

**SAMUEL LESSA BARBOSA**

**DESENVOLVIMENTO DE UM MEIO DE CULTURA PARA A LEVEDURA  
OLEAGINOSA *Papiliotrema laurentii* COMBINANDO ANÁLISE DE BALANÇO DE  
FLUXO E EXPERIMENTO FATORIAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Wendel Batista da Silveira

Coorientadora: Rafaela Zandonade Ventorim

**VIÇOSA – MINAS GERAIS  
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

B238d  
2023  
Barbosa, Samuel Lessa, 1997-  
Desenvolvimento de um meio de cultura para a levedura  
oleaginosa *Papiliotrema laurentii* combinando análise de  
balanço de fluxo e experimento fatorial / Samuel Lessa Barbosa.  
– Viçosa, MG, 2023.

1 dissertação eletrônica (74 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Wendel Batista da Silveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Microbiologia, 2023.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.689>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Leveduras (Fungos). 2. Biomassa. 3. Lactose. 4. Ureia.  
I. Silveira, Wendel Batista da, 1979-. II. Universidade Federal de  
Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de  
Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 579.59

**SAMUEL LESSA BARBOSA**

**DESENVOLVIMENTO DE UM MEIO DE CULTURA PARA A LEVEDURA  
OLEAGINOSA *Papiliotrema laurentii* COMBINANDO ANÁLISE DE BALANÇO DE  
FLUXO E EXPERIMENTO FATORIAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal  
de Viçosa, como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola, para obtenção do título de *Magister  
Scientiae*.

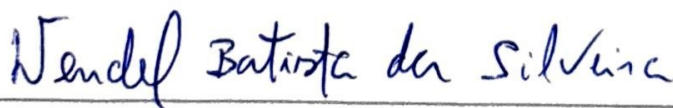
APROVADA: 27 de julho de 2023

Assentimento:



---

Samuel Lessa Barbosa  
Autor



---

Wendel Batista da Silveira  
Orientador

*Aos meus pais, Cleuza e Geraldo e a todos que estiveram ao meu lado.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ter me dado forças para superar os desafios.

Aos meus pais Geraldo Magela Barbosa e Cleuza Lessa Barbosa por todo apoio, incentivo e serem fonte de muita motivação e esperança.

À Universidade Federal de Viçosa, pela excelência em ensino, pesquisa e extensão.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao professor Wendel Batista da Silveira, pela orientação, incentivo, suporte e motivação.

À doutora Rafaela Zandonade Ventorim, pela coorientação, motivação, incentivo e auxílio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), pela concessão da bolsa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo auxílio financeiro.

Ao doutor Jimmy Soares, pela colaboração e considerações para com o trabalho.

Ao doutor Fernando Augusto da Silveira, pela colaboração e considerações para com o trabalho.

Aos colegas de laboratório, por todo o suporte e incentivo prestado.

Ao irmão que a vida me concedeu, Paulo Eduardo Rezende e Sousa, pelo apoio constante.

## RESUMO

BARBOSA, Samuel Lessa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2023. **Desenvolvimento de um meio de cultura para a levedura oleaginosa *Papiliotrema laurentii* combinando análise de balanço de fluxo e experimento fatorial.** Orientador: Wendel Batista da Silveira. Coorientadora: Rafaela Zandonade Ventorim.

A demanda global por oleoquímicos vem aumentando ao longo dos últimos anos. Atualmente, a maioria desses compostos é produzida a partir de óleos vegetais, no entanto, a obtenção de oleoquímicos a partir de biomassa vegetal enfrenta desafios ambientais e socioeconômicos, uma vez que compete com a produção de alimentos. Os óleos microbianos, surgem como uma alternativa sustentável aos óleos vegetais, uma vez que não competem com a produção de alimentos, não dependem de condições geográficas ou sazonais específicas e apresentam maior rendimento lipídico. Nesse sentido, as leveduras oleaginosas são consideradas plataformas promissoras pois conseguem sintetizar lipídios a partir de matérias-primas abundantes e de baixo custo. A levedura oleaginosa *Papiliotrema laurentii* demonstrou a capacidade de assimilar diversas fontes de carbono, contudo o seu crescimento é limitado em meios de cultura comumente utilizados para o cultivo de leveduras oleaginosas. Portanto, é necessário desenvolver um meio de cultura que promova seu crescimento e, conseqüentemente, uma maior produtividade de lipídios. A análise de balanço de fluxo (do inglês *Flux Balance Analysis* ou FBA), aplicada a modelos metabólicos em escala genômica (do inglês *Genomic-scale Metabolic Models* ou GEMs), tem sido empregada com sucesso para obter informações fisiológicas e explorar o potencial genético de microrganismos. Neste trabalho, a FBA foi empregada utilizando o GEM de *P. laurentii* (*papla-GEM*) para direcionar experimentos fatoriais com o objetivo de desenvolver um meio de cultura que favoreça o crescimento de *P. laurentii*. Com base na FBA, foram selecionadas quatro fontes de carbono (glicose, xilose, sacarose e lactose) e duas fontes de nitrogênio (sulfato de amônio e ureia). Foi então delineado um experimento fatorial 4x3x2, avaliando combinações entre as quatro fontes de carbono em três concentrações e as duas fontes de nitrogênio. A combinação de lactose e ureia resultou em uma maior produção de biomassa e título lipídico. Posteriormente, foi avaliado o efeito do aumento da concentração do extrato de levedura e da concentração de carbono em um experimento fatorial 4x3. A condição de cultivo baseada na combinação de 28,56 g L<sup>-1</sup> de lactose, 0,234 g L<sup>-1</sup> de ureia e 0,5 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, com uma razão C:N de 75:1, resultou em um aumento de 500% tanto na produção de biomassa, quanto no

título lipídico em comparação com a condição padrão, representada pelo meio de cultivo SS2 contendo 30 g L<sup>-1</sup> de glicose, 0,523 g L<sup>-1</sup> de sulfato de amônio e 0,1 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura. Esses resultados demonstram que a estratégia proposta foi eficaz para aumentar a produção de biomassa por *P. laurentii* e, conseqüentemente, de lipídios com potencial para produção de oleoquímicos.

Palavras-chave: Levedura Oleaginosa. Biomassa. Título lipídico. Lactose. Ureia.

## ABSTRACT

BARBOSA, Samuel Lessa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2023. **Development of a culture medium for the oleaginous yeast *papiliotrema laurentii* combining flux balance analysis and factorial experiment design.** Advisor: Wendel Batista da Silveira. Co-advisor: Rafaela Zandonade Ventorim.

The global demand for oleochemicals has been increasing over the last years. Most of these compounds are currently produced from vegetable oils; however, obtaining oleochemicals from plant biomass is a great challenge from an environmental and a socio-economic point of view, as there is a competition with the food production. Microbial oils have emerged as a sustainable alternative to vegetable oils, as they do not compete with the food production, display higher lipid yields compared to vegetable oils, and their production does not rely on specific geographical or seasonal conditions. Oleaginous yeasts are considered sustainable platforms for oleochemical production as they can synthesize lipids from abundant and low-cost raw materials. The oleaginous yeast *Papiliotrema laurentii* is able to assimilate various carbon sources; however its growth yeast is limited in culture media generally used for cultivation of oleaginous yeasts. Therefore, it is necessary to develop a culture medium that favors its growth, in turn the production of highest lipid titers. Flux balance analysis (FBA) applied to genome-scale metabolic models (GEMs) has been a useful tool to gain insights regarding microbial physiology and explore the genetic potential of microorganisms. These models represent the metabolic pathways of an organism, enabling the design of factorial experiments. In this context, FBA was used in the *papla*-GEM model to guide factorial experiments aiming to develop a culture medium that favors the growth of *P. laurentii*. Based on FBA, four carbon sources (glucose, xylose, sucrose, and lactose) and two nitrogen sources (ammonium sulfate and urea) were selected. A 4x3x2 factorial experiment was then constructed, evaluating the four carbon sources at three concentrations in the two nitrogen sources. This experiment indicated that the combination of lactose and urea led to the highest increase in both biomass and lipid titer. Subsequently, the effect of increasing yeast extract concentration and carbon concentration was evaluated in a 4x3 factorial experiment. Increasing the yeast extract concentration up to 0.5 g L<sup>-1</sup> led to an increase in both biomass and lipid titer production in *P. laurentii*. The cultivation condition based on the combination of 28.56 g L<sup>-1</sup> lactose, 0.234 g L<sup>-1</sup> urea, and 0.5 g L<sup>-1</sup> yeast extract (C:N ratio of 75:1), increased by 500% both biomass production and lipid titer, compared to the reference

condition (SS2 culture medium containing 30 g L<sup>-1</sup> glucose, 0.523 g L<sup>-1</sup> ammonium sulfate and 0.1 g L<sup>-1</sup> yeast extract). These results indicate that the adopted strategy was suitable to increase the biomass production by *P. laurentii*.

Keywords: Oleaginous yeast. Biomass. Lipid yield. Lactose. Urea.

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| INTRODUÇÃO  | 10 |
| CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA  | 12 |
| 1.1. Oleoquímicos: demanda e impactos   | 12 |
| 1.2. Microrganismos oleaginosos   | 13 |
| 1.2.1. <i>Papiliotrema laurentii</i>  | 18 |
| 1.3. Análise de fluxo metabólico  | 20 |
| 1.4. Referências Bibliográficas   | 26 |
| Destaques   | 35 |
| Resumo  | 36 |
| 2.1. Introdução   | 37 |
| 2.2. Metodologia  | 39 |
| 2.2.1. Análise de Balanço de Fluxo  | 39 |
| 2.2.2. Microrganismo e manutenção   | 41 |
| 2.2.3. Condições de cultivo   | 41 |
| 2.2.4. Delineamento experimental  | 41 |
| 2.2.5. Determinação da biomassa   | 45 |
| 2.2.6. Extração e determinação do conteúdo lipídico   | 45 |
| 2.2.7. Avaliação do consumo das fontes de carbono   | 46 |
| 2.2.8. Parâmetros fermentativos   | 47 |
| 2.3. Resultados   | 47 |
| 2.3.1. Curadoria do modelo papla-GEM  | 47 |
| 2.3.2. Predição do crescimento de <i>Papiliotrema laurentii</i> em diferentes fontes de carbono e fontes de nitrogênio  | 48 |
| 2.3.3. Avaliação da produção de biomassa por <i>P. laurentii</i> em meio de cultivo contendo as combinações das fontes de carbono e nitrogênio selecionadas por meio das análises in silico | 51 |
| 2.3.4. Análise do título lipídico por <i>P. laurentii</i> em resposta às diferentes combinações de fontes de carbono e nitrogênio   | 54 |
| 2.3.5. Avaliação da produção de biomassa e título lipídico por <i>P. laurentii</i> em resposta ao aumento da concentração de carbono e extrato de levedura                                  | 56 |
| 2.4. Discussão  | 61 |
| 2.5. Conclusão  | 68 |
| 2.6. Referências bibliográficas   | 68 |

## INTRODUÇÃO

A maior parte dos oleoquímicos comercializados são de origem vegetal e animal, sendo produzidos a partir de matérias-primas empregadas na produção de alimentos, o que caracteriza um problema de caráter ambiental e socioeconômico devido à crise alimentar global e a necessidade de uma grande extensão de terras aráveis. A partir do final do século XIX, a demanda por oleoquímicos vem crescendo. Suprir a crescente demanda por óleo empregando métodos convencionais não é razoável do ponto de vista socioeconômico e de sustentabilidade, pois a produção de óleo vegetal requer terras aráveis, água e fertilizantes. Nesse contexto, os óleos microbianos, são uma alternativa promissora, pois não competem com a produção de alimentos, independem de condições geográficas e sazonais, não necessitam de vasto espaço para sua produção, e apresentam menor tempo de produção e maior rendimento lipídico em comparação à obtenção de óleos vegetais.

Os óleos microbianos são utilizados na produção de diferentes oleoquímicos, a saber: biocombustíveis derivados de ácidos graxos, produtos farmacêuticos, surfactantes, aditivos alimentares, lubrificantes, biopolímeros, cosméticos, aditivos alimentares, e formulações de herbicidas e pesticidas. No entanto, a produção de lipídios microbianos em larga escala é limitada pelos altos custos de processamento e altos preços dos substratos. Portanto, a exploração de matérias-primas com boa relação custo-benefício, combinada com o uso de substratos residuais e economicamente sustentáveis, pode ser uma alternativa viável para a redução de custos na produção de óleos microbianos.

As leveduras oleaginosas são consideradas plataformas sustentáveis de produção de oleoquímicos, pois são capazes de produzir lipídios a partir de matérias-primas que são subprodutos agroindustriais abundantes e de baixo custo. A levedura oleaginosa *Papiliotrema laurentii*, é capaz de assimilar diversas fontes de carbono, incluindo a xilose, que é o principal constituinte da fração hemicelulósica de biomassas lignocelulósicas (Panesar e Kaur 2015; Sitepu et al. 2014; Yavuz 2019). Em meio de cultura contendo xilose como fonte de carbono, *P. laurentii* atingiu teor lipídico de 63,5% (p/p) em condições otimizadas (30 °C; 300 rpm; densidade óptica inicial a 600 nm ( $DO_{600}$ ) = 0,8 e pH = 7) (Vieira et al., 2020a). Além da xilose, esta levedura pode utilizar vários monossacarídeos, oligossacarídeos, ácidos orgânicos, óleos, produtos agrícolas, resíduos industriais e glicerol, mantendo seu fenótipo oleaginoso. Entretanto, a produção de biomassa de *P. laurentii* é limitado em meios de cultura geralmente

utilizados para cultivo de leveduras oleaginosas. Portanto, é necessário desenvolver um meio de cultura que favoreça o acúmulo de biomassa, e, conseqüentemente, a obtenção de altos títulos lipídicos.

