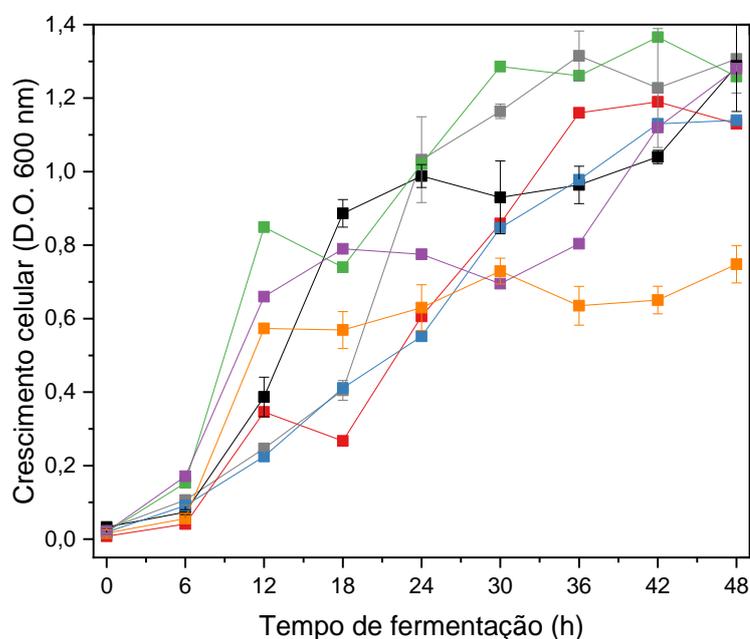


Figura 17- Cinética de crescimento celular de *Y. lipolytica* NRRL-Y1095 meio mínimo a 30 °C, 100 rpm em diferentes condições experimentais. Símbolos: (■) Biorreator sem exposição ao campo magnético; (■) Biorreator com reciclo em U sem exposição ao campo magnético; (■) Biorreator exposto ao campo magnético de 3 kA/m; (■) Biorreator exposto ao campo magnético de 9 kA/m; (■) Biorreator com reciclo em espiral exposto ao campo magnético de 6 kA/m; (■) Biorreator com reciclo em U exposto ao campo magnético de 3 kA/m; (■) Biorreator com reciclo em U exposto ao campo magnético de 9 kA/m.

Comparando a cultura em biorreator com reciclo exposta ao campo magnético de 3 kA/m com a cultura em biorreator sem reciclo e sem exposição ao campo, pois esta é a condição usualmente utilizada em escala industrial, foi possível observar que houve um aumento de 10,48 % no crescimento em 30 h de cultivo (Figura 18). Já, David *et al.* (2016) obtiveram um aumento de 6 % no crescimento em condições similares, biorreator acoplado ao sistema de reciclo em formato U exposto ao campo de 1,5 kA/m em relação ao biorreator convencional sem exposição.

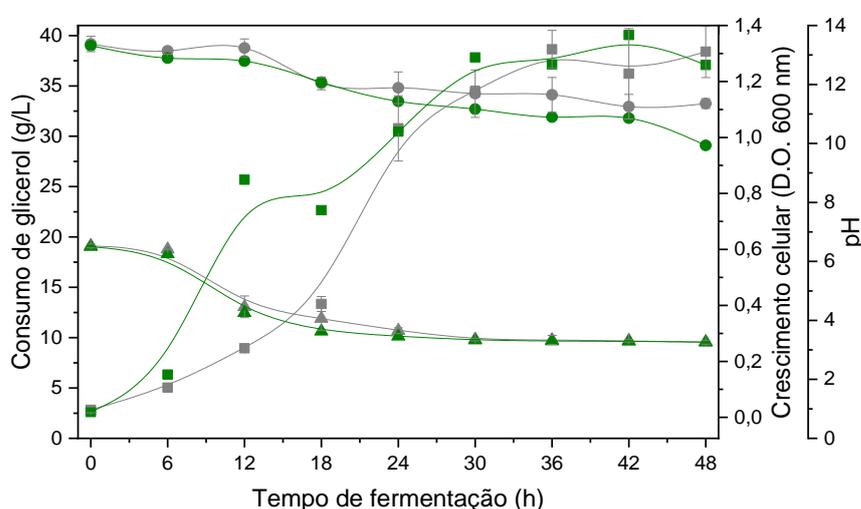


Figura 18- Cinética de crescimento de *Y. lipolytica* NRRL-Y1095 em biorreator sem reciclo e sem exposição ao campo magnético e biorreator com reciclo em formato de U exposto ao campo magnético de 3 kA/m contendo meio mínimo à 30 °C, 100 rpm. Símbolos: I) Cultura em biorreator sem reciclo e sem exposição ao campo magnético: (●) Consumo de substrato; (■) Crescimento celular; (▲) pH; II) biorreator com reciclo em formato de U exposto ao campo magnético: (●) Consumo de substrato; (■) Crescimento celular; (▲) pH.

4.3.3 Produção de lipídios

A produção dos lipídios totais produzidos pela *Y. lipolytica* nas diferentes condições experimentais foi quantificada no tempo final do crescimento da levedura (Figura 19). Os resultados obtidos demonstraram que houve um

aumento de 29,2 % na produção de lipídios na cultura em biorreator exposto ao campo magnético de 9 kA/m em relação à cultura em biorreator sem exposição ao campo, apesar do crescimento celular ter sido afetado negativamente nesta condição experimental.

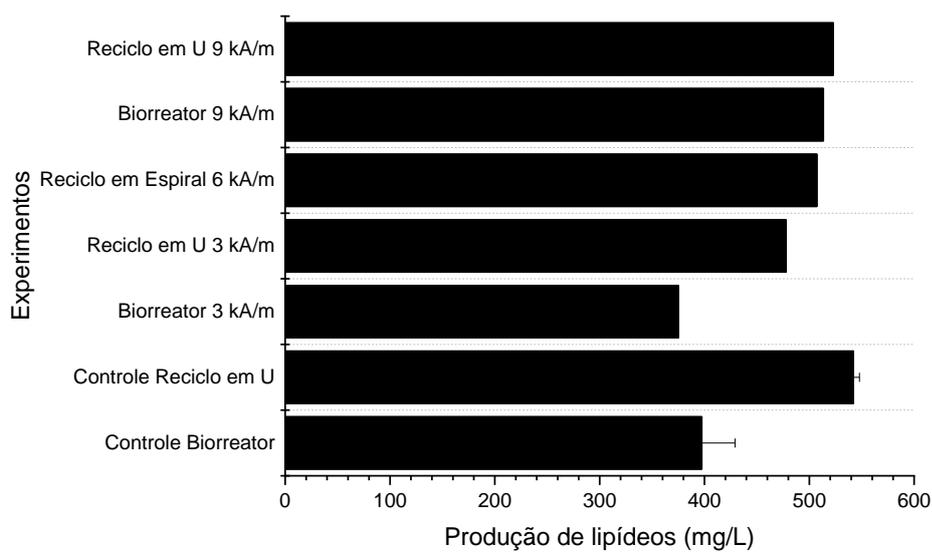


Figura 19- Quantificação da produção de lipídios das diferentes condições experimentais.

Esse resultado corrobora com os estudos encontrados na literatura em que foi possível obter um aumento na produção de lipídios por microrganismos (Menestrino *et al.*, 2021; Chu *et al.*, 2020; Bauer *et al.*, 2017) e na viabilidade do emprego do campo magnético para melhorar tanto a produção de lipídios.

Assim como Bauer *et al.* (2017), que obtiveram condições experimentais em que as culturas de microalgas expostas ao campo magnético não ocorreram diferença na produção de lipídios, neste estudo não foi possível observar uma diferença na produção de lipídios totais entre a cultura em biorreator exposta ao campo magnético de 3 kA/m e a cultura em biorreator sem exposição ao campo. Bem como nas culturas em biorreator com reciclo em formato em U expostas ao campo de 3 kA/m e 9 kA/m e a cultura em biorreator com reciclo e sem exposição

ao campo (Figura 19). Isso demonstra a complexidade do efeito biológico do campo magnético aplicado a culturas de microrganismos oleaginosos. Havendo necessidade de mais estudos aprofundados e que explorem diferentes variáveis experimentais.

Contudo, pode-se observar que houve um aumento de 20,3 %, 31,6 %, 27,6 % e 36,4 % na produção de lipídios das culturas em biorreator com reciclo em formato em U exposto ao campo de 3 kA/m e 9 kA/m, em biorreator com reciclo em espiral exposto ao campo magnético de 6 kA/m e biorreator com reciclo e sem exposição ao campo magnético, respectivamente, em relação à cultura em biorreator sem exposição ao campo (Figura 19). Isto indica que o emprego do reciclo ao sistema experimental pode ter sido um fator importante para a produção do lipídio.

Portanto, apesar do campo magnético ter causado um efeito positivo na produção de lipídios, a condição que promoveu um maior aumento de lipídios foi a cultura de *Y. lipolytica* em biorreator com reciclo e sem exposição ao campo. Nesta condição, foi possível obter 542,25 mg de lipídios/ L de meio, que correspondeu a cerca de 25 % de rendimento do produto em relação à biomassa seca. Justamente, nesta condição ocorreu uma restrição no crescimento causada pelo estresse mecânico do reciclo da suspensão celular (Figura 13).

Segundo Beopoulos *et al.* (2009^a), os microrganismos oleaginosos começam a acumular lipídios quando um nutriente do meio se torna limitante e a fonte de carbono está em excesso (Beopoulos *et al.*, 2009^a). Que é o caso deste estudo, a fonte de nitrogênio foi utilizada como nutriente limitante e a fonte de carbono esteve em excesso. A limitação de nitrogênio é geralmente usada em estudos de acúmulo de lipídios em microrganismos, pois este é essencial para a síntese de proteínas e ácidos nucleicos necessários para a proliferação celular (Hapeta *et al.*, 2020; Beopoulos *et al.*, 2009^a). Este processo é, portanto, retardado pela limitação de nitrogênio. No entanto, em condições de limitação de nitrogênio, a taxa de crescimento catalítico diminui rapidamente, enquanto a taxa de assimilação de carbono diminui mais gradualmente. Isso resulta na canalização preferencial do carbono para a síntese de lipídios, levando a um acúmulo de triacilgliceróis dentro de corpos lipídicos discretos nas células (Hapeta *et al.*, 2020; Beopoulos *et al.*, 2009^a).