A abordagem metodológica mais utilizada para o desenvolvimento de meios de cultura envolve experimentos fatoriais, nos quais vários cultivos são realizados com diferentes nutrientes e concentrações definidas com base em dados da literatura. No entanto, devido ao conhecimento limitado sobre as características fisiológicas da levedura não-modelo *P. laurentii*, o planejamento de experimentos fatoriais é desafiador, o que resulta em um delineamento mais intuitivo. Dessa forma, a utilização de metodologias alternativas é desejável para o estudo dos requisitos nutricionais em leveduras não convencionais.

Os modelos metabólicos em escala genômica (GEMs) têm sido aplicados com sucesso para obter informações fisiológicas e explorar o potencial genético de microrganismos, uma vez que eles representam as vias metabólicas de um organismo específico. Por meio da reconstrução de GEMs, é possível realizar Análises de Balanço de Fluxo (FBA) para investigar a capacidade de assimilação de diferentes nutrientes pelos microrganismos, assim como avaliar o efeito desses nutrientes sobre o crescimento microbiano. É importante destacar que o primeiro GEM de *P. laurentii* UFV-1 (*papla-GEM*) foi recentemente reconstruído. Portanto, este trabalho propõe a avaliação da distribuição do fluxo metabólico para a formação de biomassa *in silico*, em resposta à disponibilidade de diferentes nutrientes representados no modelo *papla-GEM*, para orientar experimentos de forma racional para o desenvolvimento de um meio de cultura que favoreça o crescimento de *P. laurentii*.

A dissertação está estruturada em dois capítulos. O primeiro capítulo consiste em uma revisão bibliográfica dos principais conceitos abordados neste estudo, incluindo o uso de óleos microbianos para a produção de oleoquímicos, métodos de otimização da produção de lipídios e a aplicação da análise de balanço de fluxo para estudar a fisiologia de microrganismos. No segundo capítulo, a FBA foi aplicada para direcionar os experimentos fatoriais, por meio da identificação de fontes de carbono e nitrogênio mais promissoras para o cultivo de *P. laurentii*. Quatro fontes de carbono e duas fontes de nitrogênio foram selecionadas para as análises, as combinações dessas fontes em cultivos definidos por experimentos fatoriais foram empregadas para avaliar as diferenças na produção de biomassa.

## CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1. Oleoquímicos: demanda e impactos

Os oleoquímicos são compostos químicos produzidos tradicionalmente a partir de óleos vegetais e gorduras animais, sendo amplamente utilizados em diversas aplicações, como fabricação de lubrificantes, tintas, biopolímeros, biocombustíveis, cosméticos, produtos farmacêuticos, surfactantes, aditivos alimentares, entre outros (Adrio, 2017; Bharathiraja et al., 2017). A demanda por esses compostos tem apresentado um aumento significativo desde o final do século XIX, impulsionada pelo processo de urbanização, aumento populacional e pela necessidade de novos produtos à base de lipídios na sociedade, principalmente no século XX. Dentre os oleoquímicos, destaca-se o biodiesel, um combustível renovável obtido por meio da transesterificação de triacilgliceróis com um álcool, geralmente o metanol, resultando em ésteres metílicos de ácidos graxos (biodiesel) e glicerol. No período de 2012 a 2013, foram produzidas globalmente 157 milhões de toneladas de gorduras e óleos, das quais 77% foram destinadas à produção de alimentos para humanos e animais, 12% para a produção de biodiesel, enquanto que os 11% restantes foram utilizados na produção de outros oleoquímicos (Szczepeńska; Hapeta; Lazar, 2022). Em 2019, 67% dos óleos vegetais produzidos foram destinados à produção de alimentos, e aproximadamente 14% foram utilizados na produção de biodiesel (Orjuela & Clark, 2020). Como observado, a produção de biodiesel tem sido ampliada, impulsionada pela crescente demanda por energia e pela necessidade de substituição dos combustíveis fósseis. Essa substituição ocorre devido aos problemas ambientais associados ao processamento e consumo desses combustíveis e à inevitável escassez futura dos mesmos (Mondal; Halder; Mondal, 2023; Sreeharsha; Tejaswini; Mohan, 2022; Gude & Martinez-Guerra, 2018).

A produção de oleoquímicos é realizada principalmente a partir de derivados de biomassa vegetal, e o aumento na demanda desses compostos tem impulsionado a produção de óleos vegetais, o que pode ser constatado ao observar o período de 1983 e 2013, no qual ocorreu um crescimento de 240% na produção desses óleos (El-Hamidi & Zaher, 2018). Além disso, a demanda por lipídios está apresentando um crescimento consideravelmente elevado devido ao rápido aumento da população humana (OECD, 2015). Estima-se que o consumo global de óleos vegetais aumente mais de 3% em 2023/24, totalizando 218 milhões de toneladas, com destaque para o crescimento do consumo de óleos no Brasil, China, Índia,

Indonésia e Estados Unidos (Ates & Bukowski, 2023). Em 2019, cerca de 68% da produção de biodiesel no Brasil originou-se da utilização de óleo de soja como matéria-prima, o qual é a principal fonte de óleo para esse biocombustível no país (Everton et al., 2023). A obtenção de óleos vegetais por meio da agricultura acarreta impactos socioeconômicos e ambientais, pois requer extensas áreas de terras aráveis, além de água e fertilizantes, promovendo a competição com a produção de alimentos, fato que vem se agravando com o maior requerimento de oleoquímicos durante. Diante da perspectiva do aumento da demanda por oleoquímicos em decorrência do crescimento populacional e das limitações na produção a partir de fontes convencionais, estão sendo desenvolvidos métodos alternativos visando a de produção sustentável de lipídios, incluindo abordagens biotecnológicas que envolvem microrganismos oleaginosos (Passoth & Mats, 2019; Parson; Allen; Chuck, 2020).

## 1.2. Microrganismos oleaginosos

Os microrganismos oleaginosos são aqueles capazes de acumular pelo menos 20% de lipídios em base de massa seca (Ratledge, 1991; Robles-Iglesias et al., 2023; Szczepańska; Hapeta; Lazar, 2022). Alguns desses microrganismos possuem uma composição lipídica semelhante à de óleos vegetais, como por exemplo as leveduras oleaginosas, *Rhodotorula glutinis* R4; *P. laurentii* UFV-1, e *P. laurentii* UFV-1 AM113 (Maza et al., 2020; Vieira et al., 2020a; Wang et al., 2018). O primeiro registro de um elevado acúmulo lipídico por microrganismos ocorreu em 1889, quando foi observado um teor de lipídios entre 26% e 28% em base de massa seca pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis* acumulou entre 26% e 28% de seu peso seco em lipídios (Hammerschlag, 1889). Cerca de um século depois, na década de 1990, ocorreu a primeira produção comercial de ácido graxo, especificamente um óleo rico em ácido  $\gamma$ -linolênico, derivado do fungo filamentosso *Mucor circinelloides* (Ratledge, 2014; Mondal; Halder; Mondal, 2023).

Os lipídios de interesse incluem triacilgliceróis (TAGs), ésteres de esteróis, fosfolipídios e glicolipídios. Os TAGs consistem em ácidos graxos, principalmente saturados e monoinsaturados, que estão ligados a uma molécula de glicerol. Esses compostos são reconhecidos como o componente principal dos lipídios acumulados por microrganismos oleaginosos e são os principais alvos para aplicações biotecnológicas (Szczepańska; Hapeta; Lazar, 2022). A produção de lipídios por microrganismos possui diversas vantagens em

comparação aos métodos convencionais de produção de lipídios vegetais, pois não competem com a produção de alimentos, independem de condições geográficas e sazonais, não necessitam de vasto espaço para sua produção, tempo reduzido de produção e apresentam maior rendimento lipídico (Chatterjee and Mohan 2020; Tomas-Pejo et al., 2021; Meng et al., 2009). No entanto, existem determinadas limitações na produção desses lipídios, devido ao elevado custo de produção, associado principalmente ao custo dos substratos e processamento de biomassa, que envolve o uso de solventes orgânicos e etapas com elevado requerimento de energia, como centrifugação e secagem (Cho e Park 2018; Santek; Beluhan; Santek, 2018, Dong et al., 2016).

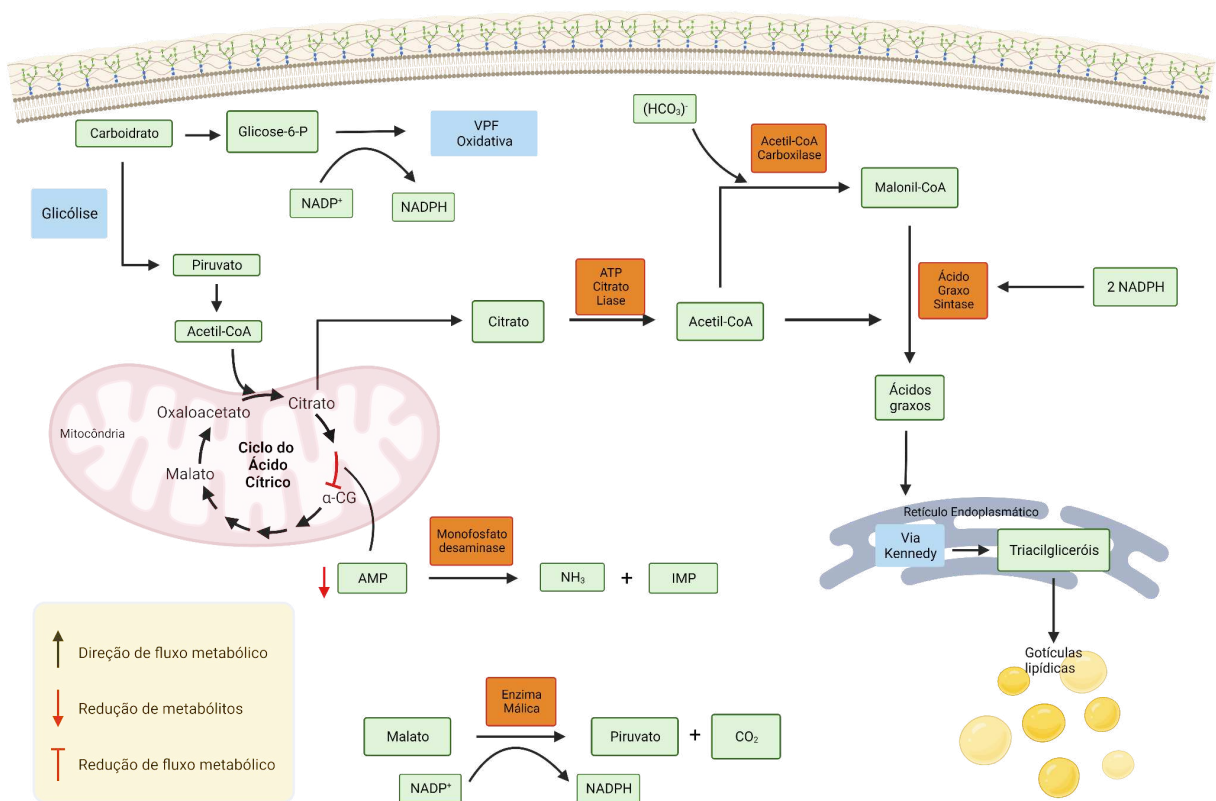
Uma abordagem importante para reduzir os custos desses processos é o uso de fontes nutricionais de baixo custo, incluindo resíduos como fontes de carbono. Dessa forma, a produção microbiana de lipídios contribui potencialmente para o conceito de economia circular ao reduzir os custos da produção biotecnológica e promover a ecossustentabilidade (Fabiszewska et al., 2022; Lopes et al., 2019). A economia circular é um conceito econômico e ambiental que visa manter os recursos, materiais e produtos pelo maior tempo possível no sistema econômico, reduzindo a geração de resíduos, desperdícios, utilizando como matéria-prima, resíduos, subprodutos e materiais renováveis. Esse modelo reduz o uso de materiais primários, poupando recursos naturais e reduzindo a emissão de carbono. Processos que se baseiam nesse conceito são necessários, pois com o contínuo crescimento populacional, os recursos materiais tendem a se tornar cada vez mais escassos (D'Amato et al., 2017; Ingemarsdotter et al., 2019).

Como exemplo de aplicação de economia circular, tem-se a reutilização do soro de leite pela própria indústria de alimentos, ou em aplicações biotecnológicas (Carvalho et al., 2021; Lavelli & Beccalli, 2022). Esse material constituído majoritariamente por lactose e proteínas, é um subproduto derivado do processo de fabricação de queijos que apresenta baixo custo de obtenção e alta disponibilidade. Variados microrganismos podem utilizar a lactose como fonte de carbono, atuando como fábricas celulares, como por exemplo, a produção de bioetanol por *Kluyveromyces marxianus* e obtenção de lipídios para produção de biodiesel por *Yarrowia lipolytica* e *Papiliotrema laurentii* (*Cryptococcus laurentii*) (Carota, et al., 2017, Díez-Antolínez et al., 2018; Taskin et al., 2015). Outro exemplo é a utilização do glicerol, gerado como subproduto durante a produção de biodiesel, como fonte de carbono para microrganismos oleaginosos, visando a síntese de lipídios, os quais são reintegrados na cadeia de produção do biodiesel (Chebbi et al., 2019).