De fato, Sestric *et al.* (2014) puderam observar que as concentrações de nitrogênio diminuíram dentro de 24 h nas culturas em meio mínimo de nutrientes e durante este período o substrato foi consumido lentamente. Enquanto, nas culturas em meio rico (YP), a concentração de nitrogênio aumentou quando a fonte de carbono do meio tornou-se limitante (Sestric *et al.*, 2014).

Durante a transição entre a fase logarítmica do crescimento e a fase de acúmulo de lipídios, em que ocorre a diminuição da taxa de crescimento devido à limitação de nutrientes e desvio do excesso de carbono para a produção de lipídios, algumas vias são reprimidas, enquanto outras são induzidas, como a via de síntese de ácidos graxos. Esta transição é induzida pelo estabelecimento da limitação de nitrogênio (Beopoulos *et al.*, 2009^a).

4.3.4 Composição dos ácidos graxos

A análise da composição dos ácidos graxos do lipídio microbiano no cromatógrafo gasoso permitiu identificar 8 picos principais correspondentes a 8 ácidos graxos. Sendo estes: 6 ácidos graxos saturados (AGS): ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0), ácido araquidônico (C20:0), ácido beénico (C22:0), ácido lignocérico (C24:0) e 2 ácidos graxos insaturados (AGI): ácido palmitoleico (C16:1) e ácido oleico (C18:1). Os cromatogramas de identificação dos ácidos graxos de cada condição experimental são apresentados no Apêndice. As diferentes proporções dos ácidos graxos identificados estão resumidas na Tabela 5.

Os dados obtidos das proporções de ácidos graxos exibidos pela *Y. lipolytica* vão de acordo com valores relatados anteriormente pela literatura de C16:0 e C18:ins (Sarantou *et al.*, 2021; Pereira *et al.*, 2021; Juszczuk *et al.*, 2019). Este estudo apresentou uma vantagem significativa na composição de ácidos graxos para potencial emprego na produção de biodiesel por esta se assemelhar à composição de ácidos graxos de óleos vegetais. Alguns trabalhos apontam como uma característica do lipídio da levedura *Y. lipolytica* possuir a composição semelhante aos óleos vegetais com predominância de ácidos graxos saturados e ácidos graxos monoinsaturados (Barbanera *et al.*, 2021; Magdouli *et al.*, 2020; Zhu e Jackson, 2015).

Tabela 5- Porcentagem da composição dos ácidos graxos do lipídio total produzido pela *Y. lipolytica* nas diferentes condições experimentais

Experimento	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:ins	C20:0	C22:0	C24:0	AGS	AGI	AG Total
Reciclo em U 9 kA/m	0,95	16,09	8,72	3,72	63,62	0,50	0,33	1,56	23,16	72,34	95,50
Biorreator 9 kA/m	2,77	17,76	8,96	2,70	60,63	0,40	0,42	1,14	25,20	69,60	94,80
Reciclo em Espiral 6 kA/m	1,38	16,22	7,18	4,25	65,64	0,19	0,34	1,02	23,40	72,82	96,22
Reciclo em U 3 kA/m	1,54	16,36	8,62	3,67	63,41	0,51	0,30	1,13	23,51	72,03	95,54
Biorreator 3 kA/m	1,70	17,79	9,04	3,57	61,63	0,38	0,33	1,08	24,86	70,67	95,53
Controle Reciclo em U	2,52	18,41	8,91	2,16	59,19	0,69	0,45	2,14	26,38	68,10	94,48
Controle Biorreator	2,15	17,67	8,36	3,50	60,40	0,62	0,52	1,42	25,88	68,76	94,64

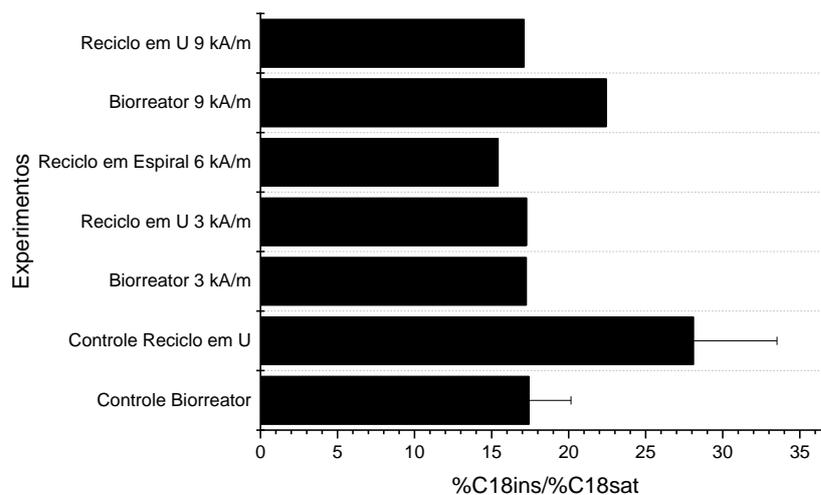
Foi possível observar uma variação na proporção entre C18:ins/C18:sat nos lipídios totais produzidos por *Y. lipolytica* na condição em que a cultura em biorreator foi exposta ao campo magnético de 9 kA/m, ocorrendo um aumento de 28,76 % em relação à cultura em biorreator sem exposição ao campo (Figura 20a). Além disso, ocorreu um aumento de 61,14 % na proporção entre C18:ins/C18:sat na cultura em biorreator com reciclo sem exposição ao campo magnético em relação à cultura em biorreator sem exposição ao campo (Figura 20a).

Como também foi possível observar um aumento na proporção entre C16:1/C16:0 nas culturas expostas ao campo magnético. Sendo estes, um aumento de 6,6 % e 7,3 % nas culturas em biorreator sob exposição ao campo magnético de 9 kA/m e 3 kA/m, respectivamente, em relação à cultura em biorreator sem exposição ao campo (Figura 20b). E, um aumento de 10,8% e 7,7 % nas culturas em biorreator com reciclo sob exposição ao campo magnético de 9 kA/m e 3 kA/m, respectivamente, em relação à cultura em biorreator com reciclo sem exposição ao campo (Figura 20b).

Alguns pesquisadores também observaram que o campo magnético foi capaz de aumentar a proporção dos ácidos graxos insaturados em relação aos ácidos graxos saturados do lipídio de membrana da cultura de *Salmonella Hadar* (Mouhoub *et al.*, 2018; Mouhoub *et al.*, 2017; Mihoub *et al.*, 2012). Sendo que esta variação ocorreu devido ao aumento da proporção do ácido graxo C18, principalmente o ácido graxo C18:1 (Mouhoub *et al.*, 2018). Small *et al.* (2012) puderam observar um aumento de 40,9% na produção de C18:1 na cultura de *Chlorella kessleri* sob exposição ao campo magnético em relação ao controle.

Diferentemente, neste estudo, o aumento da proporção de C18:ins/C18:sat se deu principalmente pela diminuição da proporção do ácido graxo saturado C18. Na cultura em biorreator exposta ao campo magnético de 9 kA/m, ocorreu uma diminuição de 22,77 % do ácido graxo saturado C18 em relação à cultura em biorreator sem exposição ao campo.

a)



b)

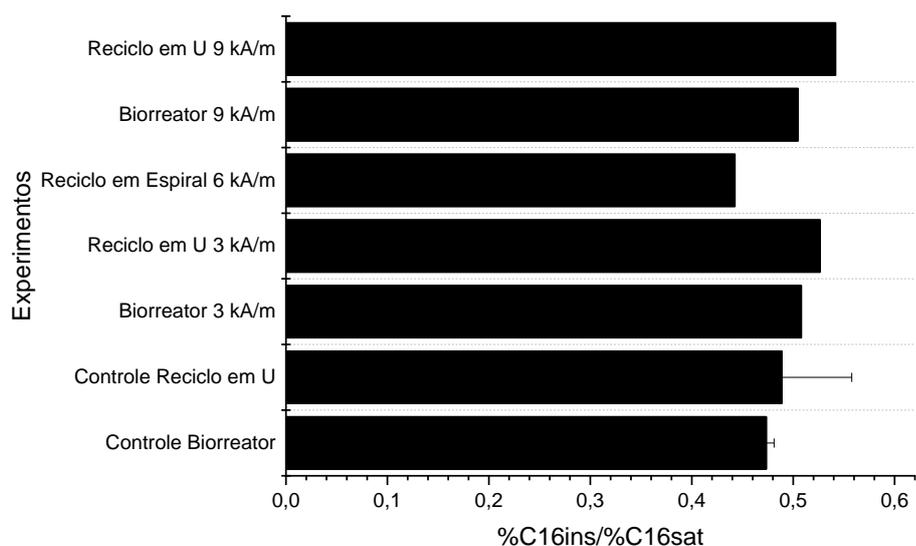


Figura 20- Relação dos ácidos graxos insaturados/ ácidos graxos saturados do lipídio total produzido por *Y. lipolytica*. a) relação C18:1/C18:0; b) relação C16:1/C16:0.

4.3.5 Monitoramento da temperatura das bobinas

A intensidade da corrente que gera o campo magnético pode causar um aumento da temperatura das bobinas, dificultando a dissipação do calor no

sistema gerador de campo, o que pode interferir na temperatura estabelecida para o cultivo da levedura, que foi de 30 °C. Diante disso, foi realizado o monitoramento da temperatura das bobinas com uma câmera infravermelho de termovisor modelo E40 FLIR, que mostrou que o campo magnético de menor intensidade, 3 kA/m, a temperatura das bobinas variou de 22 a 29 °C durante as 6 primeiras horas e as 12 primeiras horas de cultivo sob exposição ao campo magnético do primeiro dia, assim como no segundo dia de cultivo (Figura 21 e 23).

Entretanto, quando o campo magnético de 9 kA/m foi aplicado ao sistema, ocorreu o aquecimento das bobinas para cerca de 32 °C (Figura 22 e 24). Portanto, conforme previsto, com o aumento da intensidade do campo magnético houve um aumento na temperatura das bobinas. Enquanto que a temperatura das bobinas quando o campo magnético de 6 kA/m foi aplicado variou de 26 a 33°C ao longo do período de exposição (Figura 25).

Contudo, esse aquecimento gerado nas bobinas parece não ter sido capaz de interferir na temperatura da cultura, que ficou em torno de 30 °C. Indicando que o banho ultratermostático conseguiu manter a temperatura da cultura.