Dentre os microrganismos oleaginosos, as leveduras oferecem várias vantagens, tais como altas taxas de crescimentos, capacidade de acumular altos teores de lipídios e composição lipídica semelhante à de óleos vegetais, em comparação às bactérias, fungos filamentosos e microalgas (Saenge et al., 2011; Sreeharsha & Mohan, 2020). Diversas espécies de leveduras oleaginosas podem crescer em uma ampla gama de açúcares derivados de diferentes substratos, como biomassas lignocelulósicas vegetais oriundas de resíduos agroindustriais, que incluem os carboidratos, celulose e hemicelulose, representando uma fonte de carbono de baixo custo para a produção de óleo por diversas espécies de leveduras oleaginosas (Garlapati et al., 2020; Sreeharsha & Mohan, 2020).

O acúmulo de lipídios em leveduras pode ocorrer por meio de dois mecanismos distintos, conhecidos como síntese *de novo* e síntese *ex novo*. A síntese *de novo* ocorre quando a célula é cultivada sob estresse nutricional, desencadeando alterações no fluxo metabólico que levam à redução do crescimento celular e aumento da produção de lipídios. A limitação de nitrogênio é um dos principais estresses nutricionais conhecidos por induzir a síntese de lipídios. Por outro lado, a síntese *ex novo* envolve a hidrólise externa de substratos hidrofóbicos, resultando na formação de ácidos graxos e glicerol, que são posteriormente absorvidos pela célula e convertidos em TAGs (Papanikolaou & Aggelis, 2011).

No contexto da síntese *de novo*, a depleção de nitrogênio desencadeia a atividade da enzima adenosina monofosfato desaminase, que converte a adenosina monofosfato (AMP) em inosina monofosfato e amônia para obtenção de nitrogênio. Essa redução no conteúdo celular de AMP resulta na diminuição da atividade da enzima isocitrato desidrogenase nas mitocôndrias, levando ao acúmulo de citrato nessas organelas. Posteriormente, o citrato é transportado para o citosol e clivado pela enzima ATP-citrato liase (ACL) em acetil-CoA e oxaloacetato. O acetil-CoA é então direcionado para a síntese de ácidos graxos *de novo* pelo complexo sintase de ácidos graxos (FAS), e posteriormente é encaminhado para o retículo endoplasmático para a produção de TAGs e outros lipídios (Figura 1). Com o aumento da concentração de nitrogênio no meio de cultura, esse efeito de repressão é atenuado, resultando em uma redução no acúmulo de lipídios e, conseqüentemente, no teor lipídico (Ratledge & Wynn, 2002; Adrio, 2017). Além do nitrogênio, outras limitações nutricionais, como fósforo, ferro e magnésio, também estimulam o fenótipo oleaginoso (Wu et al., 2010; Ratledge & Wynn, 2002).



**Figura 1:** Representação da biossíntese de triacilgliceróis em leveduras oleaginosas sob limitação de nitrogênio. As setas pretas representam a direção de fluxo metabólico. A seta vermelha indica a redução da concentração de AMP intracelular, o que ocasiona redução do fluxo promovido pela isocitrato desidrogenase representada pela linha de inibição vermelha no ciclo do ácido cítrico, promovendo o acúmulo citrato na mitocôndria e o seu transporte para o citosol. As caixas verdes, azuis, laranjas representam metabólitos, vias metabólicas e enzimas, respectivamente. As abreviaturas VPF e  $\alpha$ -CG correspondem à via das pentoses fosfato e alfa-cetoglutarato, respectivamente.

Considerando o modelo de regulação do metabolismo lipídico, as leveduras oleaginosas exibem características relevantes. Durante cada etapa de alongamento de carbono mediada por FAS, a utilização de duas moléculas de NADPH é necessária. Nas leveduras oleaginosas, o NADPH é principalmente obtido por meio de duas vias: a reação catalisada pela glicose 6-fosfato desidrogenase na via oxidativa das pentoses fosfato e a reação promovida pela enzima málica. Além disso, destaca-se a presença da ACL nessas leveduras, que fornece uma fonte adicional de acetil-CoA. Essa fonte adicional é de extrema importância, uma vez que o fenótipo oleaginoso na levedura está intimamente relacionado a um fornecimento eficiente de acetil-CoA. O acetil-CoA também pode ser gerado a partir da quebra do piruvato produzido na glicólise pela enzima piruvato desidrogenase presente na mitocôndria, bem como pela via piruvato-acetaldeído-acetato no citosol. A síntese de ácidos

graxos requer a disponibilidade de malonil-CoA para o complexo enzimático FAS. Nas leveduras, o complexo FAS é formado por duas subunidades,  $\beta$  e  $\alpha$ , organizadas em formato hexamérico. O malonil-CoA é formado na reação catalisada pela acetil-CoA carboxilase (ACC), na qual o acetil-CoA condensa com o íon bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) (Figura 1). Nas leveduras oleaginosas, a FAS, ACL e a enzima málica podem formar um complexo para facilitar a síntese e o alongamento de ácidos graxos. Os principais produtos finais da FAS são ácidos graxos saturados com 14 a 18 carbonos, que podem ser alongados e/ou dessaturados por elongases e/ou dessaturases específicas no retículo endoplasmático. Nesse local, os ácidos graxos são esterificados ao glicerol, produzindo diferentes TAGs, ou ao esterol para formar ésteres de esterol (Beopoulos et al., 2011; Ratledge, 2004; Ageitos et al., 2011).

O acúmulo excessivo de ácidos graxos pode levar à lipotoxicidade celular, portanto, é necessário incorporá-los aos TAGs e armazená-los em organelas denominadas gotículas lipídicas (LDs), que são compartimentos multifuncionais de armazenamento derivados do retículo endoplasmático. Diversas proteínas específicas de espécies estão associadas às LDs, o que facilita o direcionamento do armazenamento de lipídios e a liberação regulada de ácidos graxos, protegendo as LDs da ação das lipases. Assim, a expressão e a eficiência catalítica das proteínas-LD influenciam os níveis totais de lipídios, determinando o comportamento oleaginoso do organismo (Radulovic et al., 2013; Sreeharsha & Mohan, 2020).

A produção de TAGs ocorre pela via de Kennedy, que envolve três etapas de acilação do glicerol-3-fosfato (G-3P). A primeira acilação é realizada pela G-3P aciltransferase, convertendo-a em ácido lisofosfatídico (LPA). Em seguida, ocorre uma nova acilação, convertendo o LPA em diacilglicerol (DAG), por meio da ação das enzimas aciltransferase lisofosfatídica e ácido fosfatídico fosfohidrolase. O DAG formado pode ser convertido em TAG por duas vias diferentes: uma via independente de acil-CoA e uma via dependente de acil-CoA. Na via independente de acil-CoA, a conversão de DAG em TAG é realizada exclusivamente pela enzima fosfolipídio:diacilglicerol aciltransferase. Já na via dependente de acil-CoA, a catálise é realizada pelas enzimas diacilglicerol transferase e acil-CoA:esterol aciltransferases Are1p e Are2p (Beopoulos et al., 2009).

Devido ao alto custo do processo de produção de lipídios por microrganismos, vários estudos têm buscado otimizar a produção de lipídios utilizando estratégias de engenharia genética e metabólica. Com base nos aspectos da regulação do metabolismo lipídico discutidos anteriormente, muitas das enzimas-chave envolvidas nas vias de biossíntese e

produção de NADH são alvos dessas estratégias. Exemplos dessas enzimas incluem a ACC e a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) (Adrio, 2017; Sreeharsha & Mohan, 2020).

Zhang et al. (2016) realizaram a superexpressão das enzimas ACC e diacilglicerol aciltransferase (DGA1) em *Rhodospiridium toruloides*, aumentando a produção de lipídios em até duas vezes em comparada à linhagem parental quando cultivada em meio contendo glicose como fonte de carbono e energia. A superexpressão simultânea da delta-9 estearoil-CoA dessaturase, acetil-CoA carboxilase 1 (ACC1) e diacilglicerídeo aciltransferase 1 (DGA1) em *Yarrowia lipolytica* resultou em alto rendimento de conversão de carbono em lipídios (84,7% do rendimento máximo teórico), título lipídico de 55 g L<sup>-1</sup> e crescimento três vezes maior em relação à linhagem selvagem (QIAO et al., 2015). Além disso, é possível favorecer a produção de espécies lipídicas específicas. Por exemplo, Yan et al. (2020) conseguiram aumentar em 43% a produção de ácidos graxos insaturados por meio da superexpressão de uma delta-12 dessaturase endógena e uma delta-15 dessaturase exógena.

#### 1.2.1. *Papiliotrema laurentii*

*Papiliotrema laurentii* é uma levedura oleaginosa não convencional pertencente ao filo Basidiomycota, classe Tremellomycetes e ordem Tremellalesque, que apresenta dimorfismo, é capaz de sintetizar cápsula e não possui motilidade (Liu et al. 2015; Kurtzman, 1973). Até 2015, a espécie *P. laurentii* era denominada como *Cryptococcus laurentii*, a nova nomenclatura foi baseada em análises filogenéticas a partir do sequenciamento de diferentes genes e regiões gênicas, como o gene ITS rRNA, os domínios D1/D2 da subunidade grande (LSU ou 26S) do gene rRNA, a subunidade pequena (SSU ou 18S) do gene rRNA, duas subunidades de RNA polimerase II (RPB1 e RPB2), fator de alongamento de tradução 1- $\alpha$  (TEF1) e citocromo b (CYTB) (Liu et al., 2015; Londero et al., 2019).

*Papiliotrema laurentii* é capaz de assimilar diversas fontes de carbono, tais como, glicose, xilose, arabinose, celobiose, manose, galactose, ramnose, sacarose, lactose e ácido galacturônico (Sitepu et al. 2014). Adicionalmente, essa levedura pode ser encontrada em diversos habitats, incluindo ambientes naturais e agrícolas, como superfícies de grãos de trigo e milho (Kurtzman, 1973), vinhedos (Wang et al., 2018), casca de árvores e frutas em decomposição (Yalçın et al., 2021), solos contaminados por hidrocarbonetos (Chandran & Das, 2012), bagaço de cana-de-açúcar (Gebbie et al., 2020) e óleo de palma (Polburee et al., 2015).

O fato de ser encontrada em diversos ambientes demonstra sua plasticidade metabólica de assimilar variados nutrientes encontrados em diferentes substratos, o que é atrativo do ponto de vista biotecnológico. Entre esses substratos, estão inclusos polímeros derivados de culturas agrícolas, como biomassas lignocelulósicas, além de resíduos industriais, como polímeros, óleos e glicerol (Fonseca et al., 2011). Além disso, *P. laurentii* apresenta potencial para diversas aplicações biotecnológicas, tais como biocontrole de fungos fitopatogênicos (Wei et al., 2014), biorremediação de metais pesados (Sarkar et al., 2019), modulação do crescimento vegetal (Moller et al., 2016), degradação de resíduos industriais (Barlow et al., 2020; Hung et al., 2019), degradação de revestimentos à base de poliéster sob alta umidade (Hung et al., 2019) e produção de lipídios para aplicação no setor de oleoquímicos (Vieira et al., 2020a).

Assim como as demais leveduras oleaginosas, o acúmulo lipídico *P. laurentii* é estimulado em condições de limitação de nitrogênio, pelo mesmo mecanismo descrito anteriormente. Curiosamente, na fase de acúmulo de lipídios, a expressão do gene *ACC*, o qual codifica a enzima que catalisa a primeira reação que limita o fluxo de carbono para a biossíntese de ácidos graxos, surpreendentemente diminui em *P. laurentii*. Contudo, Vieira et al. (2020b) sugeriram a possibilidade da ocorrência de modificações pós-traducionais na ACC para manter a provisão necessária de malonil-CoA para a síntese de ácidos graxos. Adicionalmente, há uma alta expressão dos genes que codificam a glicose-6-fosfato desidrogenase e a ME durante a fase de acúmulo lipídico, indicando que a demanda NADPH para a formação de lipídios é suprida por ambas as vias. Outro fator intrigante foi observado para a linhagem *P. laurentii* RY1, na qual, em meio com condições limitantes de nitrogênio, ocorre um aumento na expressão de genes relacionados à  $\alpha$ -oxidação de ácidos graxos, possivelmente relacionado ao requerimento de energia para manter o crescimento celular. Além disso, é observado que a maquinaria de tradução é reprimida (Sarkar et al., 2018).

O potencial de *P. laurentii* para a produção de lipídios a partir de biomassas e resíduos industriais tem sido demonstrado nos últimos anos, principalmente em cultivos realizados sob condições com alta relação carbono:nitrogênio (C:N). Por exemplo, o cultivo de *P. laurentii* AM113 em modo de batelada alimentada, em meio de cultura suplementado com hidrolisado de inulina, resultou em teores lipídicos de 54,6% (p/p) (Wang et al., 2018). Além disso, as linhagens de *P. laurentii* UNESP 11 e UFV-1 apresentaram um teor lipídico de 27,8% e 37,27%, respectivamente, a partir do soro de leite, um subproduto gerado na

fabricação de queijo, no qual a lactose é a principal fonte de carbono e energia (Castanha et al., 2014; Cotrim, 2021).

É notável que *P. laurentii* acumula lipídios de forma mais rápida do que outras leveduras oleaginosas, atingindo a produção máxima em 48 h de cultivo em meios de cultura contendo glicose ou xilose como fontes de carbono (Vieira et al., 2020a). Portanto, essa levedura se destaca pela capacidade de alcançar altas produtividades volumétricas. Adicionalmente, em meio de cultivo contendo xilose como fonte de carbono e sob condições otimizadas (30 °C, 300 rpm, DO<sub>600</sub> = 0,8 e pH = 7), *P. laurentii* alcança 63,5% (p/p) de seu peso seco em lipídios (Vieira et al., 2020a). Além disso, o perfil lipídico de *P. laurentii* assemelha-se às características dos óleos vegetais utilizados para a produção de biodiesel de qualidade padrão, destacando seu potencial como fonte sustentável para a produção de biocombustíveis (Vieira et al., 2020a; Wang et al., 2018).