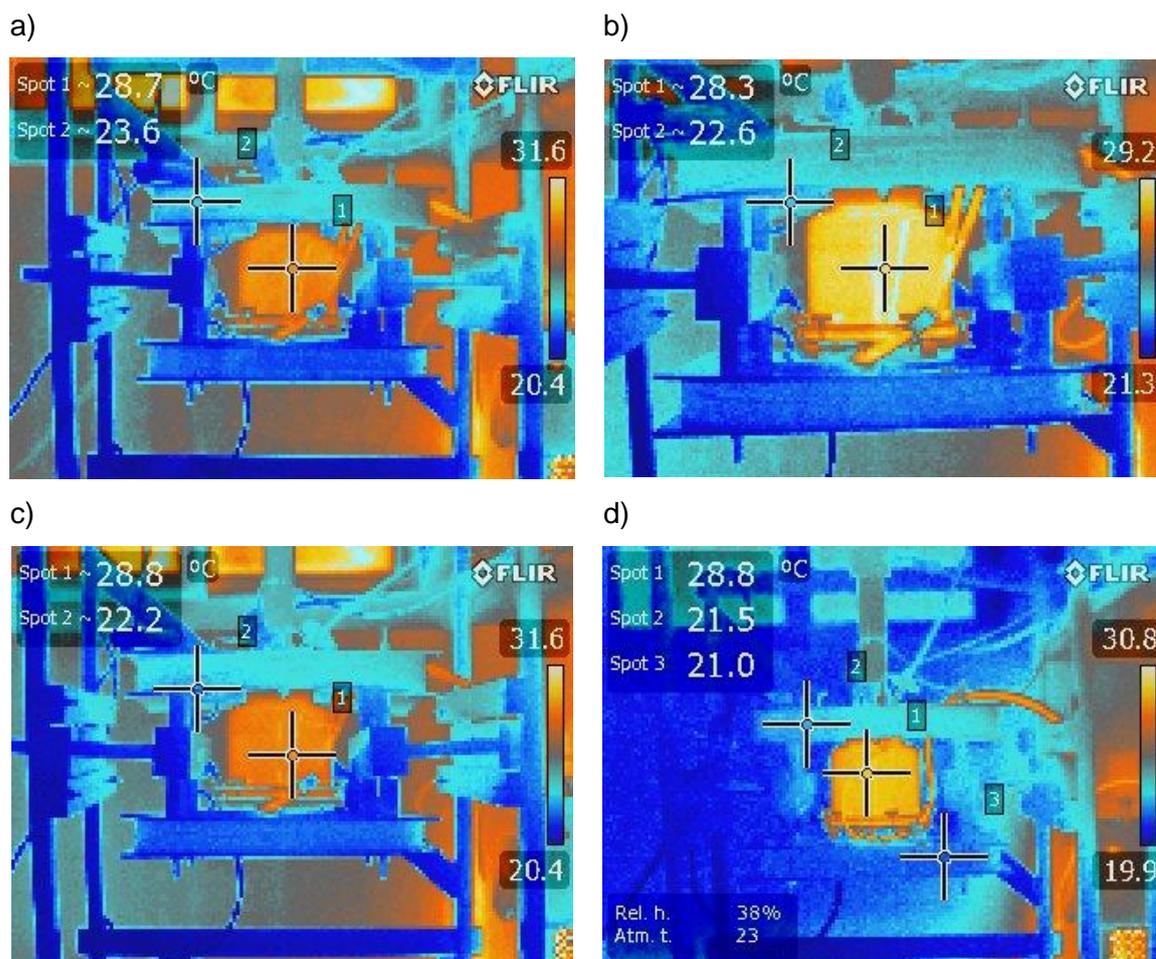


Figura 21- Monitoramento da temperatura das bobinas e do meio de cultivo da cultura em biorreator sob exposição ao campo magnético de 3 kA/m utilizando câmera de infravermelho de termovisor modelo E40 FLIR. a) após 6 h de exposição ao campo do primeiro dia; b) após 12 h de exposição ao campo do primeiro dia; c) após 6 h de exposição ao campo do segundo dia; d) após 12 h de exposição ao campo do segundo dia.

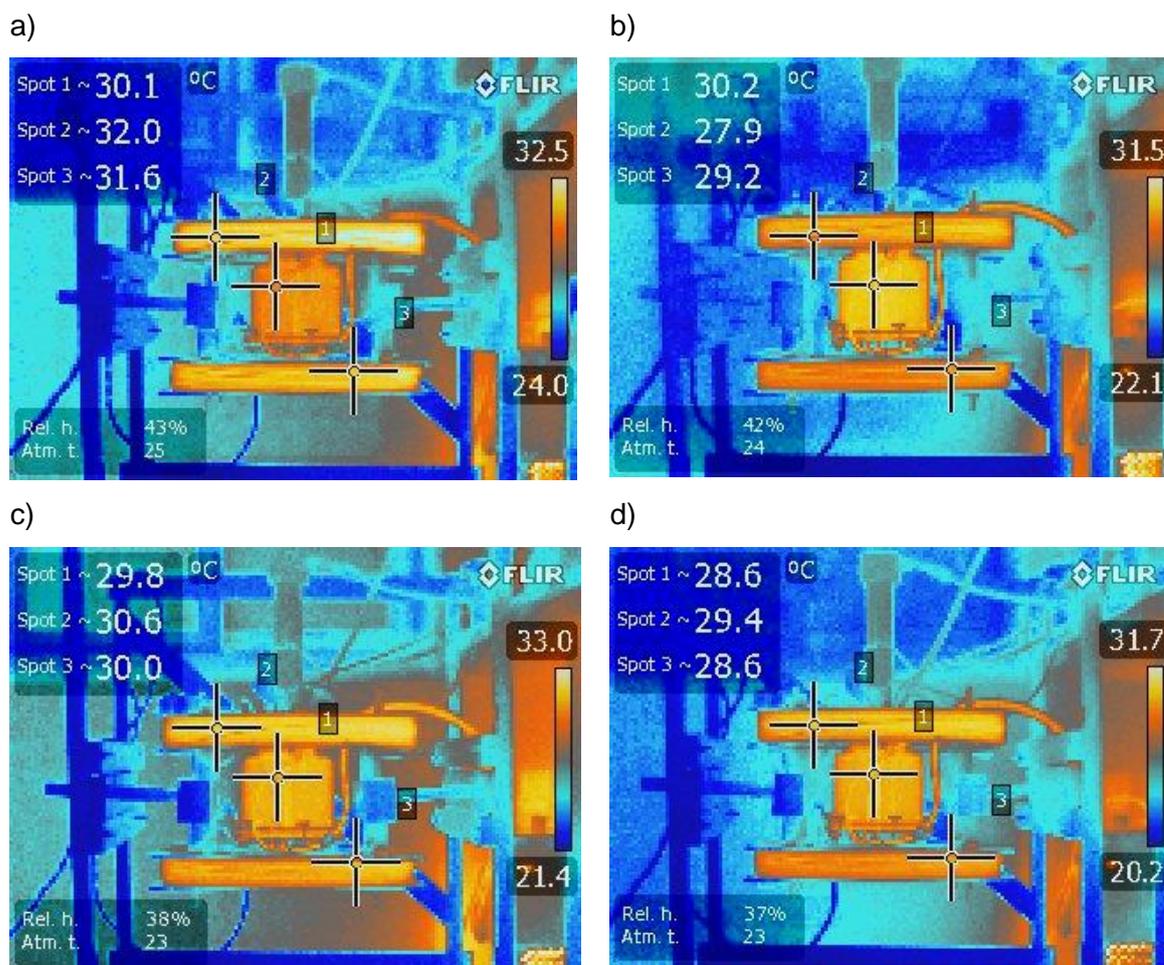


Figura 22- Monitoramento da temperatura das bobinas e do meio da cultura em biorreator sob exposição ao campo magnético de 9 kA/m utilizando câmera de infravermelho de termovisor modelo E40 FLIR. a) após 6 h de exposição ao campo do primeiro dia; b) após 12 h de exposição ao campo do primeiro dia; c) após 6 h de exposição ao campo do segundo dia; d) após 12 h de exposição ao campo do segundo dia.

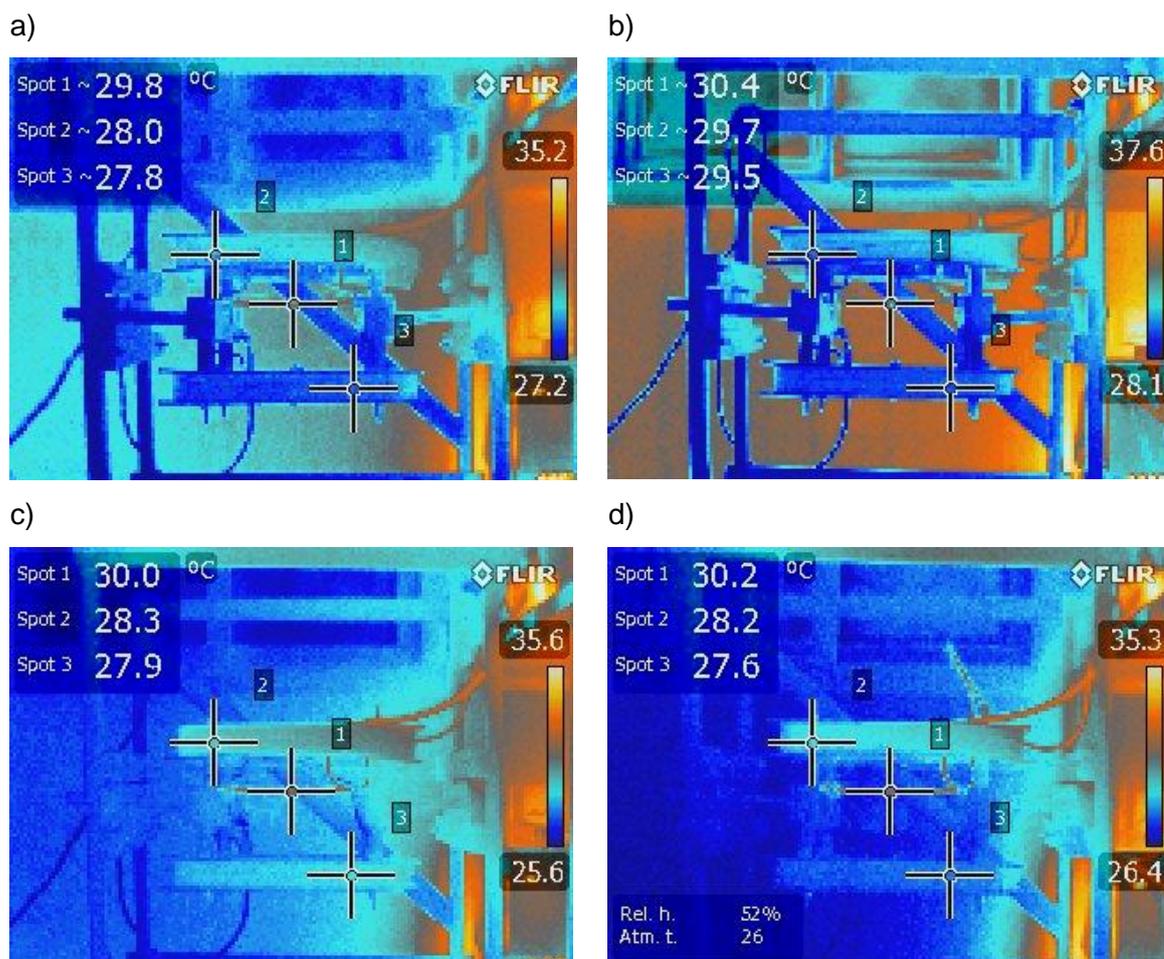


Figura 23- Monitoramento da temperatura das bobinas e do meio da cultura em biorreator com reciclo em formato U sob exposição ao campo magnético de 3 kA/m utilizando câmera de infravermelho de termovisor modelo E40 FLIR. a) após 6 h de exposição ao campo do primeiro dia; b) após 12 h de exposição ao campo do primeiro dia; c) após 6 h de exposição ao campo do segundo dia; d) após 12 h de exposição ao campo do segundo dia.

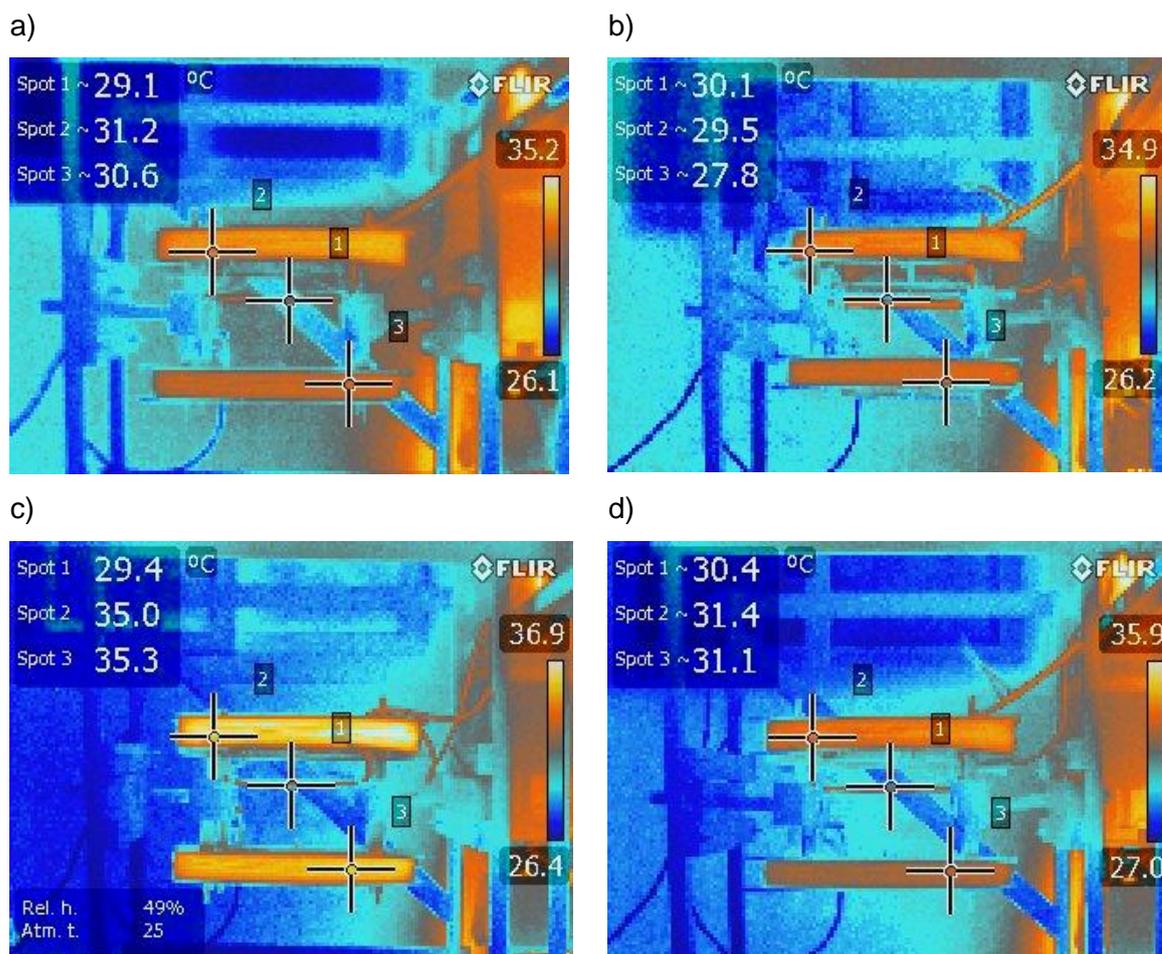


Figura 24- Monitoramento da temperatura das bobinas e do meio da cultura em biorreator com reciclo em formato U sob exposição ao campo magnético de 9 kA/m utilizando câmera de infravermelho de termovisor modelo E40 FLIR. a) após 6 h de exposição ao campo do primeiro dia; b) após 12 h de exposição ao campo do primeiro dia; c) após 6 h de exposição ao campo do segundo dia; d) após 12 h de exposição ao campo do segundo dia.

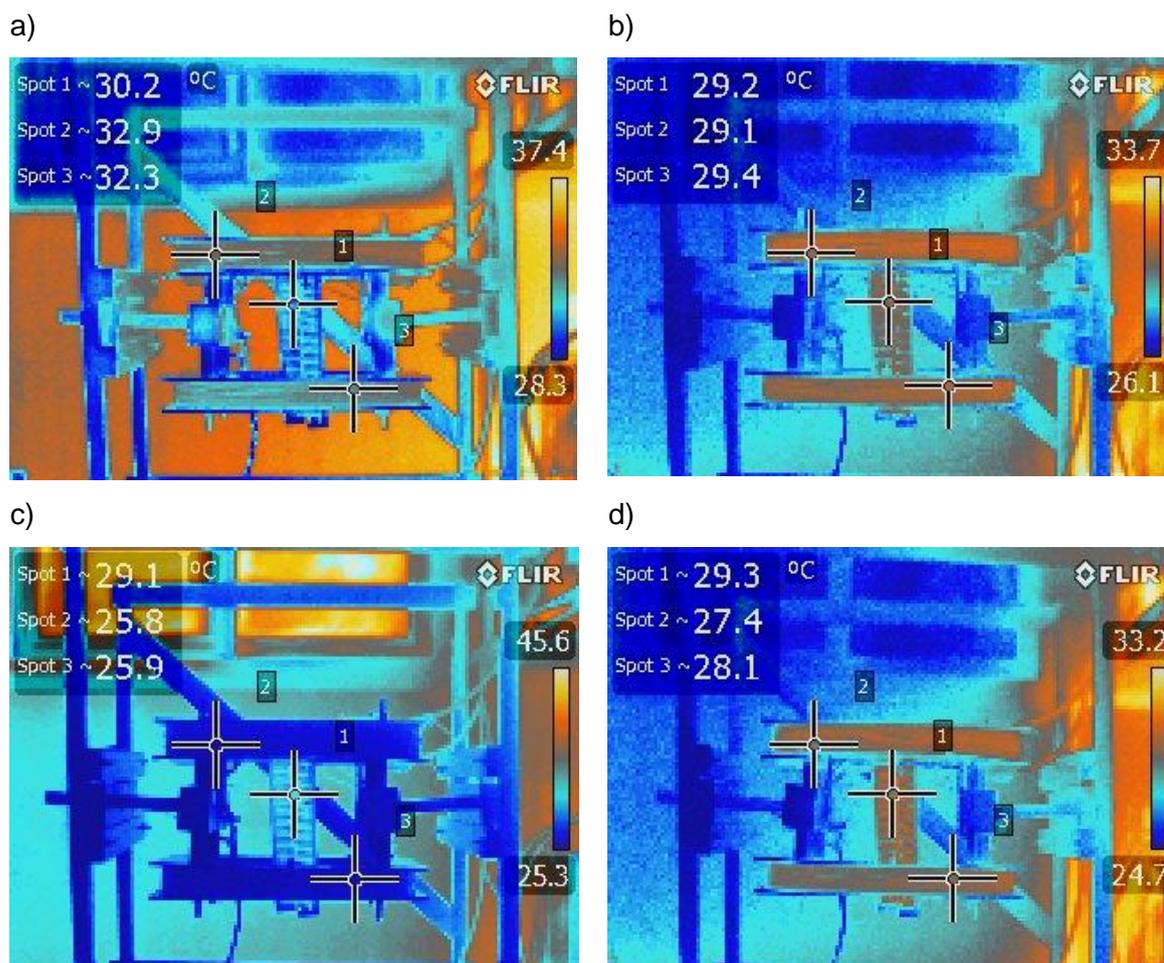


Figura 25- Monitoramento da temperatura das bobinas e do meio da cultura em biorreator com reciclo em espiral sob exposição ao campo magnético de 6 kA/m utilizando câmera de infravermelho de termovisor modelo E40 FLIR. a) após 6 h de exposição ao campo do primeiro dia; b) após 12 h de exposição ao campo do primeiro dia; c) após 6 h de exposição ao campo do segundo dia; d) após 12 h de exposição ao campo do segundo dia.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos neste estudo pode-se concluir que a configuração do biorreator com reciclo em U causou uma restrição no crescimento celular da levedura *Y. lipolytica* em relação à cultura em biorreator sem reciclo, e que a exposição do campo magnético na cultura de *Y. lipolytica* foi capaz de alterar a performance da cinética de crescimento da levedura.

As culturas em biorreator expostas ao campo magnético de 3 e 9 kA/m e em biorreator com reciclo em espiral exposto ao campo magnético de 6 kA/m tiveram o crescimento celular afetado negativamente. Contudo, na condição em que a cultura em biorreator foi exposta ao campo magnético de 9 kA/m ocorreu um aumento de 29,2 % na produção de lipídios em relação ao controle.

Por outro lado, a cultura em biorreator com reciclo em U exposta ao campo magnético de 3 kA/m teve o crescimento celular afetado positivamente em relação ao seu respectivo controle. No entanto, ocorreu uma diminuição no crescimento quando o campo magnético de 9 kA/m foi exposto à cultura em biorreator com reciclo em U. Neste contexto, a exposição do campo magnético de 3 kA/m na cultura em biorreator com reciclo favoreceu o crescimento celular.