Recentemente, o primeiro modelo metabólico em escala genômica de *P. laurentii* foi publicado (Ventorim et al. 2022). O modelo foi reconstruído por homologia usando o genoma de *P. laurentii* UFV-1 (Vieira et al. 2020b) como base, e usando GEMs de *Rhodotorula toruloides* (Tiukova et al. 2019) e *Yarrowia lipolytica* (Kerkhoven et al. 2016) como moldes. O modelo reconstruído foi capaz de representar o crescimento de *P. laurentii* sob condições mínimas e complexas de cultivo. Dessa forma, o GEM abre perspectivas para entender melhor a regulação do metabolismo de *P. laurentii* usando abordagens de biologia de sistemas.

### 1.3. Análise de fluxo metabólico

Técnicas de engenharia metabólica são empregadas para otimizar a produção de compostos de interesse por microrganismos. No entanto, essas abordagens requerem conhecimento das vias metabólicas que promovem a síntese do metabólito de interesse, bem como a análise do fluxo dessas vias metabólicas (Stephanopoulos, 1999). A análise dos fluxos metabólicos permite compreender como um microrganismo responde às variações ambientais, identificar gargalos nas vias metabólicas que limitam a produção de um determinado composto, avaliar os níveis de controle metabólico e estabelecer modelos preditivos, que são valiosos para o desenvolvimento de estratégias de melhoria e processamento (Cheah et al., 2020; Niederberger et al., 1992; Vallino & Stephanopoulos, 1993; Foster et al., 2019). O estudo dos fluxos metabólicos é predominantemente realizado por meio de três abordagens:

modelagem cinética, análise de fluxo metabólico baseada em carbono marcado ( $^{13}\text{C}$ -MFA) e FBA (Ohno; Uematsu; Kuroda, 2022).

A modelagem cinética desempenha um papel importante na descrição dos mecanismos enzimáticos, fornecendo informações úteis sobre a regulação do fluxo metabólico e o equilíbrio de massa em cada reação. Os fluxos metabólicos são representados em termos das concentrações de enzimas e substratos, permitindo uma avaliação dinâmica e quantitativa de dados metabolômicos, fluxômicos e proteômicos. Assim, o fluxo metabólico é descrito como uma equação cinética para cada reação, envolvendo um conjunto de enzimas, metabólitos e parâmetros específicos de cada reação, sendo a cinética de Michaelis-Menten uma das mais conhecidas (Srinivasan; Cluett; Bahadevan; 2015; Saa & Nielsen, 2017; Yasemi & Jolicoeur, 2021; Sauro, 2011). Quando a concentração da enzima é explicitamente considerada na cinética da reação, o modelo cinético pode calcular o fluxo metabólico, fornecendo informações sobre mecanismos de interação entre enzimas, metabólitos e fluxos metabólicos, e pode ser aplicado em condições de estado não-estacionário. Entretanto, devido à sua maior complexidade, esse tipo de modelo não é geralmente aplicado em redes metabólicas complexas em função do alto custo computacional e da necessidade de dados experimentais substanciais. No entanto, as informações obtidas por esse modelo podem ser úteis para auxiliar nas abordagens de  $^{13}\text{C}$ -MFA e FBA (Ohno; Uematsu; Kuroda, 2022).

Tradicionalmente, as técnicas marcação por isótopo de carbono são amplamente utilizadas no estudo das vias metabólicas, permitindo a identificação precisa dos fluxos metabólicos e a validação de modelos metabólicos (Gonzalez & Antoniewicz, 2017; Long et al., 2017). A técnica  $^{13}\text{C}$ -MFA tem sido considerada como referência para a quantificação exata e precisa dos fluxos em células vivas (Crown & Antoniewicz, 2013). A  $^{13}\text{C}$ -MFA envolve o uso de um substrato marcado com o isótopo de carbono-13 ( $^{13}\text{C}$ ) para o cultivo celular. Esse substrato é metabolizado pela célula e o  $^{13}\text{C}$  é incorporado às biomoléculas do microrganismo em questão. Em seguida, o padrão de marcação é avaliado por meio de técnicas como espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear (McConnell & Antoniewicz, 2016; Szyperski et al., 1999). Devido à distribuição variada dos fluxos metabólicos, diferentes padrões de marcação são obtidos na  $^{13}\text{C}$ -MFA, permitindo a inferência dos fluxos com base nesses padrões, que são submetidos a um problema de regressão de mínimos quadrados (Antoniewicz et al., 2006). Apesar das vantagens relacionadas à precisão das análises, a técnica apresenta algumas limitações. Isso inclui a restrição do estudo aos fluxos que abrangem apenas o metabolismo central de carbono, a dependência de substratos

marcados apropriadamente, o que aumenta o custo da análise; e a escolha dos metabólitos a serem analisados, a qual afeta a acurácia e precisão da análise de fluxo (Ohno; Uematsu; Kuroda, 2022). A seleção do substrato marcado e a posição do isótopo  $^{13}\text{C}$  são etapas críticas para garantir a precisão da técnica em questão. Essas escolhas afetam diretamente a trajetória dos átomos de carbono através da rede metabólica, podendo divergir significativamente. Uma seleção inadequada pode levar o isótopo  $^{13}\text{C}$  para rotas metabólicas não representativas para um objetivo específico. Portanto, é imprescindível possuir conhecimento prévio sobre os mecanismos de reação nas vias metabólicas (Crown & Antoniewicz, 2019). Como exemplo, Amador-Nogues et al. (2010) demonstraram que a reação promovida pela piruvato ferredoxinoxidoreductase de *Clostridium acetobutylicum*, substitui o carbono 1 (C-1) do piruvato por uma molécula de  $\text{CO}_2$  intracelular, caso o  $^{13}\text{C}$  estivesse nessa posição, seria removido das vias centrais de carbono, o que compromete a obtenção de informações exatas e precisas.

Por outro lado, a FBA utiliza programação linear para prever a distribuição de fluxos, estabelecendo restrições com o objetivo de maximizar ou minimizar um determinado objetivo metabólico. A principal restrição aplicada ao FBA é a suposição de estado estacionário para os metabólitos intracelulares, ou seja, assume-se que os níveis de metabólitos intracelulares são relativamente constantes ao longo do tempo. Para aplicar essa abordagem ao estudo do fluxo metabólico, é necessário construir uma matriz estequiométrica que represente as reações e os metabólitos presentes em um organismo por meio da utilização de GEMs (Orth; Thiele; Palsson, 2010). Os GEMs são reconstruções *in silico* que representam o metabolismo de um organismo com base na anotação do genoma e nas capacidades metabólicas da célula, permitindo a conexão entre genes, proteínas e reações, relacionando o genótipo ao metabolismo. Essas reconstruções convertem as complexas redes metabólicas em uma representação matemática, na forma de uma matriz estequiométrica que descreve o balanço de massa dos metabólitos e associa a estequiometria das reações às enzimas responsáveis, incluindo cofatores. Com um GEM, considerando o estado estacionário, é possível realizar simulações usando métodos de otimização para identificar o espaço de solução, como a FBA (Geng & Nielsen, 2017; Nielsen, 2017; O'Brien et al., 2015). Cabe destacar que as estequiometrias das reações descritas impõem restrições adicionais aos fluxos de metabólitos.

Por ser formulada como um problema de otimização linear, a FBA possui um menor custo computacional para o cálculo dos fluxos metabólicos. Isso permite a aplicação de redes

metabólicas que podem incluir milhares de reações e abranger todos os fluxos metabólicos do genoma. Além disso, a FBA é capaz de fornecer previsões quantitativas de fluxo para microrganismos com diferentes genótipos e em diferentes condições ambientais (Ohno; Uematsu; Kuroda, 2022). A FBA é amplamente utilizada para estudar redes bioquímicas e depende do equilíbrio dos fluxos metabólicos em estado estacionário em torno de cada metabólito da rede, juntamente com um conjunto de restrições de fluxo baseadas em características fisiológicas obtidas experimentalmente. Ao combinar o estado estacionário com uma função objetivo adequada, que representa um objetivo metabólico específico, como o aumento da biomassa, é possível identificar um espaço de solução usando programação linear. Isso resulta em distribuições de fluxo que atendem ao objetivo proposto. Em resumo, a FBA calcula os fluxos de metabólitos através da rede, considerando restrições de fluxo que representam o estado estacionário (balanço de massa, carga e estequiometria de reação) e limites de fluxo obtidos experimentalmente. Isso permite a predição da taxa de crescimento ou produção de um metabólito de interesse industrial (Orth; Thiele; Palsson, 2010; Nielsen, 2017; Marinos et al., 2020). No entanto, os modelos metabólicos convencionais e a FBA possuem algumas limitações, como a falta de parâmetros cinéticos, a incapacidade de prever as concentrações de metabólitos e a ausência de informações sobre efeitos regulatórios, como ativação de enzimas ou regulação da expressão gênica. Portanto, suas previsões podem não ser sempre precisas (Orth; Thiele; Palsson, 2010).

Variações da abordagem de FBA podem ser usadas para fins específicos. Por exemplo, o estudo de economia de energia e alocação de recursos celulares, pode ser realizado com a abordagem de FBA parcimoniosa (pFBA), que pode ser aplicada a um GEM convencional (Kerkhoven, 2022). A pFBA é uma otimização de programação linear na qual a FBA tradicional é inicialmente realizada para calcular o valor ideal de um determinado objetivo, como a taxa de crescimento. Em seguida, é realizada uma minimização da soma de todos os fluxos de reação associados aos genes, mantendo fixada a velocidade de crescimento predita pelo FBA tradicional. Isso permite observar a distribuição de fluxos em resposta à alocação mínima de enzimas necessárias para atingir o objetivo em estudo, como a taxa de crescimento. Além disso, a pFBA é comumente usada para estudar genes essenciais (Kerkhoven, 2022; Lewis et al., 2010).

Outra abordagem variante da técnica FBA é a análise de variabilidade de fluxo (do inglês *Flux Variability Analysis* ou FVA), comumente utilizada para avaliar os fluxos máximos e mínimos possíveis através de uma determinada reação, mantendo o valor da

função objetivo restrito ao valor ótimo ou próximo a ele (Orth; Thiele; Palsson, 2010). A avaliação de fluxos por FVA emprega inicialmente a FBA tradicional para uma determinada função objetivo e, em seguida, o valor obtido é utilizado como restrição, permitindo que cada reação da rede metabólica varie em seus fluxos máximos e mínimos. Isso possibilita a observação de como cada reação afeta a função objetivo e qual a sensibilidade dessas reações, gerando informações que podem guiar abordagens de engenharia metabólica (Orth; Thiele; Palsson, 2010; Gudmundsson & Thiele, 2010).

A FBA clássica é aplicada a valores fixos de taxa de captação de substratos, representando apenas a fase de crescimento exponencial em um regime de batelada ou para o regime de cultura contínua. A FBA dinâmica (dFBA) foi desenvolvida para estudar o comportamento dos fluxos metabólicos de um microrganismo em um estado não-estacionário (Henson & Hanly, 2014). Para isso, as concentrações de substrato extracelular e as concentrações de produto são utilizadas para calcular as taxas de absorção de substrato variáveis ao longo do tempo, por meio de uma expressão cinética de captação. Isso permite observar as variações no metabolismo de acordo com as mudanças no ambiente. As concentrações extracelulares são calculadas por meio de equações de equilíbrio extracelular, levando em consideração uma determinada concentração de biomassa celular e substrato, enquanto o produto é definido em função do crescimento celular e da taxa de secreção de produto obtidas por meio de programação linear. Dessa forma, os metabólitos intracelulares e extracelulares variam ao longo do tempo, embora haja a pressuposição de que o estado estacionário seja mantido intracelularmente, o que impede o cálculo das concentrações de metabólitos intracelulares (Henson & Hanly, 2014).

A FBA empregando GEMs pode ser utilizada para comparar as capacidades metabólicas entre diferentes células, realizar análises fisiológicas para avaliar a essencialidade de genes, o crescimento em diferentes substratos e a capacidade de produção de diferentes metabólitos. Dessa forma, ela fornece informações que contribuem para uma melhor compreensão de como a homeostase metabólica afeta o sistema regulatório global de uma célula, permitindo melhorar as condições em processos biotecnológicos. A FBA também pode ser aplicada para direcionar modificações genéticas na engenharia metabólica, identificando enzimas associadas a reações que podem ser reprimidas ou superexpressas de acordo com o objetivo. Além disso, ela pode ser utilizada para realizar análises integrativas de dados ômicos (Lu et al., 2021; Nielsen, 2017; O'Brien et al., 2015; Zampieri et al., 2019).

Existem abordagens que auxiliam na busca por nutrientes relevantes para aprimorar o objetivo estudado em uma FBA, como a análise de custos reduzidos. Os custos reduzidos podem ser definidos como parâmetros de sensibilidade para cada reação que faz parte de uma solução de FBA. Eles indicam o quanto uma determinada reação afeta uma determinada função objetivo, permitindo avaliar os efeitos positivos e negativos. Assim, ao aplicar essa análise às reações de absorção, é possível obter informações sobre nutrientes ausentes ou em baixas concentrações no meio de cultura, os quais podem aumentar o fluxo em direção a um objetivo definido, como o crescimento representado pela equação de biomassa (Maarleveld et al., 2013; Goffin et al., 2010). Portanto, os custos reduzidos podem ser interpretados como o impacto em uma função objetivo causado por um aumento no fluxo de uma determinada reação (Marinos et al., 2020). Além disso, outro parâmetro que pode ser utilizado na interpretação de uma solução FBA é o shadow price, que reflete a sensibilidade da função objetivo em relação a uma mudança em uma restrição de metabólito (Palsson, 2006; Price et al., 2004).

Atualmente, a FBA aplicada a GEMs tem sido explorada em quatro áreas de aplicação: predição de fluxo metabólico, modificação de microrganismos para atuarem como microfábricas celulares, análise comparativa de diferentes microrganismos e otimização das condições de cultivo (Chen et al., 2022). A integração de dados experimentais, como fluxos de troca de metabólitos externos e taxas de crescimento, com modelos metabólicos, permite calcular distribuições de fluxo metabólico usando FBA, refletindo as alterações metabólicas em resposta a modificações ambientais e genéticas (Liu et al., 2021; Henriques et al., 2021; Lopes et al., 2020). Além disso, é possível integrar o proteoma aos GEMs, o que permite uma compreensão mais completa do metabolismo, assim como a adição de constantes catalíticas das enzimas (Kerkhoven, 2022). Como os recursos proteicos são limitados dentro do espaço celular, eles devem ser alocados de maneira ideal entre as vias metabólicas e os processos biológicos em resposta a várias perturbações (Basan, 2018). Um exemplo inicial de um GEM específico para leveduras foi o ecYeast7.6 (Sánchez et al., 2017), o qual inclui parâmetros de restrição enzimática e mostrou-se adequado para prever comportamentos fisiológicos, como o efeito Crabtree e o crescimento em diferentes fontes de carbono não previstos pelo modelo convencional.

#### 1.4. Referências Bibliográficas

ADRIO, José L. Oleaginous yeasts: promising platforms for the production of oleochemicals and biofuels. **Biotechnology and bioengineering**, v. 114, n. 9, p. 1915-1920, 2017.

AGEITOS, Jose Manuel et al. Oily yeasts as oleaginous cell factories. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 90, p. 1219-1227, 2011.

AMADOR-NOGUEZ, Daniel et al. Systems-level metabolic flux profiling elucidates a complete, bifurcated tricarboxylic acid cycle in *Clostridium acetobutylicum*. **Journal of bacteriology**, v. 192, n. 17, p. 4452-4461, 2010.

ANTONIEWICZ, Maciek R.; KELLEHER, Joanne K.; STEPHANOPOULOS, Gregory. Determination of confidence intervals of metabolic fluxes estimated from stable isotope measurements. **Metabolic engineering**, v. 8, n. 4, p. 324-337, 2006.

ATES, A.; BUKOWSKI, M. **Approved by USDA's World Agricultural Outlook Board Oil Crops Outlook**: May 2023 Economic Research Service | Situation and Outlook Report Domestic Outlook International Outlook. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.ers.usda.gov/webdocs/outlooks/106531/ocs-23e.pdf?v=5539.9>>. Acesso em: 12 jul. 2023.

BARLOW, Daniel E. et al. Edge-localized biodeterioration and secondary microplastic formation by *Papiliotrema laurentii* unsaturated biofilm cells on polyurethane films. **Langmuir**, v. 36, n. 6, p. 1596-1607, 2020.

BASAN, Markus. Resource allocation and metabolism: the search for governing principles. **Current Opinion in Microbiology**, v. 45, p. 77-83, 2018.

BEOPOULOS, Athanasios et al. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. **Progress in lipid research**, v. 48, n. 6, p. 375-387, 2009.

BEOPOULOS, Athanasios; NICAUD, Jean-Marc; GAILLARDIN, Claude. An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 90, p. 1193-1206, 2011.

BHARATHIRAJA, B. et al. Microbial oil—a plausible alternate resource for food and fuel application. **Bioresource technology**, v. 233, p. 423-432, 2017.

CAROTA, Eleonora et al. A sustainable use of Ricotta Cheese Whey for microbial biodiesel production. **Science of the Total Environment**, v. 584, p. 554-560, 2017.

CARVALHO, Patricia et al. Yeast cell factories for sustainable whey-to-ethanol valorisation towards a circular economy. **Biofuel Research Journal**, v. 8, n. 4, p. 1529, 2021.

CASTANHA, Rodrigo Fernandes et al. Optimization of lipids production by *Cryptococcus laurentii* 11 using cheese whey with molasses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 379-387, 2014.

CHANDRAN, Preethy; DAS, Nilanjana. Role of plasmid in diesel oil degradation by yeast species isolated from petroleum hydrocarbon-contaminated soil. **Environmental technology**, v. 33, n. 6, p. 645-652, 2012.

CHATTERJEE, Sulogna; MOHAN, S. Venkata. Yeast fermentation towards biodiesel: maximizing resource recovery by integrating with biohydrogen production in biorefinery framework. **Biomass and Bioenergy**, v. 142, p. 105747, 2020.

CHEAH, Yi Ern et al. Systematic identification and elimination of flux bottlenecks in the aldehyde production pathway of *Synechococcus elongatus* PCC 7942. **Metabolic engineering**, v. 60, p. 56-65, 2020.

CHEBBI, Halima et al. Biodiesel production from microbial oil provided by oleaginous yeasts from olive oil mill wastewater growing on industrial glycerol. **Industrial Crops and Products**, v. 139, p. 111535, 2019.

CHEN, Yu; LI, Feiran; NIELSEN, Jens. Genome-scale modeling of yeast metabolism: retrospectives and perspectives. **FEMS Yeast Research**, v. 22, n. 1, p. foac003, 2022.

CHO, Hyun Uk; PARK, Jong Moon. Biodiesel production by various oleaginous microorganisms from organic wastes. *Bioresource technology*, v. 256, p. 502-508, 2018.

COTRIM, Keyla Cristina Francisco. **Viabilidade da Produção de Lipídios por *Papiliotrema Laurentii* UFV-1 em Soro de Ricota**. Orientador: Wendel Batista da Silveira. 2021. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2021. f. 69.

CROWN, Scott B.; ANTONIEWICZ, Maciek R. Parallel labeling experiments and metabolic flux analysis: Past, present and future methodologies. **Metabolic engineering**, v. 16, p. 21-32, 2013.

CROWN, Scott B.; ANTONIEWICZ, Maciek R. Selection of tracers for <sup>13</sup>C-metabolic flux analysis using elementary metabolite units (EMU) basis vector methodology. **Metabolic engineering**, v. 14, n. 2, p. 150-161, 2012.

D'AMATO, Dalia et al. Green, circular, bio economy: A comparative analysis of sustainability avenues. **Journal of cleaner production**, v. 168, p. 716-734, 2017.

DÍEZ-ANTOLÍNEZ, Rebeca et al. Yeast screening and cell immobilization on inert supports for ethanol production from cheese whey permeate with high lactose loads. **PLoS One**, v. 13, n. 12, p. e0210002, 2018.

DONG, T. et al. Lipid recovery from wet oleaginous microbial biomass for biofuel production: A critical review. **Applied Energy**, v. 177, p. 879–895, set. 2016.

EL-HAMIDI, Mona; ZAHER, Ferial A. Production of vegetable oils in the world and in Egypt: an overview. **Bulletin of the National Research Centre**, v. 42, n. 1, p. 1-9, 2018.

EVERTON, Stefanni S. et al. The role of Brazil in the advancement of enzymatic biodiesel production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 40, n. 1, p. 67-80, 2023.

FABISZEWSKA, Agata et al. Expression profile of selected genes involved in storage lipid synthesis in a model oleaginous yeast species *Yarrowia lipolytica*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1041, 2022.

FOSTER, Charles J. et al. From *Escherichia coli* mutant <sup>13</sup>C labeling data to a core kinetic model: A kinetic model parameterization pipeline. **PLoS computational biology**, v. 15, n. 9, p. e1007319, 2019.

GARLAPATI, Vijay Kumar et al. Circular economy aspects of lignin: towards a lignocellulose biorefinery. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 130, p. 109977, 2020.

GEBBIE, Leigh et al. A snapshot of microbial diversity and function in an undisturbed sugarcane bagasse pile. **BMC biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 1-16, 2020.

GENG, Jun; NIELSEN, Jens. *In silico* analysis of human metabolism: Reconstruction, contextualization and application of genome-scale models. **Current Opinion in Systems Biology**, v. 2, p. 29-38, 2017.

GOFFIN, Philippe et al. Understanding the physiology of *Lactobacillus plantarum* at zero growth. **Molecular systems biology**, v. 6, n. 1, p. 413, 2010.

GONZALEZ, Jacqueline E.; ANTONIEWICZ, Maciek R. Tracing metabolism from lignocellulosic biomass and gaseous substrates to products with stable-isotopes. **Current opinion in biotechnology**, v. 43, p. 86-95, 2017.

GUDE, Veera Gnanaswar; MARTINEZ-GUERRA, Edith. Green chemistry with process intensification for sustainable biodiesel production. **Environmental chemistry letters**, v. 16, n. 2, p. 327-341, 2018.

GUDMUNDSSON, Steinn; THIELE, Ines. Computationally efficient flux variability analysis. **BMC bioinformatics**, v. 11, n. 1, p. 1-3, 2010.

HAMMERSCHLAG, Albert. Bacteriologisch-Chemische Untersuchungen der Tuberkelbacillen. **Monatshefte für Chemie und verwandte Teile anderer Wissenschaften**, v. 10, p. 9-18, 1889.

HENRIQUES, David et al. A multiphase multiobjective dynamic genome-scale model shows different redox balancing among yeast species of the *Saccharomyces genus* in fermentation. **Msystems**, v. 6, n. 4, p. e00260-21, 2021.

HENSON, Michael A.; HANLY, Timothy J. Dynamic flux balance analysis for synthetic microbial communities. **IET systems biology**, v. 8, n. 5, p. 214-229, 2014.

HUNG, Chia-Suei et al. The biodegradation of polyester and polyester polyurethane coatings using *Papiliotrema laurentii*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 139, p. 34-43, 2019.

INGEMARSDOTTER, Emilia et al. Circular strategies enabled by the internet of things—A framework and analysis of current practice. *Sustainability*, v. 11, n. 20, p. 5689, 2019.

KERKHOVEN, Eduard J. et al. Regulation of amino-acid metabolism controls flux to lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*. **NPJ systems biology and applications**, v. 2, n. 1, p. 1-7, 2016.

KERKHOVEN, Eduard J. Advances in constraint-based models: methods for improved predictive power based on resource allocation constraints. **Current Opinion in Microbiology**, v. 68, p. 102168, 2022.

KURTZMAN, C. P. Formation of hyphae and chlamydospores by *Cryptococcus laurentii*. **Mycologia**, v. 65, n. 2, p. 388-395, 1973.

LAVELLI, Vera; BECCALLI, Matteo Paolo. Cheese whey recycling in the perspective of the circular economy: Modeling processes and the supply chain to design the involvement of the small and medium enterprises. **Trends in Food Science & Technology**, v. 126, p. 86-98, 2022.

LEWIS, Nathan E. et al. Omic data from evolved *E. coli* are consistent with computed optimal growth from genome-scale models. **Molecular systems biology**, v. 6, n. 1, p. 390, 2010.

LIU, X.-Z. et al. Phylogeny of Tremellomycetous yeasts and related dimorphic and filamentous basidiomycetes reconstructed from multiple gene sequence analyses. **Studies in mycology**, v. 81, n. 1, p. iii-iii, 2015.

LIU, Zihé et al. Yeasts as microbial cell factories for sustainable production of biofuels. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 143, p. 110907, 2021.

LONDERO, Marcos Rech et al. Catheter-related infection due to *Papiliotrema laurentii* in an oncologic patient: Case report and systematic review. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 23, n. 6, p. 451-461, 2019.

LONG, Christopher P. et al. Enzyme I facilitates reverse flux from pyruvate to phosphoenolpyruvate in *Escherichia coli*. **Nature communications**, v. 8, n. 1, p. 14316, 2017.

LOPES, Marlene et al. Waste cooking oils as feedstock for lipase and lipid-rich biomass production. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 121, n. 1, p. 1800188, 2019.

LOPES, Helberth Júnior Santos et al. C/N ratio and carbon source-dependent lipid production profiling in *Rhodotorula toruloides*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 104, n. 6, p. 2639-2649, 2020.

LU, Hongzhong; KERKHOVEN, Eduard J.; NIELSEN, Jens. Multiscale models quantifying yeast physiology: towards a whole-cell model. **Trends in Biotechnology**, 2021.

MAARLEVELD, Timo R. et al. Basic concepts and principles of stoichiometric modeling of metabolic networks. **Biotechnology journal**, v. 8, n. 9, p. 997-1008, 2013.

MARINOS, Georgios; KALETA, Christoph; WASCHINA, Silvio. Defining the nutritional input for genome-scale metabolic models: A roadmap. **PLoS One**, v. 15, n. 8, p. e0236890, 2020.

MAZA, D. Daniela et al. Growth and lipid production of *Rhodotorula glutinis* R4, in comparison to other oleaginous yeasts. **Journal of biotechnology**, v. 310, p. 21-31, 2020.

MCCONNELL, Brian O.; ANTONIEWICZ, Maciek R. Measuring the composition and stable-isotope labeling of algal biomass carbohydrates via gas chromatography/mass spectrometry. **Analytical chemistry**, v. 88, n. 9, p. 4624-4628, 2016.

MENG, Xin et al. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable energy**, v. 34, n. 1, p. 1-5, 2009.

MOLLER, Leandra et al. The role of *Cryptococcus laurentii* and mycorrhizal fungi in the nutritional physiology of *Lupinus angustifolius* L. hosting N<sub>2</sub>-fixing nodules. **Plant and Soil**, v. 409, n. 1, p. 345-360, 2016.