Em relação à produção de lipídios pela levedura *Y. lipolytica* pode-se concluir que a condição de biorreator com reciclo sem exposição ao campo magnético obteve maior quantidade de lipídio microbiano, atingindo 542,25 mg de lipídios/ L de meio, e que não houve diferença na composição de ácidos graxos entre as diferentes condições experimentais.

6. RECOMENDAÇÕES

- Avaliar a produção do lipídio em diferentes horas de cultivo nas diferentes condições experimentais estudadas. A fim de verificar se nestas condições, o campo magnético estaria afetando não só o crescimento celular, como também a produção de lipídios ao longo do tempo de cultivo.
- Realizar estudos com planejamento experimental que abrangem diferentes parâmetros do campo magnético, como: a intensidade de campo magnético (H), o tempo de exposição (t), orientação das linhas de campo, entre outros;
- Conduzir estudos de análise técnico-econômica para verificar os benefícios econômicos que podem ser gerados com a implantação desta tecnologia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Mawgoud, A.M., Markham, K.A., Palmer, C.M., Liu, N., Stephanopoulos, G., Alper, H.S. (2018) Metabolic engineering in the host *Yarrowia lipolytica*. *Metabolic Engineering*, 50:192-208.
- Al-Hawash, A.B., Li, S., Zhang, X., Zhang, X., Ma, F. (2018) Productivity of γ -Linoleic acid by oleaginous fungus *Cunninghamella echinulata* using a pulsed high magnetic field. *Food Bioscience*, 21:1–7.
- Alvarez, D.C., Perez, V.H., Justo, O.R., Alegre, R.M. (2006) Effect of the extremely low frequency magnetic field on nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* using cheese whey permeate. *Process Biochemistry* 41(9):1967-1973.
- Atmanli. A. (2020) Experimental comparison of biodiesel production performance of two different microalgae. *Fuel*, 278:118311.
- Baldev, E., MubarakAli, D., Sivasubramanian, V., Pugazhendhi, A., Thajuddin, N. (2021). Unveiling the induced lipid production in *Chlorella vulgaris* under pulsed magnetic field treatment. *Chemosphere*, 279, 130673.
- Bankar, A.V., Kumar, A.R., Zinjarde, S.S. (2009) Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 84(5):847-865.
- Barbanera, M., Castellini, M., Tasselli, G., Turchetti, B., Cotana, F., Buzzini, P. (2021) Prediction of the environmental impacts of yeast biodiesel production from cardoon stalks at industrial scale. *Fuel*, 283:118967.
- Barbosa-Canovas, G.V., Pothakamury, U.R, Palou, E., Swanson, B.G. (1998) Nonthermal Preservation of Foods, In: Marcel Dekker. *Drying Technology*. 1st Edition. New York: CRC Press, p. 451-452.

- Barbosa-Canovas, G.V., San-Martin, M.F., Harte, F., Swanson, B.G. (2001) Magnetic Fields as a potencial non-thermal technology for the inactivation of microorganisms. *In: Juneja, V.K., Sofos, J.N. (eds) Control of Foodborne Microorganisms*, New York: Marcel Dekker, Inc, p. 399-418.
- Barta, D.G., Coman, V., Vodnar, D.C. (2021) Microalgae as sources of omega-3 polyunsaturated fatty acids: Biotechnological aspects. *Algal Research*, 58:102410.
- Barth, G., Gaillardin, C. (1997) Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiology Ver*, 19(4):219-237.
- Bauer, L.M., Costa, J.A.V., da Rosa, A.P.C., Santos, L.O. (2017) Growth stimulation and synthesis of lipids, pigments and antioxidants with magnetic fields in *Chlorella kessleri* cultivations. *Bioresource Technology*, 244:1425-1432.
- Bellou, S., Makri, A., Triantaphyllidou, I.-E., Papanikolaou, S., Aggelis, G. (2014) Morphological and metabolic shifts of *Yarrowia lipolytica* induced by alteration of the dissolved oxygen concentration in the growth environment. *Microbiology*, 160:807-817.
- Benavente-Valdés, J.R., Aguilar, C., Contreras-Esquivel, J.C., Méndez-Zavala, A., Montañez, J. (2016) Strategies to enhance the production of photosynthetic pigments and lipids in chlorophyceae species. *Biotechnology Reports*, 10:117-125.
- Beopoulos, A., Cescut, J., Haddouche, R., Uribelarra, J.L., Jouve, C.M., Nicaud, J.M. (2009^a) *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Progress in Lipid Research*, 48(6):375-387.
- Beopoulos, A., Chardot, T., Nicaud, J.M. (2009^b) *Yarrowia lipolytica*: a model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. *Biochimie*, 91(6):692-696.
- Bermúdez-Aguirre, D., Justo, O.R., Perez, V.H., Garcia-Perez, M., V. Barbosa-Cánovas, G. (2016) Use of Magnetic Fields Technology in Food Processing and Preservation. *In: Varzakas, T., Tzia, C. (eds.) Handbook of Food Processing: Food Preservation*. 1st Edition. Taylor & Francis Group, LLC, p. 509- 516.
- Bharathiraja, B., Sridharan, S., Sowmya, V., Yuvaraj, D., Praveenkumar, R. (2017) Microbial Oil - A Plausible Alternate Resource for Food and Fuel Application. *Bioresource Technology*, 233:423-432.
- Bhatia, S.K., Gurav, R., Choi, Y.-K., Lee, H.-J., Kim, S.H., Suh, M.J., Cho, J.Y., Ham S., Lee, S.H., Choi, K.-Y., Yang, Y.-H. (2021) *Rhodococcus* sp. YHY01 a microbial cell factory for the valorization of waste cooking oil into lipids a feedstock for biodiesel production. *Fuel*, 301:0016-2361.

- Bligh, E.G., Dyer, J.W. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8):911- 917.
- Chen, L., Zhang, Y., Liu, G.-L., Chi, Z., Hu, Z., Chi, Z.-M. (2020) Cellular lipid production by the fatty acid synthase-duplicated *Lipomyces kononenkoae* BF1S57 strain for biodiesel making. *Renewable Energy*, 151:707-714.
- Chen, Y.-H., Huang, B.-Y., Chiang T.-H., Tang T.-C. (2012) Fuel properties of microalgae (*Chlorella protothecoides*) oil biodiesel and its blends with petroleum diesel. *Fuel*, 94:270-273.
- Chu, F.-J., Wan, T.-J., Pai, T.-Y., Lin H.-W., Liu, S.-H., Huang, C.-F. (2020) Use of magnetic fields and nitrate concentration to optimize the growth and lipid yield of *Nannochloropsis oculata*. *Journal of Environmental Management*, 253:109680.
- Cogo, A.J.D., Façanha, A.R., Teixeira, L.R.S., de Souza, S.B., da Rocha, J.G., Figueira, F.F., Eutrópio, F.J., Bertolazi, A.Az., de Rezende, C.E., Krohling, C.A., Okorokov, L.A., Cruz, C., Ramos, A.C., Okorokova-Façanha, A.L. (2020) Plasma membrane H⁺ pump at a crossroads of acidic and iron stresses in yeast-to-hypha transition, *Metallomics*, 12:2174–2185.
- Costa, S.S., Peres, B.P., Machado, B.R., Costa, J.A.V., Santos, L.O. (2020) Increased lipid synthesis in the culture of *Chlorella homosphaera* with magnetic fields application. *Bioresource Technology*, 315:123880.
- David, G.F., Perez, V.H., Justo, O.R., Cubides, D.C., Cardona, C.A., Hristov, J. (2016) Glycerol bioconversion in unconventional magnetically assisted bioreactor seeking whole cell biocatalyst (intracellular lipase) production. *Chemical engineering research and design*, 3:243-252.
- de Andrade, C.M., Cogo, A.J.D., Perez, V.H., dos Santos, N.F., Okorokova-Façanha, A.L., Justo, O.R., Façanha, A.R. (2021) Increases of bioethanol productivity by *S. cerevisiae* in unconventional bioreactor under ELF-magnetic field: New advances in the biophysical mechanism elucidation on yeasts. *Renewable Energy*, 169:836-842.
- Dujon, B. et al. (2004) Genome evolution in yeasts. *Nature*, 430:35–44.
- Fawzy, M.A., Alharthi, S. (2021) Use of Response Surface Methodology in optimization of biomass, lipid productivity and fatty acid profiles of marine microalga *Dunaliella parva* for biodiesel production. *Environmental Technology & Innovation*, 22:101485.
- Feng, X., Chen, Y., Lv, J., Han, S., Tu, R., Zhou, Xu., Jin, W., Ren, N. (2020) Enhanced lipid production by *Chlorella pyrenoidosa* through magnetic field pretreatment of wastewater and treatment of microalgae-wastewater culture solution: Magnetic field treatment modes and conditions. *Bioresource Technology*, 306:123102.

- Fickers, P., Benetti, P.H., Waché, Y., Marty, A., Mauersberger, S., Smit, M.S., Nicaud, J.M. (2005) Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Research*, 5:527–543.
- Gajdoš, P., Nicaud, J.-M., Rossignol, T., Čertík, M. (2015) Single cell oil production on molasses by *Yarrowia lipolytica* strains overexpressing DGA2 in multicopy. *Applied Microbiology Biotechnology*, 99(19):8065-74.
- Han, S., Jin, W., Chen, Y., Abomohra, A.E.-F. (2016) Enhancement of Lipid Production of *Chlorella Pyrenoidosa* Cultivated in Municipal Wastewater by Magnetic Treatment. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 180:1043–1055.
- Hapeta, P., Kerkhoven, E. J., Lazar, Z. (2020) Nitrogen as the major factor influencing gene expression in *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Reports*, 27:e00521.
- He, Y., Zhang, B., Guo, S., Guo, Z., Chen, B., Wang, M. (2020) Sustainable biodiesel production from the green microalgae *Nannochloropsis*: Novel integrated processes from cultivation to enzyme-assisted extraction and ethanolysis of lipids. *Energy Conversion and Management*, 209:112618.
- Hofmann, G.A. (1985) Deactivation of microorganisms by an oscillating magnetic field, United States Patent, MAXWELL LABORATORIES Inc A CORP OF DE PurePulse Technologies Inc., USA, p. 6.
- Hristov, J. and Perez, V. H. (2011) Critical Analysis of Data Concerning *Saccharomyces Cerevisiae* Free-Cell Proliferations and Fermentations Assisted by Magnetic and Electromagnetic Fields. *International Review of Chemical Engineering* 3:1-18.
- Juszczak, P., Rymowicz, W., Kita, A., Rywińska A. (2019) Biomass production by *Yarrowia lipolytica* yeast using waste derived from the production of ethyl esters of polyunsaturated fatty acids of flaxseed oil. *Industrial Crops and Products*, 138:111590.
- Kamineni, A., and Shaw, J. (2020) Engineering triacylglycerol production from sugars in oleaginous yeasts. *Current Opinion Biotechnology*, 62:239–247.
- Kanakdande, A.P., Khobragade, C.N., Mane, R.S. (2020) Utilization of pomegranate waste-peel as a novel substrate for biodiesel production by *Bacillus cereus* (MF908505). *Sustainable Energy Fuels*, 4:1199–1207.
- Kanakdande, A.P., Khobragade, C.N., Mane, R.S. (2021) Ultraviolet induced random mutagenesis in *Bacillus amyloliquefaciens* (MF 510169) for improving biodiesel production. *Fuel*, 304:121380.
- Konopacki, M., Rakoczy, R. (2019) The analysis of rotating magnetic field as a trigger of Gram-positive and Gram-negative bacteria growth. *Biochemical Engineering Journal*, 141:259-267.