MONDAL, Subhadeep; HALDER, Suman Kumar; MONDAL, Keshab Chandra. State-of-art engineering approaches for ameliorated production of microbial lipid. **Systems Microbiology and Biomanufacturing**, p. 1-19, 2023.

NIEDERBERGER, Peter et al. A strategy for increasing an in vivo flux by genetic manipulations. The tryptophan system of yeast. **Biochemical Journal**, v. 287, n. 2, p. 473-479, 1992.

NIELSEN, Jens. Systems biology of metabolism. **Annu Rev Biochem**, v. 86, n. 1, p. 245-275, 2017.

O'BRIEN, Edward J.; MONK, Jonathan M.; PALSSON, Bernhard O. Using genome-scale models to predict biological capabilities. **Cell**, v. 161, n. 5, p. 971-987, 2015.

OECD, P. (2015). OECD-FAO agricultural outlook 2015-2024.

OHNO, Satoshi; UEMATSU, Saori; KURODA, Shinya. Quantitative metabolic fluxes regulated by trans-omic networks. *Biochemical Journal*, v. 479, n. 6, p. 787-804, 2022.

ORJUELA, Alvaro; CLARK, James. Green chemicals from used cooking oils: Trends, challenges, and opportunities. **Current opinion in green and sustainable chemistry**, v. 26, p. 100369, 2020.

ORTH, Jeffrey D.; THIELE, Ines; PALSSON, Bernhard Ø. What is flux balance analysis? **Nature biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 245-248, 2010.

PALSSON, Bernhard Ø. Systems biology: properties of reconstructed networks. **Cambridge university press**, 2006.

PAPANIKOLAOU, Seraphim; AGGELIS, George. Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 113, n. 8, p. 1031-1051, 2011.

PARSONS, Sophie; ALLEN, Michael J.; CHUCK, Christopher J. Coproducts of algae and yeast-derived single cell oils: A critical review of their role in improving biorefinery sustainability. *Bioresource Technology*, v. 303, p. 122862, 2020.

PASSOTH, Volkmar, and MATS Sandgren. "Biofuel production from straw hydrolysates: current achievements and perspectives." **Applied microbiology and biotechnology**, v.103, p.5105-5116, 2019.

POLBUREE, Pirapan et al. Characterization of oleaginous yeasts accumulating high levels of lipid when cultivated in glycerol and their potential for lipid production from biodiesel-derived crude glycerol. **Fungal biology**, v. 119, n. 12, p. 1194-1204, 2015.

PRICE, Nathan D.; REED, Jennifer L.; PALSSON, Bernhard Ø. Genome-scale models of microbial cells: evaluating the consequences of constraints. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 11, p. 886-897, 2004.

QIAO, K. et al. Engineering lipid overproduction in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. **Metabolic Engineering**, v. 29, p. 56–65, maio 2015.

RADULOVIC, Maja et al. The emergence of lipid droplets in yeast: current status and experimental approaches. **Current genetics**, v. 59, p. 231-242, 2013.

RATLEDGE, C. Microorganisms for lipids. **Acta Biotechnologica**, v. 11, n. 5, p. 429-438, 1991.

RATLEDGE, Colin. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. **Biochimie**, v. 86, n. 11, p. 807-815, 2004.

RATLEDGE, Colin. The role of malic enzyme as the provider of NADPH in oleaginous microorganisms: a reappraisal and unsolved problems. **Biotechnology letters**, v. 36, p. 1557-1568, 2014.

RATLEDGE, Colin; WYNN, James P. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. **Advances in applied microbiology**, v. 51, p. 1-52, 2002.

ROBLES-IGLESIAS, Raúl et al. Factors affecting the optimisation and scale-up of lipid accumulation in oleaginous yeasts for sustainable biofuels production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 171, p. 113043, 2023.

SAA, Pedro A.; NIELSEN, Lars K. Formulation, construction and analysis of kinetic models of metabolism: a review of modelling frameworks. **Biotechnology advances**, v. 35, n. 8, p. 981-1003, 2017.

SAENGE, Chanika et al. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 210-218, 2011.

SÁNCHEZ, Benjamín J. et al. Improving the phenotype predictions of a yeast genome-scale metabolic model by incorporating enzymatic constraints. **Molecular systems biology**, v. 13, n. 8, p. 935, 2017.

SANTEK, Mirela Ivancic; BELUHAN, Suncica; SANTEK, Bozidar. Production of microbial lipids from lignocellulosic biomass. **Adv. Biofuels Bioenergy**, p. 137-164, 2018.

SARKAR, Soumyadev et al. Removal of Pb (II), As (III), and Cr (VI) by nitrogen-starved *Papiliotrema laurentii* strain RY1. **Journal of basic microbiology**, v. 59, n. 10, p. 1016-1030, 2019.

SAURO, Herbert M. **Enzyme kinetics for systems biology**. Future Skill Software, 2011.

SRINIVASAN, Shyam; CLUETT, William R.; MAHADEVAN, Radhakrishnan. Constructing kinetic models of metabolism at genome-scales: A review. *Biotechnology journal*, v. 10, n. 9, p. 1345-1359, 2015.

SITEPU, Irnayuli et al. Carbon source utilization and inhibitor tolerance of 45 oleaginous yeast species. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 7, p. 1061-1070, 2014.

SREEHARSHA, Rachapudi Venkata; MOHAN, S. Venkata. Obscure yet promising oleaginous yeasts for fuel and chemical production. **Trends in biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 873-887, 2020.

SREEHARSHA, Rachapudi V.; TEJASWINI, G. Sai; MOHAN, S. Venkata. Dual-stage biorefinery to convert spentwash hydrolysate into oleochemicals using *Trichosporon cutaneum* and *Yarrowia lipolytica*. **Bioresource Technology**, v. 354, p. 127146, 2022.

STEPHANOPOULOS, Gregory. Metabolic fluxes and metabolic engineering. **Metabolic engineering**, v. 1, n. 1, p. 1-11, 1999.

SZCZEPAŃSKA, Patrycja; HAPETA; LAZAR, Zbigniew. Advances in production of high-value lipids by oleaginous yeasts. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 42, p. 1-22, 2022.

SZYPERSKI, Thomas et al. Bioreaction network topology and metabolic flux ratio analysis by biosynthetic fractional <sup>13</sup>C labeling and two-dimensional NMR spectroscopy. **Metabolic engineering**, v. 1, n. 3, p. 189-197, 1999.

TASKIN, Mesut et al. Microbial lipid production by cold-adapted oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* B9 in non-sterile whey medium. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 9, n. 5, p. 595-605, 2015.

TIUKOVA, Ievgeniia A. et al. Genome-scale model of *Rhodotorula toruloides* metabolism. **Biotechnology and bioengineering**, v. 116, n. 12, p. 3396-3408, 2019.

TOMÁS-PEJÓ, E.; MORALES-PALOMO, S.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C. Microbial lipids from organic wastes: outlook and challenges. **Bioresource Technology**, v. 323, p. 124612, 2021.

VENTORIM, Rafaela Zandonade et al. Genome-scale metabolic model of oleaginous yeast *Papiliotrema laurentii*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 180, p. 108353, 2022.

VIEIRA, Nívea Moreira et al. Isolation of a new *Papiliotrema laurentii* strain that displays capacity to achieve high lipid content from xylose. **3 Biotech**, v. 10, p. 1-14, 2020a.

VIEIRA, Nívea Moreira et al. Insights into oleaginous phenotype of the yeast *Papiliotrema laurentii*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 144, p. 103456, 2020b.

WANG, Guangyuan; LIU, Lin; LIANG, Wenxing. Single cell oil production from hydrolysates of inulin by a newly isolated yeast *Papiliotrema laurentii* AM113 for biodiesel making. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 184, n. 1, p. 168-181, 2018.

WEI, Yingying; MAO, Shubo; TU, Kang. Effect of preharvest spraying *Cryptococcus laurentii* on postharvest decay and quality of strawberry. **Biological Control**, v. 73, p. 68-74, 2014.

WU, Siguo et al. Phosphate-limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. **Bioresource technology**, v. 101, n. 15, p. 6124-6129, 2010.

YALÇIN, H. Tansel et al. Isolation and molecular identification of industrially important enzyme producer yeasts from tree barks and fruits. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 3, p. 1079-1088, 2021.

YAN, Feng Xin et al. Overexpression of  $\Delta 12, \Delta 15$ -desaturases for enhanced lipids synthesis in *yarrowia lipolytica*. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 289, 2020.

YASEMI, Mohammadreza; JOLICOEUR, Mario. Modelling cell metabolism: a review on constraint-based steady-state and kinetic approaches. **Processes**, v. 9, n. 2, p. 322, 2021.

ZAMPIERI, Guido et al. Machine and deep learning meet genome-scale metabolic modeling. **PLoS computational biology**, v. 15, n. 7, p. e1007084, 2019.

ZHANG, S. et al. Engineering *Rhodospiridium toruloides* for increased lipid production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 113, n. 5, p. 1056–1066, 2016.

## CAPÍTULO 2 - DESENVOLVIMENTO DE UM MEIO DE CULTURA PARA A LEVEDURA OLEAGINOSA *Papiliotrema laurentii* UFV-1 COMBINANDO ANÁLISE DE BALANÇO DE FLUXO COM EXPERIMENTO FATORIAL

### Destaques

- A FBA permitiu identificar fontes de carbono e nitrogênio que favoreceram o crescimento de *P. laurentii*, norteadando o delineamento de experimentos fatoriais visando a otimização da produção de biomassa.
- A combinação de lactose e ureia como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente, favoreceu o aumento da produção de biomassa e lipídios de *P. laurentii*.
- O aumento da concentração do extrato de levedura até 0,5 g L<sup>-1</sup> ocasionou o aumento da produção de biomassa e de lipídios em *P. laurentii*.
- A condição de cultivo baseada na combinação de 28,56 g L<sup>-1</sup> de lactose, 0,234 g L<sup>-1</sup> de ureia e 0,5 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, com a razão C:N de 75:1, resultou em um aumento de 500% tanto na produção de biomassa, quanto no título lipídico quando compara à condição padrão, representada pelo meio de cultivo SS2 contendo 0,523 g L<sup>-1</sup> de sulfato de amônio e 30 g L<sup>-1</sup> de glicose e 0,1 g L<sup>-1</sup>.

## Resumo

A demanda por oleoquímicos aumentou nas últimas décadas, contudo, esses compostos são geralmente produzidos a partir de óleos vegetais, o que não é ecologicamente sustentável. As leveduras oleaginosas surgem como uma alternativa sustentável, pois não requerem terras aráveis, evitando competição com a produção de alimentos. A levedura oleaginosa *Papiliotrema laurentii* é capaz de acumular 63,5% de lipídios em seu peso seco. No entanto, seu crescimento é limitado em meios de cultivo convencionais, prejudicando a produção de lipídios. Este trabalho apresenta uma estratégia para o desenvolvimento de um meio de cultura que favoreça a produção de biomassa por *P. laurentii*, utilizando a FBA para nortear a seleção dos fatores nutricionais. A combinação de lactose e ureia promoveu o maior aumento da produção de biomassa e lipídios. O aumento da concentração do extrato de levedura até 0,5 g/L favoreceu também a produção de biomassa. A combinação de 28,56 g L<sup>-1</sup> de lactose, 0,234 g L<sup>-1</sup> de ureia e 0,5 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura aumentou em 500% a produção de biomassa e o título lipídico por *P. laurentii*. Esses resultados demonstram que a metodologia proposta foi adequada para aumentar a produção de biomassa e de lipídios por *P. laurentii*.

## 2.1. Introdução

A demanda por oleoquímicos produzidos tradicionalmente a partir de biomassa vegetal e animal, vem aumentando ao longo dos anos (Adrio, 2017). Projeções indicam que essa tal continuará a aumentar (OECD, 2015; Ates & Bukowski, 2023). No entanto, a sustentabilidade da produção de oleoquímicos gera grande preocupação, haja vista que a maioria deles é produzida a partir de óleos obtidos de biomassa vegetal (Bharathiraja et al., 2017; Bhuiya et al., 2016; Bonatsos et al., 2020). Essa produção requer grandes extensões de terras aráveis, além de elevadas quantidades de água e fertilizantes, resultando em competição com a produção de alimentos (Tomas-Pejo et al. 2021). Uma alternativa sustentável para a obtenção de lipídios utilizados na produção de oleoquímicos é o uso de óleos microbianos, produzidos por microrganismos com elevada capacidade de acumular lipídios (Chatterjee and Mohan 2020). A produção de óleos microbianos por bactérias, leveduras, fungos filamentosos e microalgas é independente de condições geográficas e sazonais, requer menor espaço para produção e apresenta maior rendimento lipídico em comparação com a obtenção de óleos vegetais (Chatterjee and Mohan 2020; Meng et al., 2009).

Microrganismos oleaginosos são definidos como aqueles capazes de acumular pelo menos 20% de seu peso em lipídios (Ratledge, 1991; Robles-Iglesias et al., 2023; Szczepańska et al., 2022). Dentre esses microrganismos, as leveduras oleaginosas oferecem várias vantagens, como altas taxas de crescimento em comparação com outros organismos oleaginosos, capacidade de acumular altos teores de lipídios, composição semelhante à de óleos vegetais, apresentam elevada produtividade volumétrica e possuem ampla diversidade metabólica, o que possibilita a obtenção de biomassa a partir de uma gama de nutrientes, alta variedade de compostos produzidos (Saenge et al., 2011; Spier et al., 2015; Sreeharsha & Mohan, 2020; Sreeharsha; Tejaswini; Mohan, 2022; Wang et al., 2015). Diversas espécies de leveduras oleaginosas não convencionais podem crescer em uma ampla gama de açúcares derivados de diferentes substratos, como biomassas lignocelulósicas à base de plantas, que incluem os carboidratos, celulose e hemicelulose, representando uma fonte de carbono de baixo custo para a produção de óleo por essas espécies (Garlapati et al., 2020; Slininger et al., 2016; Chaturvedi; Bhattacharya; Khare, 2018).