- Kot, A.M., Gientka, I., Bzducha-Wróbel, A., Błażej, S., Kurcz, A. (2020) Comparison of simple and rapid cell wall disruption methods for improving lipid extraction from yeast cells. *Journal of Microbiological Methods*, 176:105999.
- Kumar, M., Thakur, I.S. (2018) Municipal secondary sludge as carbon source for production and characterization of biodiesel from oleaginous bacteria. *Bioresource Technology Reports*, 4:106-113.
- Kuttiraja, M., Dhouha, A., Tyagi, R.D. (2016) Kinetics of lipid production at lab scale fermenters by a new isolate of *Yarrowia lipolytica* SKY7. *Bioresource Technology*, 221:234–240.
- Lazar, Z., Liu, N., Stephanopoulos, G. (2018) Holistic Approaches in Lipid Production by *Yarrowia lipolytica*. *Trends Biotechnology*, 36:1157–1170.
- Lazar, Z., Walczak, E., Robak, M. (2011) Simultaneous production of citric acid and invertase by *Yarrowia lipolytica* SUC+ transformants. *Bioresource Technology*, 102(13):6982–6989.
- Ledesma-Amaro, R., Nicaud, J.-M. (2016) *Yarrowia lipolytica* as a biotechnological chassis to produce usual and unusual fatty acids. *Progress in Lipid Research*, 61:40–50.
- Lehninger, T.M., Nelson, D.L., Cox, M.M. (2014) *Princípios de Bioquímica*. 6ª Edição, Ed. Artmed.
- Leong, W.H., Lim, J.W., Lam, M.K., Uemura, Y., Ho, Y.C. (2018) Third generation biofuels: a nutritional perspective in enhancing microbial lipid production. *Renew Sustainable Energy Rev*, 91:950-961.
- Li, W., Ma, H., He, R., Ren, X., Zhou, C. (2021) Prospects and application of ultrasound and magnetic fields in the fermentation of rare edible fungi. *Ultrasonics Sonochemistry*, 76(1):105613.
- Lin, L., Wang, X., Cui, H. (2019) Action mechanism of pulsed magnetic field against *E. coli* O157:H7 and its application in vegetable juice. *Food Control*, 95:150-156.
- Magdoui, S., Guedri, T., Rouissi, T., Brar, S.K., Blais J.F. (2020) Sync between leucine, biotin and citric acid to improve lipid production by *Yarrowia lipolytica* on crude glycerol-based media. *Biomass Bioenergy*, 142:105764.
- Maia, E.L., Rodriguez-Amaya, D.B. (1994). Fatty acids of the total, neutral and phospholipids of the Brazilian freshwater fish *Prochilodus scrofa*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 7:240-251.
- Maza, D.D., Viñarta, S.C., García-Ríos, E., Guillamón, J.M., Aybar, M.J. (2021) *Rhodotorula glutinis* T13 as a potential source of microbial lipids for biodiesel generation. *Journal of Biotechnology*, 331:14–18.

- Menestrino, B.C., Sala, L., Costa, J.Á.V. (2021) Magnetic fields exhibit a positive impact on lipid and biomass yield during phototrophic cultivation of *Spirulina* sp. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 44:2087–2097.
- Mihoub, M., El May, A., Aloui, A., Chatti, A., Landoulsi A. (2012) Effects of static magnetic fields on growth and membrane lipid composition of *Salmonella typhimurium* wild-type and dam mutant strains. *International Journal Food Microbiology*, 157:259-266.
- Mouhoub, R.B., El May, A., Cheraief, I., Landoulsi A. (2017) Influence of static magnetic field exposure on fatty acid composition in *Salmonella Hadar*. *Microbiology Pathogen*, 180:13-20.
- Mouhoub, R.B., ElMay, A., Boujezza, I., Sethomb, M.M., Feki, M., Landoulsi, A. (2018) Viability and membrane lipid composition under a 57 mT static magnetic field in *Salmonella Hadar*. *Bioelectrochemistry*, 122:134-141.
- Munch, G., Sestric, R., Sparling, R., Levin, D.B., Cicek, N. (2015) Lipid production in the under-characterized oleaginous yeasts, *Rhodospiridium babjevae* and *Rhodospiridium diobovatum*, from biodiesel-derived waste glycerol. *Bioresource Technology*, 185:49-55.
- Nouri, H., Moghimi, H., Rad, M.N., Ostovar, M., Mehr, S.S.F., Ghanaatian, F., Talebi, A.F. (2019) Enhanced growth and lipid production in oleaginous fungus, *Sarocladium kiliense* ADH17: Study on fatty acid profiling and prediction of biodiesel properties. *Renewable Energy*, 135:10-20.
- Patel, A., Karageorgou, D., Rova, E., Katapodis, P., Rova, U., Christakopoulos, P., Matsakas, L. (2020) An overview of potential oleaginous microorganisms and their role in biodiesel and omega-3 fatty acid-based industries. *Microorganisms*, 8:434.
- Pereira, A.S., Miranda, S.M., Lopes, M., Belo I. (2021) Factors affecting microbial lipids production by *Yarrowia lipolytica* strains from volatile fatty acids: effect of co-substrates, operation mode and oxygen. *Journal Biotechnology*, 331:37-47.
- Qian, J., Zhou, C., Ma, H., Li, S., Yagoub, E.G.A., Abdualrahman, M.A.Y. (2016) Biological effect and inactivation mechanism of *Bacillus subtilis*, exposed to pulsed magnetic field: Morphology, membrane permeability and intracellular contents. *Food Biophysics*, 11(4):1-7.
- Qiao, K., Abidi, S.H.I., Liu, H., Zhang, H., Chakraborty, S., Watson, N Ajikumar, P.K., Stephanopoulos, G. (2015) Engineering lipid overproduction in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Metabolic Engineering*, 29:56–65.
- Rana, M.S., Prajapati S.K. (2021) Stimulating effects of glycerol on the growth, phycoremediation and biofuel potential of *Chlorella pyrenoidosa* cultivated in wastewater. *Environmental Technology & Innovation*, 24:102082.
- Rosen, A.D. (2003) Mechanism of action of moderate-intensity static magnetic fields on biological systems, *Cell Biochemistry and Biophysics*, 39(2):163-173.

- Ruiz-Herrera J.E., Sentandreu R. (2002) Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*. *Archives of Microbiology*, 178:477–483.
- Sarantou, S., Stoforos, N.G., Kalantzi, O., Papanikolaou S. (2021) Biotechnological valorization of biodiesel-derived glycerol: Trials with the non-conventional yeasts *Yarrowia lipolytica* and *Rhodospiridium* sp. *Carbon Resources Conversion*, 4:61-75.
- Sestric, R., Munch, G., Cicek, N., Sparling, R., Levin, D.B. (2014) Growth and neutral lipid synthesis by *Yarrowia lipolytica* on various carbon substrates under nutrient-sufficient and nutrient-limited conditions. *Bioresource Technology*, 164:41–46.
- Singh, S., Pandey, D., Saravanabhupathy, S., Daverey, A., Dutta, K., Arunachalam, K. (2021) Liquid wastes as a renewable feedstock for yeast biodiesel production: Opportunities and challenges. *Environmental Research*, 4:112100.
- Small, D. P., Hüner, N.P.A., Wan, W. (2012) Effect of Static Magnetic Fields on the Growth, Photosynthesis and Ultrastructure of *Chlorella kessleri* Microalgae. *Bioelectromagnetics*, 33:298-308.
- Socol, C.R., Neto, C.J.D., Socol, V.T., Sydney, E.B., da Costa E.S.F., Medeiros, A.B.P., Vandenberghe, L.P.S. (2017) 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*, 223:259–268.
- Spencer, J.F., Ragout de Spencer, A.L., Laluce, C. (2002) Non-conventional yeasts. *Applied Microbiology Biotechnology*, 58:147–156.
- Tang, H., Wang, P., Wang, H., Fang, Z., Yang, Q., Ni, W., Sun, X., Liu, H., Wang, L., Zhao, G., Zheng, Z. (2019) Effect of static magnetic field on morphology and growth metabolism of *Flavobacterium* sp. m1-14. *Bioprocess Biosystem Engineering*, 42:1923–1933.
- Tsigie, Y.A., Wang, C.-Y., Truong, C.-T., Ju, Y.-H. (2011) Lipid production from *Yarrowia lipolytica* Po1g grown in sugarcane bagasse hydrolysate. *Bioresource Technology*, 102:9216–9222.
- Wang, H-Y; Zeng, X-B; Guo, S-Y; Li, Z-T. (2008) Effects of magnetic field on the antioxidant defense system of recirculation-cultured *Chlorella vulgaris*. *Bioelectromagnetics*, 29:39–46.
- Wang, J., Ledesma-Amaro, R., Wei, Y., Ji, B., and Ji, X.-J. (2020) Metabolic engineering for increased lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica* – a review. *Bioresource Technology*, 313:123707.
- Yun, E.J., Lee, J., Kim, D.H., Kim, J., Kim, S., Jin, Y-S., Kim, K.H. (2018) Metabolomic elucidation of the effects of media and carbon sources on fatty

acid production by *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Biotechnology*, 272–273:7–13.

Zhang, S., Jagtap, S.S., Deewan, A., Rao, C.V. (2019) pH selectively regulates citric acid and lipid production in *Yarrowia lipolytica* W29 during nitrogen-limited growth on glucose. *Journal of Biotechnology*, 290:10-15.