*Papiliotrema laurentii* é uma levedura oleaginosa não convencional pertencente ao filo Basidiomycota, que apresenta dimorfismo, capacidade de sintetizar cápsula e ausência de

motilidade (Liu et al., 2015; Kurtzman, 1973). Além disso, *P. laurentii* é capaz de assimilar várias fontes de carbono, como glicose, xilose, arabinose, celobiose, manose, galactose, ramnose, sacarose, lactose e ácido galacturônico (Sitepu et al., 2014). Um estudo recente observou que *P. laurentii*, também acumula lipídios mais rapidamente do que outras leveduras oleaginosas, alcançando a produção máxima em 48 h de cultivo (Vieira et al., 2020). Em meio de cultivo contendo xilose como fonte de carbono e condições otimizadas (30 °C; 300 rpm;  $DO_{600} = 0,8$  e  $pH = 7$ ), *P. laurentii* alcança 63,5% (p/p) de seu peso seco em lipídios (Vieira et al., 2020). No entanto, o crescimento de *P. laurentii* é limitado em meios de cultura comumente utilizados para cultivo de leveduras oleaginosas e, devido ao conhecimento limitado sobre suas características fisiológicas, o planejamento de experimentos fatoriais torna-se desafiador, resultando em um delineamento mais intuitivo. Recentemente, o primeiro modelo metabólico em escala genômica de *P. laurentii* foi publicado (Ventorim et al. 2022), e oferece uma ferramenta útil para auxiliar na compreensão da fisiologia dessa levedura (De Almeida et al., 2022).

A análise dos fluxos metabólicos permite compreender as respostas de um microrganismo às variações ambientais, identificar restrições nas vias metabólicas que limitam a produção de compostos específicos, avaliar os níveis de controle metabólico e estabelecer modelos preditivos relevantes para o desenvolvimento de estratégias de aprimoramento e processamento (Cheah et al., 2020; Niederberger et al., 1992; Foster et al., 2019). A FBA utiliza programação linear para prever a distribuição de fluxos, impondo restrições com o objetivo de maximizar ou minimizar um determinado objetivo. No entanto, para aplicar essa abordagem ao estudo do fluxo metabólico, é necessário construir uma matriz estequiométrica que represente as reações e os metabólitos presentes em um organismo, o denominado modelo metabólico em escala genômica (GEM). GEMs são reconstruções *in silico* que representam matematicamente o metabolismo de um organismo com base na anotação genômica e nas capacidades metabólicas celulares, permitindo a conexão entre genes, proteínas e reações, relacionando o genótipo ao metabolismo. Portanto, a FBA aplicada a modelos metabólicos fornece informações de fluxos que podem representar o comportamento de um determinado microrganismo em um determinado ambiente (Geng & Nielsen, 2017; Nielsen, 2017; O'Brien et al., 2015; Orth; Thiele; Palsson, 2010).

Neste estudo, aplicamos a FBA ao GEM de *P. laurentii* (*papla-GEM*) para identificar fontes de carbono e nitrogênio capazes de aumentar a produção de biomassa, norteando o delineamento de experimentos fatoriais. Observou-se que a combinação de lactose e ureia

promoveu o maior aumento tanto na produção de biomassa quanto no título lipídico. Além disso, foi avaliado o efeito do aumento da concentração do extrato de levedura, com a finalidade de verificar se existem outros requerimentos nutricionais que auxiliam na produção de biomassa. Um aumento de até  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  de extrato de levedura promoveu um aumento substancial na produção de biomassa e título lipídico. Assim, a combinação que resultou na maior produção de biomassa e título lipídico foi de  $28,56 \text{ g L}^{-1}$  de lactose,  $0,234 \text{ g L}^{-1}$  de ureia e  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  de extrato de levedura, com uma relação C:N de 75:1.

## 2.2. Metodologia

### 2.2.1. Análise de Balanço de Fluxo

O modelo metabólico em escala genômica *papla-GEM* disponível no repositório do GitHub (<https://github.com/SysBioChalmers/papla-GEM>) foi utilizado para as FBAs, com o intuito de prever as velocidades de crescimento em *P. laurentii*. Antes de realizar as simulações, o *papla-GEM* foi curado manualmente para corrigir reações desbalanceadas utilizando a função "getElementalBalance" da caixa de ferramentas RAVEN (Agren et al., 2013). Adicionalmente, o software MEMOTE foi empregado para identificar possíveis reações desbalanceadas com base na carga metabólica (Suthers et al., 2021).

Em seguida, procedeu-se à realização da abordagem FBA utilizando a caixa de ferramentas RAVEN e o solucionador Gurobi (versão 9.1.1., Gurobi Optimization LLC, Estados Unidos), definindo a formação de biomassa como a função objetivo. Diferentes velocidades de crescimento e de captação de glicose determinadas experimentalmente por Vantorim et al. (2022), em meios mínimos e complexos, sob diferentes condições de cultivo, foram utilizadas para fornecer as restrições necessárias para execução das simulações. A fim de controlar a taxa de captação da fonte de carbono, dados experimentais obtidos durante a fase exponencial do cultivo conduzido em batelada, em meio de cultura mínimo Yeast Nitrogen Base (YNB) contendo  $5 \text{ g L}^{-1}$  de glicose como fonte de carbono a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  e pH inicial de 4,5, foram empregados como a condição de referência para a FBA. Dessa maneira, a taxa de captação de glicose foi restrita para  $5 \text{ mmol h}^{-1}$  conforme determinado experimentalmente, enquanto as demais fontes de carbono tiveram suas taxas de captação ajustadas para fornecer a mesma quantidade de carbono por unidade de tempo.

No intuito de identificar as fontes de carbono mais favoráveis para o crescimento de *P. laurentii*, 10 diferentes fontes de carbono, a saber: acetato, lactato, glicerol, glicose, xilose, arabinose, galactose, manose, lactose e sacarose, foram avaliadas considerando como fonte de nitrogênio o sulfato de amônio com taxa de captação de  $1 \text{ mmol gMS}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Foram selecionados o acetato e o glicerol em virtude de serem fontes de carbono economicamente acessíveis e de fácil aquisição, encontrados como subprodutos e resíduos de processos biotecnológicos. Ademais, muitos microrganismos têm a capacidade de utilizá-los como fonte de carbono, assim como ocorre para com o lactato, comumente gerado em processos fermentativos (Chen et al. 2018; Da Silva et al. 2009; Oyekola et al. 2010; Xu et al. 2018). A glicose, xilose e arabinose são comumente encontradas na biomassa lignocelulósica, que é uma matéria-prima de baixo custo (Saika et al. 2020; Seiboth & Metz. 2011; Wang et al. 2019). A manose também pode ser encontrada na biomassa lignocelulósica, como em sementes de açaí, bem como no polissacarídeo glucomanana presente na farinha de konjac, (Monteiro et al., 2019; Wang et al. 2019; Yang et al. 2023). A lactose e a sacarose são açúcares de menor custo e amplamente utilizados por microrganismos, sendo a lactose encontrada no soro de leite, gerado na produção de queijos, e a sacarose abundante no melaço proveniente da produção de açúcar de cana-de-açúcar. Além disso, a lactose é composta por glicose e galactose, portanto a galactose também foi selecionada como fonte de carbono a ser avaliada (Asku & Eren et al. 2007; Bento et al. 2019; Szczerba et al. 2020; Wang et al. 2018).

Posteriormente, 25 fontes de nitrogênio, também com taxa de captação de  $1 \text{ mmol gMS}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , foram avaliadas individualmente a fim de se identificar as fontes que apresentam a maior velocidade de crescimento. Com esse propósito, a glicose foi utilizada como fonte de carbono na taxa de captação de  $5 \text{ mmol gMS}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . As fontes de nitrogênio avaliadas foram: sulfato de amônio fonte inorgânica padrão, ureia, alantoína, ornitina, citrulina e os 20 aminoácidos proteicos. Os aminoácidos foram utilizados como fonte orgânica de nitrogênio por geralmente proporcionarem incrementos na produção de biomassa; a ureia e a ornitina foram selecionadas por serem encontradas em resíduos agrícolas e por proporcionarem aumento na produção de biomassa em leveduras; enquanto a ornitina e a citrulina podem ser utilizadas para produção de arginina e sustentam crescimento em leveduras (El-Sayed et al., 2019; Gutiérrez et al., 2013; Godard et al., 2007; Schafferer., 2015, Su et al., 2020). Em seguida, simulações foram realizadas combinando todas as fontes de carbono com todas as fontes de nitrogênio avaliadas.

### 2.2.2. Microrganismo e manutenção

A linhagem *P. laurentii* UFV-1 utilizada neste estudo faz parte do acervo de culturas do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa. A levedura foi armazenada a -80 °C em meio YP (10 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 20 g L<sup>-1</sup> de peptona) contendo 50% (v/v) de glicerol. Essa linhagem foi isolada de uma amostra de solo coletada no Parque Nacional da Serra dos Órgãos (Vieira et al., 2020).

### 2.2.3. Condições de cultivo

Inicialmente, as células de *P. laurentii* UFV-1 foram ativadas em meio contendo 10 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 20 g L<sup>-1</sup> de peptona, 20 g L<sup>-1</sup> de glicose e 20 g L<sup>-1</sup> de ágar (YPD-Ágar) a 30 °C por 48 h. Após esse período, uma colônia isolada foi transferida para frasco Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio SS2 conforme descrito por Tanimura et al. (2014), com alteração na concentração de sulfato de amônio. O meio SS2 foi composto por 30 g L<sup>-1</sup> de glicose, 7,15 g L<sup>-1</sup> de sulfato de amônio, 0,5 g L<sup>-1</sup> de sulfato de magnésio, 0,1 g L<sup>-1</sup> de cloreto de cálcio, 0,1 g L<sup>-1</sup> de cloreto de sódio e 0,1 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura. As culturas foram então incubadas em um agitador a 200 rpm e 30 °C por aproximadamente 19 h. Posteriormente, as culturas foram centrifugadas a 4000 g por 10 minutos a 4 °C. As células sedimentadas foram lavadas duas vezes com água contendo 1 g L<sup>-1</sup> de peptona e ressuspendidas em 5 mL de água com 1 g L<sup>-1</sup> de peptona. A DO<sub>600</sub> foi então medida e, com base no valor obtido, um volume específico da suspensão de células foi transferido para novos meios de cultivo definidos no delineamento experimental, de modo que a DO<sub>600</sub> inicial dos cultivos fosse aproximadamente 0,1.

### 2.2.4. Delineamento experimental

Para avaliar o efeito dos nutrientes selecionados pela FBA no acúmulo de biomassa, foi realizado um experimento fatorial triplo (4x3x2) com o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 2 repetições por tratamento, as análises estatísticas foram realizadas usando o software R, versão 4.1.1. Os fatores avaliados incluíram: 4 fontes de carbono, 3 concentrações para cada fonte de carbono e 2 fontes de nitrogênio com concentração ajustada para manter a razão carbono:nitrogênio (C:N) em 100:1, com a finalidade de favorecer o fenótipo oleaginoso. Consequentemente, foram obtidos 24

tratamentos conforme apresentado na Tabela 1, totalizando 48 cultivos. Com base nos dados obtidos, foi realizado o teste de Shapiro-Wilk, a um nível de significância de 5%, para verificar a normalidade dos resíduos. O teste de Bartlett, a um nível de significância de 5%, foi usado para verificar a homogeneidade das variâncias residuais por tratamento. Essas análises foram executadas para verificar a possibilidade do uso da análise de variância (ANOVA).

Os tratamentos foram avaliados pela ANOVA com o uso do teste de Tukey, a um nível de significância de 5%. É importante destacar que os cultivos de *P. laurentii* foram conduzidos em três concentrações diferentes, mantendo uma razão C:N de 100:1, a fim de favorecer o fenótipo oleaginoso. Para isso, as concentrações de cada um dos açúcares selecionados foram ajustadas para fornecer 4, 8 e 12 g L<sup>-1</sup> de carbono. As concentrações das fontes de nitrogênio foram estabelecidas de maneira a fornecer a quantidade correta de nitrogênio para manter a razão C:N em 100:1, levando em consideração o extrato de levedura contendo 10% do peso em nitrogênio. Esse desenho experimental caracterizou um fatorial triplo em três níveis.