Zhao, C., Gu, D., Nambou, K., Wei, L., Chen, J., Imanaka, T., Hua, Q. (2015) Metabolome analysis and pathway abundance profiling of *Yarrowia lipolytica* cultivated on different carbon sources. *Journal of Biotechnology*, 206:42–51.

Zhu, Q., Jackson, E.N. (2015) Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for industrial applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 36:65–72.

APÊNDICE

APÊNDICE- Cromatogramas da composição de ácidos graxos dos lipídios produzidos pela levedura *Y. lipolytica* NRRL-Y1095 nas diferentes condições experimentais

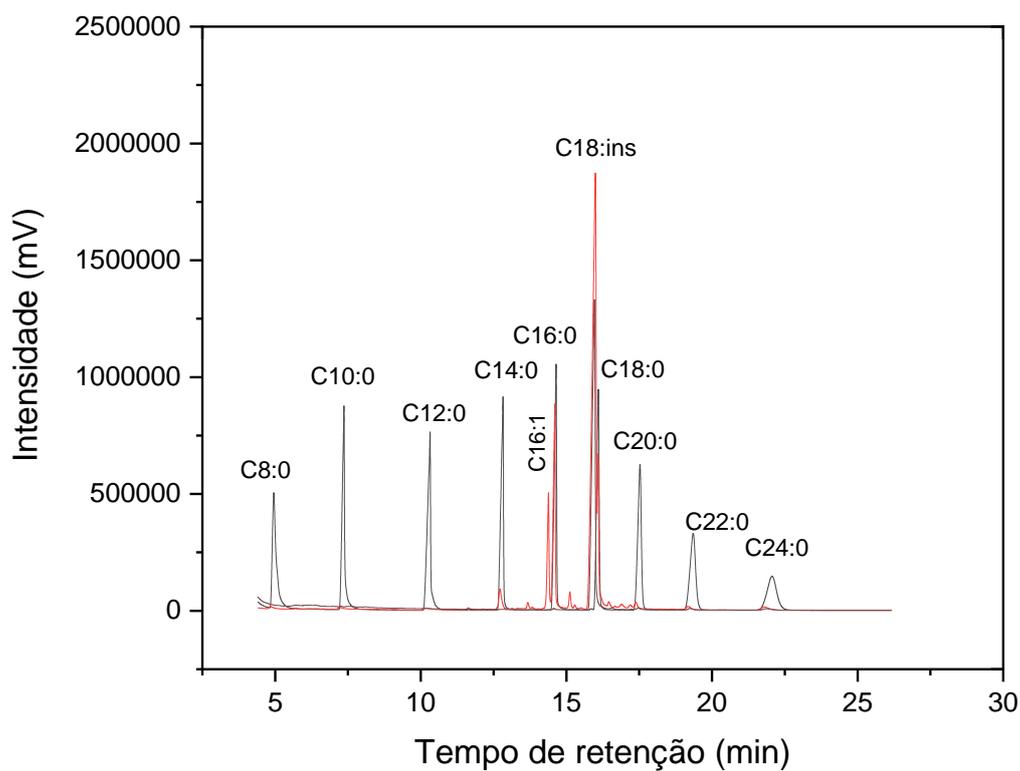


Figura 1A- Cromatograma da composição de ácidos graxos do lipídio produzido pela levedura *Y. lipolytica* NRRL-Y1095 em biorreator sem reciclo e exposição ao campo magnético (CONTROLE). Legenda: Preto- padrão de ésteres etílicos de ácidos graxos saturados de C8-C24 e do éster etílico do ácido graxo insaturado C18:1; Vermelho- ésteres etílicos de ácidos graxos do lipídio produzido pela levedura *Y. lipolytica* NRRL-Y1095.

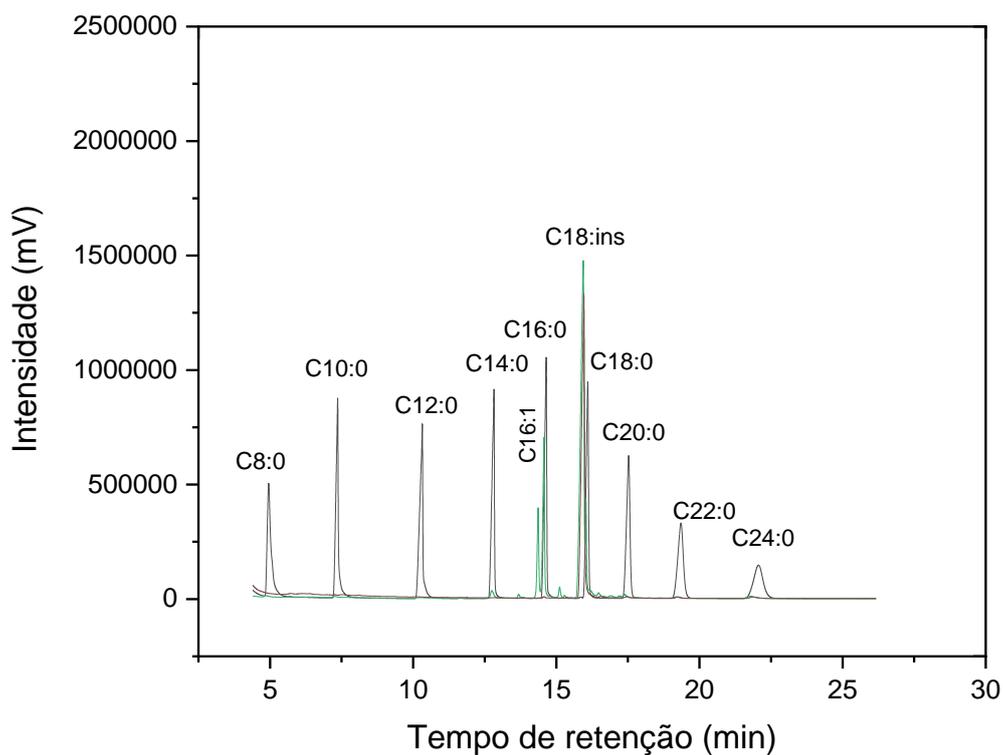


Figura 2A- Cromatograma da composição de ácidos graxos do lipídio produzido pela levedura *Y. lipolytica* NRRL-Y1095 em biorreator sem reciclo com exposição ao campo magnético de 3 kA/m. Legenda: Preto- padrão de ésteres etílicos de ácidos graxos saturados de C8-C24 e do éster etílico do ácido graxo insaturado C18:1; Verde- ésteres etílicos de ácidos graxos do lipídio produzido pela levedura *Y. lipolytica* NRRL-Y1095.

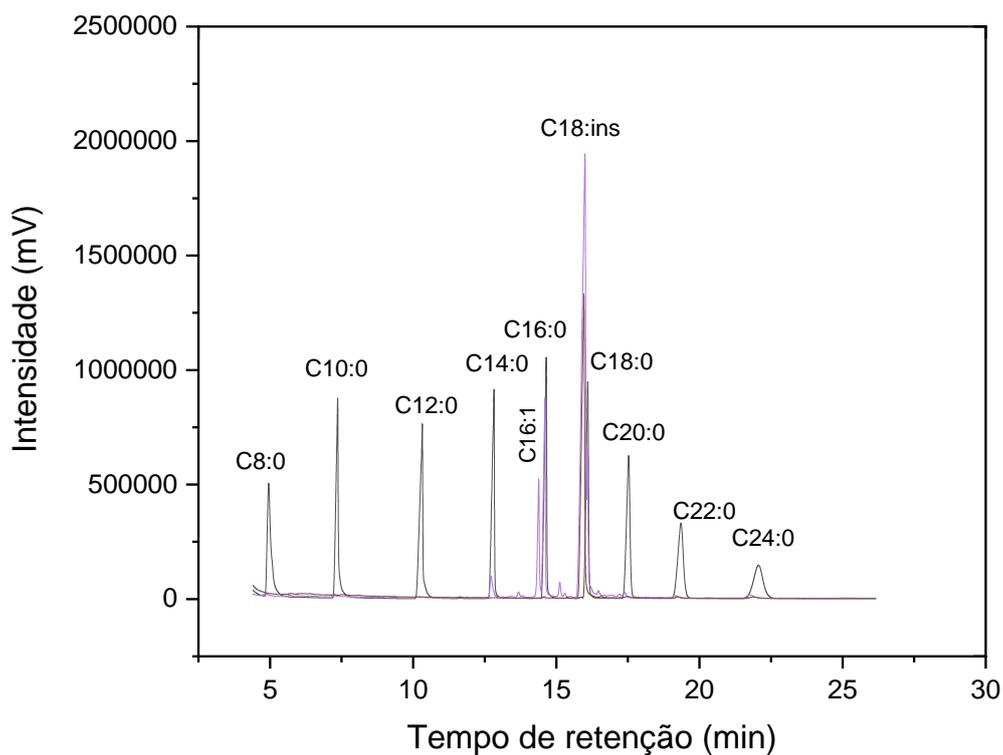


Figura 3A- Cromatograma da composição de ácidos graxos do lipídio produzido pela levedura *Y. lipolytica* NRRL-Y1095 em biorreator sem reciclo com exposição ao campo magnético de 9 kA/m. Legenda: Preto- padrão de ésteres etílicos de ácidos graxos saturados de C8-C24 e do éster etílico do ácido graxo insaturado C18:1; Roxo- ésteres etílicos de ácidos graxos do lipídio produzido pela levedura *Y. lipolytica* NRRL-Y1095.

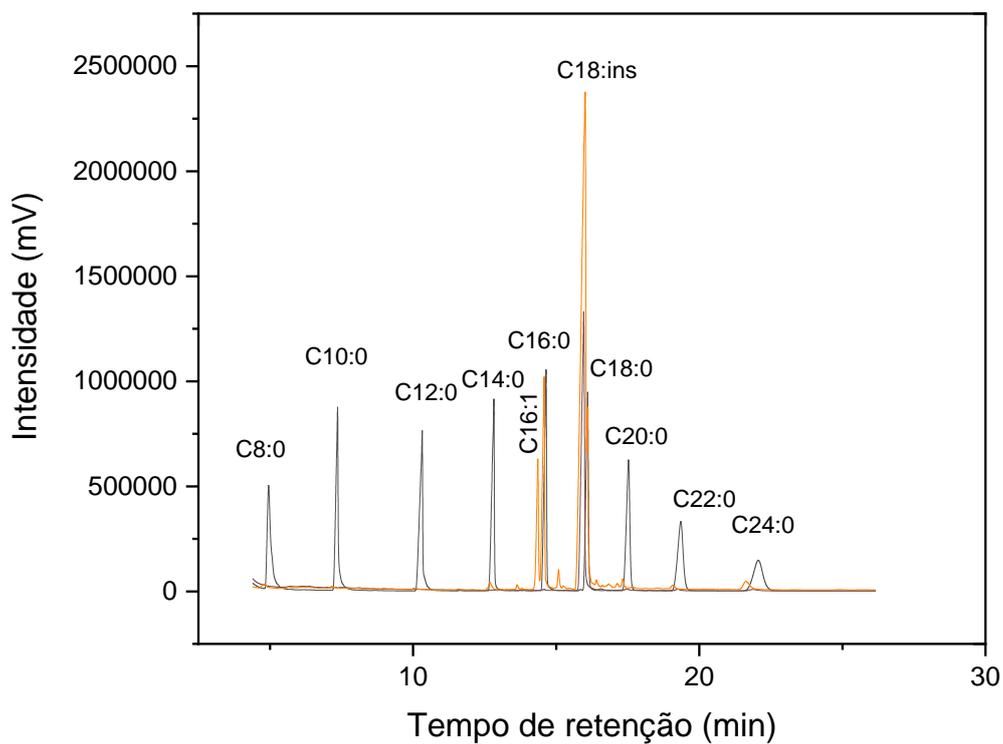


Figura 4A- Cromatograma da composição de ácidos graxos do lipídio produzido pela levedura *Y. lipolytica* NRRL-Y1095 em biorreator com reciclo e sem exposição ao campo magnético (CONTROLE). Legenda: Preto- padrão de ésteres etílicos de ácidos graxos saturados de C8-C24 e do éster etílico do ácido graxo insaturado C18:1; Laranja- ésteres etílicos de ácidos graxos do lipídio produzido pela levedura *Y. lipolytica* NRRL-Y1095.

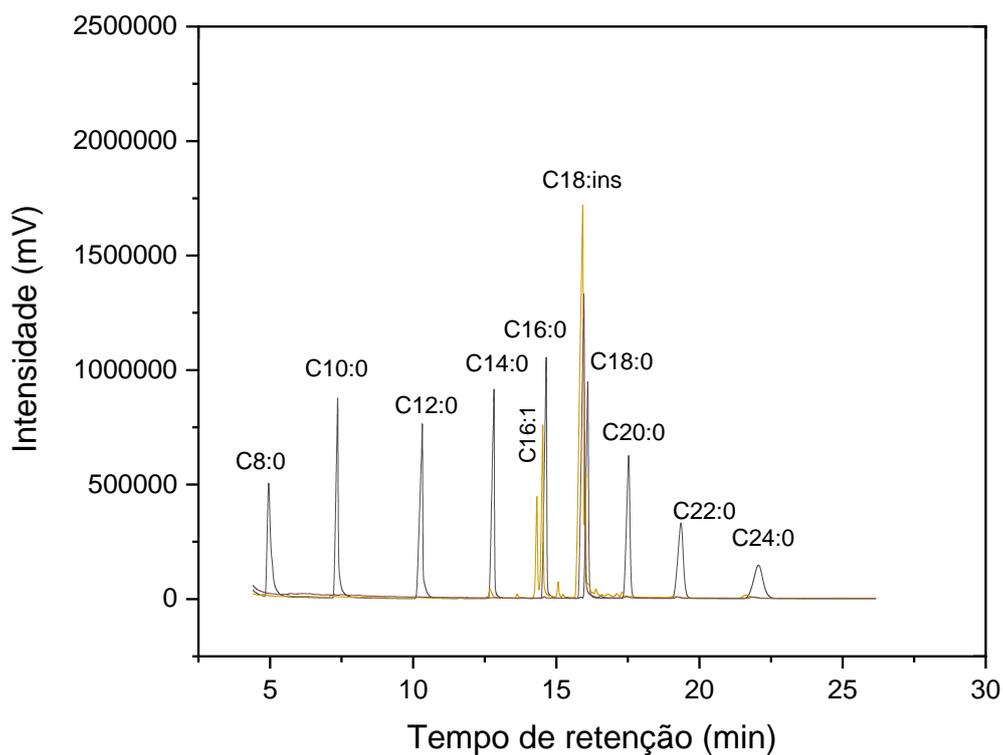


Figura 5A- Cromatograma da composição de ácidos graxos do lipídio produzido pela levedura *Y. lipolytica* NRRL-Y1095 em biorreator sem reciclo com exposição ao campo magnético de 3 kA/m. Legenda: Preto- padrão de ésteres etílicos de ácidos graxos saturados de C8-C24 e do éster etílico do ácido graxo insaturado C18:1; Amarelo- ésteres etílicos de ácidos graxos do lipídio produzido pela levedura *Y. lipolytica* NRRL-Y1095.

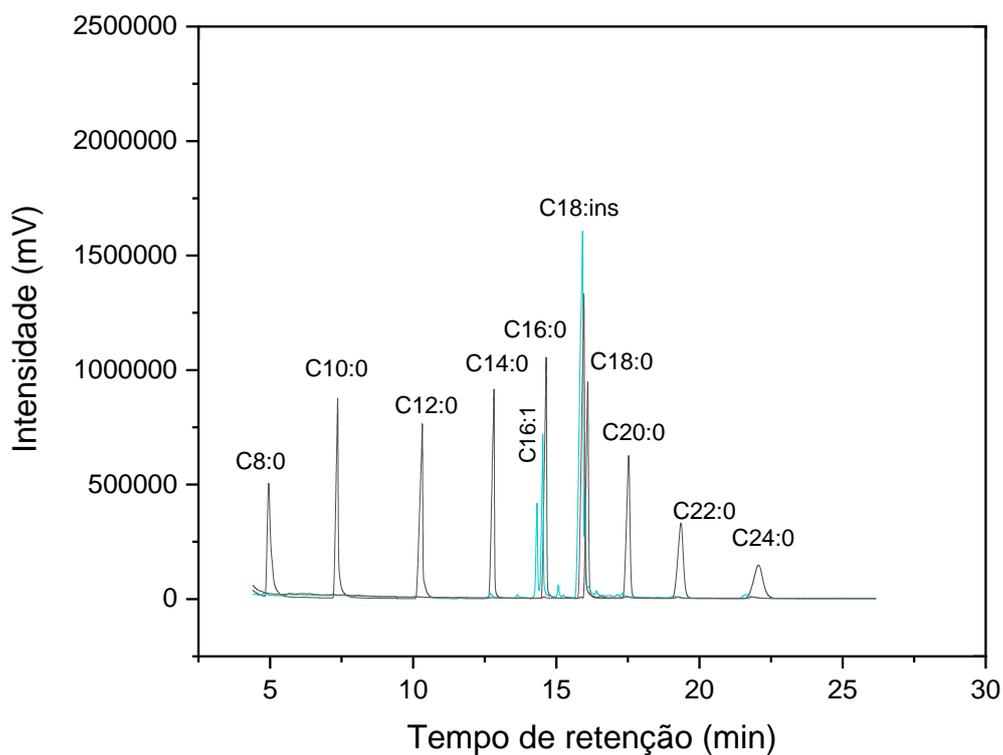


Figura 6A- Cromatograma da composição de ácidos graxos do lipídio produzido pela levedura *Y. lipolytica* NRRL-Y1095 em biorreator sem reciclo com exposição ao campo magnético de 9 kA/m. Legenda: Preto- padrão de ésteres etílicos de ácidos graxos saturados de C8-C24 e do éster etílico do ácido graxo insaturado C18:1; Azul- ésteres etílicos de ácidos graxos do lipídio produzido pela levedura *Y. lipolytica* NRRL-Y1095.

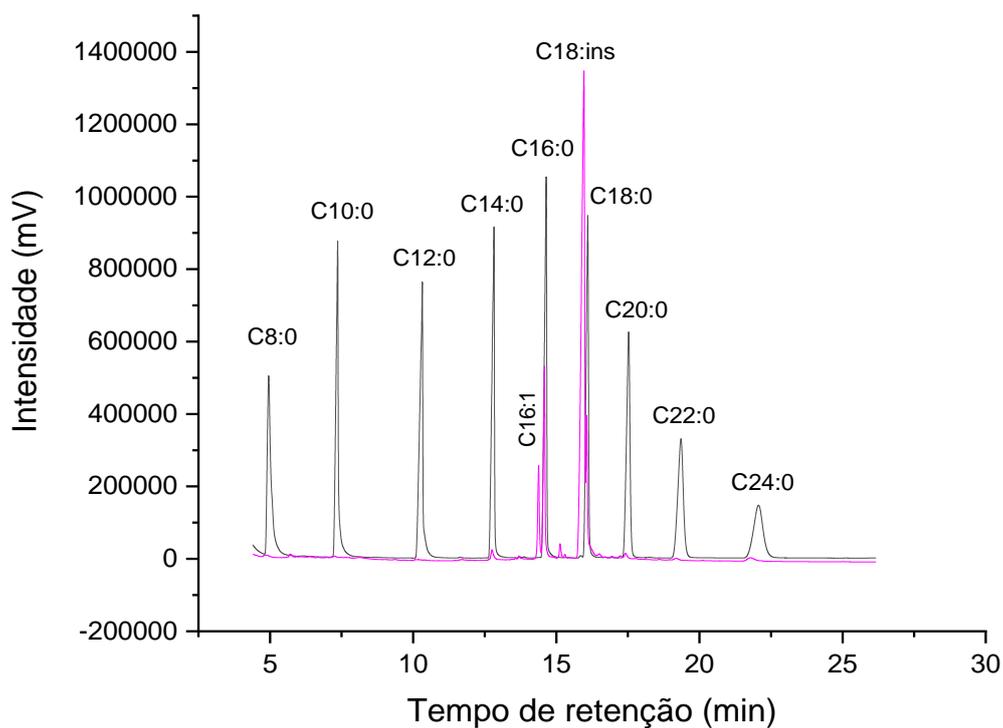


Figura 7A- Cromatograma da composição de ácidos graxos do lipídio produzido pela levedura *Y. lipolytica* NRRL-Y1095 em biorreator com reciclo em espiral com exposição ao campo magnético de 6 kA/m. Legenda: Preto- padrão de ésteres etílicos de ácidos graxos saturados de C8-C24 e do éster etílico do ácido graxo insaturado C18:1; Rosa- ésteres etílicos de ácidos graxos do lipídio produzido pela levedura *Y. lipolytica* NRRL-Y1095.