**Tabela 1:** Matriz de composição do fatorial 4x3x2.

| Fonte de Carbono              | Concentração de Carbono (g L <sup>-1</sup> ) | Fonte de Nitrogênio (g L <sup>-1</sup> ) |                          |                          |
|-------------------------------|--|--|--------------------------|--------------------------|
|                               |  | Sulfato de Amônio (A)                    | Ureia (U)                |                          |
| Glicose (g L <sup>-1</sup> )  | 10   | 4  | 0,143<br>(Tratamento 1)  | 0,064<br>(Tratamento 13) |
|                               | 20   | 8  | 0,333<br>(Tratamento 2)  | 0,149<br>(Tratamento 14) |
|                               | 30   | 12                                       | 0,523<br>(Tratamento 3)  | 0,234<br>(Tratamento 15) |
| Xilose (g L <sup>-1</sup> )   | 10   | 4  | 0,143<br>(Tratamento 4)  | 0,064<br>(Tratamento 16) |
|                               | 20   | 8  | 0,333<br>(Tratamento 5)  | 0,149<br>(Tratamento 17) |
|                               | 30   | 12                                       | 0,523<br>(Tratamento 6)  | 0,234<br>(Tratamento 18) |
| Sacarose (g L <sup>-1</sup> ) | 9,52   | 4  | 0,143<br>(Tratamento 7)  | 0,064<br>(Tratamento 19) |
|                               | 19,04  | 8  | 0,333<br>(Tratamento 8)  | 0,149<br>(Tratamento 20) |
|                               | 28,56  | 12                                       | 0,523<br>(Tratamento 9)  | 0,234<br>(Tratamento 21) |
| Lactose (g L <sup>-1</sup> )  | 9,52   | 4  | 0,143<br>(Tratamento 10) | 0,064<br>(Tratamento 22) |
|                               | 19,04  | 8  | 0,333<br>(Tratamento 11) | 0,149<br>(Tratamento 23) |
|                               | 28,56  | 12                                       | 0,523<br>(Tratamento 12) | 0,234<br>(Tratamento 24) |

Após a realização do experimento fatorial 4x3x2, descrito na tabela 1, e a seleção da melhor combinação entre a fonte de carbono e a fonte de nitrogênio, foi realizado um novo experimento fatorial 4x3 com 2 repetições por tratamento. Nesse experimento, foram avaliadas quatro concentrações de extrato de levedura e três concentrações da fonte de carbono selecionada (lactose), conforme descrito na Tabela 2. A avaliação de diferentes

concentrações do extrato de levedura objetivou observar se o aumento da concentração de outros requerimentos nutricionais, presentes no extrato de levedura, proporciona um aumento na produção de biomassa, dado que esse substrato complexo é rico em uma gama de nutrientes. Com o objetivo de manter a mesma proporção de lactose e ureia do experimento fatorial anterior, para o cálculo da relação C:N não foi considerado o aumento do teor de nitrogênio ocasionado pelo acréscimo do extrato de levedura. Dessa forma, o estímulo para a produção de biomassa foi priorizado. A análise do título lipídico foi utilizada para determinar o momento em que a atenuação da condição de acúmulo lipídico, se torna prejudicial para a produção total de lipídios ao término do cultivo. Portanto, a relação C:N dos cultivos permaneceu em 100:1 apenas quando a concentração de extrato de levedura foi de 0,1 g L<sup>-1</sup> (Tabela 2). Assim, foram gerados 12 tratamentos, totalizando 24 cultivos. Foi adotado um modelo completo de segunda ordem com interação como representação do experimento, conforme o demonstrado pela equação:

$$y = \beta_0 + \beta_1 a + \beta_2 a^2 + \beta_3 b + \beta_4 b^2 + \beta_5 ab + \epsilon \text{ em que:}$$

$\beta_0$  é a constante da regressão.

$\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\beta_4$  e  $\beta_5$  são os coeficientes de regressão

As letras  $a$ ,  $b$  e  $ab$  representam os efeitos da concentração do extrato de levedura, concentração da fonte de carbono e a interação entre as concentrações do extrato de levedura e da fonte de carbono, respectivamente.

O ajuste do modelo foi realizado pelo procedimento de remoção gradual dos termos não significativos avaliados por ANOVA. A avaliação teve início pela interação e os termos foram retirados um a um quando não apresentavam significância estatística pelo teste t de Student a 5% de significância.

**Tabela 2:** Tratamentos obtidos no fatorial 4x3.

| <b>Tratamento</b> | <b>Extrato de levedura (g L<sup>-1</sup>)</b> | <b>Razão C:N</b> | <b>Lactose (g L<sup>-1</sup>)</b> | <b>Ureia (g L<sup>-1</sup>)</b> |
|-------------------|---|------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| 1                 | 0,1   | 100:1            |                                   |                                 |
| 2                 | 0,5   | 75:1             |                                   |                                 |
| 3                 | 1   | 57:1             | 28,56                             | 0,234                           |
| 4                 | 1,5   | 46:1             |                                   |                                 |
| 5                 | 0,1   | 100:1            |                                   |                                 |
| 6                 | 0,5   | 75:1             |                                   |                                 |
| 7                 | 1   | 57:1             | 38,08                             | 0,319                           |
| 8                 | 1,5   | 46:1             |                                   |                                 |
| 9                 | 0,1   | 100:1            |                                   |                                 |
| 10                | 0,5   | 75:1             |                                   |                                 |
| 11                | 1   | 57:1             | 47,6                              | 0,404                           |
| 12                | 1,5   | 46:1             |                                   |                                 |

#### 2.2.5. Determinação da biomassa

A biomassa celular (g L<sup>-1</sup>) foi obtida por meio da determinação gravimétrica após 48 h de cultivo. As culturas foram transferidas para tubos de centrifuga de fundo cônico de 50 mL previamente secos e com massa aferida. Em seguida, foram centrifugadas a 1912 g por 10 minutos a 4 °C. As células sedimentadas foram então lavadas duas vezes com água contendo 1 g L<sup>-1</sup> de peptona e o sobrenadante foi descartado. Posteriormente, as células sedimentadas nos tubos de centrifuga de fundo cônico foram congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas. Após esse procedimento, as amostras foram armazenadas em um dessecador até a observação de que a biomassa se manteve constante. Além disso, após as 48 h de cultivo, foram avaliadas a D.O<sub>600</sub> e a biomassa final.

#### 2.2.6. Extração e determinação do conteúdo lipídico

Após a obtenção das amostras liofilizadas e a determinação da massa celular, aproximadamente 50 mg de massa seca foram transferidos para microtubos (MCT-200-C, Axygen, Estados Unidos) de 2 ml e utilizados para a extração e determinação do conteúdo lipídico. O procedimento de extração de lipídios foi efetuado de acordo com a metodologia

proposta por Bligh e Dyer (1959) com modificações. Dessa forma, 1 mL de solução metanol:clorofórmio (2:1) e duas esferas de tungstênio foram adicionados aos tubos contendo a biomassa. Em seguida, as amostras foram maceradas em moinho de bolas (TissueLyserII, Qiagen N.V., Holanda) com a programação de 30 agitações por segundo durante 5 minutos.

Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 13201 g por 10 min a 10 °C e o sobrenadante foi transferido para tubos de vidro para centrífuga. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes. Logo após, foram adicionados 3 mL de clorofórmio aos tubos de vidro para centrífuga contendo os sobrenadantes e a mistura foi homogeneizada com pipeta, seguida pela adição de 2 mL de solução a 1% (p/v) de NaCl para favorecer a separação de fases. A mistura foi centrifugada a 1111 g por 20 minutos a 10 °C, e a fase orgânica coletada e acondicionada em microtubos de centrífuga por amostra com massa previamente aferida. Em seguida, o solvente foi volatilizado em cabine de exaustão utilizando um banho seco a 60 °C por 20 h e os lipídios extraídos foram secos em estufa a 60 °C até a observação de massa constante.

A determinação do teor lipídico, em porcentagem, foi realizada seguindo a Equação 1:

$$\text{Equação 1: } l = 100 \times \frac{Pf - Pi}{Ms}$$

Nessa equação, *l* representa o teor lipídico, *Pf* representa a massa final do microtubo contendo o lipídio extraído após a evaporação do solvente a 60 °C, até atingir uma massa constante. *Pi* representa o peso do microtubo vazio e seco, e *Ms* representa a massa da biomassa seca utilizada.

#### 2.2.7. Avaliação do consumo das fontes de carbono

A concentração das fontes de carbono foi determinada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Para isso, o sobrenadante da cultura foi recuperado por centrifugação e filtrado utilizando filtros de 0,22 µm x 0,13 mm (Nylon, Merck Milipore Co., Alemanha) antes de ser injetado no cromatógrafo (CTO-20A, Shimadzu, Japão). A análise foi conduzida empregando um método isocrático, no qual uma alíquota de 20 µL da amostra foi injetada em uma coluna de troca iônica Aminex HPX-87H (300×7,8 mm, 9 µm, Bio-Rad, Munique, Alemanha) com 5 mM de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como fase móvel a uma taxa de fluxo de 0,7 mL/min, a uma temperatura de 40 °C, com detecção por índice de refração (RID-20A,

Shimadzu, Japão). A quantificação desses carboidratos foi realizada por meio de calibração e verificação com padrões externos. O consumo foi calculado pela subtração da concentração da fonte de carbono em  $\text{g L}^{-1}$  quantificado no início do cultivo (0 h) pela concentração da fonte de carbono em  $\text{g L}^{-1}$  no final do cultivo (48 h).

#### 2.2.8. Parâmetros fermentativos

A determinação dos parâmetros fermentativos foi realizada de acordo com as seguintes equações:

**Equação 1:** Teor lipídico ( $l\%$ ):  $l\% = \left(\frac{Pl}{Ms}\right) \times 100$ . Em que  $Pl$  e  $Ms$  correspondem à massa seca dos lipídios extraídos e à massa seca da biomassa utilizada para extração, respectivamente.

**Equação 2:** Concentração de biomassa ( $X_{(\text{g L}^{-1})}$ ):  $X_{(\text{g L}^{-1})} = \frac{Xf - Xi}{V}$ . Em que  $Xf$ ,  $Xi$  e  $V$  representam o peso do tubo de centrífuga de fundo cônico de 50 mL com a biomassa, o peso do tubo de centrífuga de fundo cônico de 50 mL seco e vazio e o volume final do cultivo respectivamente.

**Equação 3:** Título lipídico ( $TL_{(\text{g L}^{-1})}$ ):  $TL_{(\text{g L}^{-1})} = \left(\frac{Pl}{Ms}\right) \times Xf$ .

**Equação 4:** Produtividade Volumétrica de lipídios ( $Q_{pl}$ ):  $Q_{pl} = \frac{TL(\text{g/L})}{t}$ . No qual  $t$  representa o tempo de cultivo.

### 2.3. Resultados

#### 2.3.1. Curadoria do modelo *papla*-GEM

Um total de 410 reações da primeira versão do modelo metabólico em escala genômica *papla*-GEM foram balanceadas, refinando o modelo em relação ao balanço de cargas, incluindo prótons e moléculas de água. As modificações realizadas não afetaram os fluxos previstos para a função objetivo testada, ou seja, a velocidade de crescimento, entretanto, considerando a possibilidade de utilizar nutrientes carregado como componentes do meio de cultivo, como aminoácidos, o balanço de cargas pode se fazer essencial para a acurácia das predições.

### 2.3.2. Predição do crescimento de *Papiliotrema laurentii* em diferentes fontes de carbono e fontes de nitrogênio

As predições de crescimento *in silico* de *P. laurentii* em diferentes fontes de carbono foram realizadas por meio da FBA empregando o modelo *papla-GEM* refinado, com a taxa de captação de sulfato de amônio fixada em  $1 \text{ mmol gMS}^{-1} \text{ h}^{-1}$  para observar apenas o efeito da variação da fonte de carbono (Tabela 3). Para garantir que a mesma quantidade de átomos de carbono fosse assimilada, as taxas de captação das fontes de carbono foram normalizadas em relação ao número de carbonos que cada uma possuía, definindo como referência a taxa de captação de glicose (contendo 6 átomos de carbono) em  $5 \text{ mmol gMS}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

Nessas condições, para taxa de captação de sulfato de amônio de  $1 \text{ mmol gMS}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , os carboidratos xilose e arabinose (principais constituintes da fração hemicelulósica de biomassas vegetais), em conjunto com o lactato, destacaram-se predizendo as maiores velocidades de crescimento ( $0,34 \text{ h}^{-1}$ ), seguidos pelas hexoses (glicose, manose e galactose) e por fim os dissacarídeos lactose e sacarose promoveram as menores velocidades de crescimento. As predições das velocidades de crescimento de *P. laurentii* em outras fontes de nitrogênio também foram analisadas, fixando as taxas de captação em  $1 \text{ mmol gMS}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Nessas condições, a glutamina foi a fonte de nitrogênio que mais favoreceu o crescimento de *P. laurentii* em todas as fontes de carbono avaliadas, predizendo as maiores velocidades de crescimento. Quando as fontes de nitrogênio foram a citrulina, cisteína, histidina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina e tirosina não houve fluxo direcionado para o crescimento de *P. laurentii*, independentemente da combinação com as fontes de carbono. Em geral, os demais aminoácidos (glicina, alanina, arginina, asparagina, aspartato, glutamato, glutamina, isoleucina, leucina, treonina, triptofano, valina e ornitina) exibiram maiores velocidades de crescimento preditas quando combinadas aos monossacarídeos e ácidos orgânicos, assim como observado para as simulações empregando sulfato de amônio na mesma taxa de captação. Ademais, os resultados de fluxo relacionados ao glicerol não foram considerados, pois a *P. laurentii* UFV-1 não foi capaz de o utilizar experimentalmente.

A ureia demonstrou ser uma fonte de nitrogênio promissora, apresentando velocidades de crescimento preditas superiores ao sulfato de amônio e de alguns aminoácidos, para todas as fontes de carbono avaliadas. Cabe destacar que a ureia é uma fonte de nitrogênio de baixo custo encontrada em fertilizantes e diversos resíduos como em águas residuais

municipais, resíduos de indústrias madeireiras e resíduos agrícolas, considerada, portanto, promissora para utilização em meios de fermentação (Brabender et al., 2018; Girods et al., 2008; Shi et al., 2021; Gonçalves et al., 2021). Assim como a ureia, a alantoína, um composto nitrogenado oriundo do catabolismo de purinas, apresentou velocidades de crescimento preditas superiores ao sulfato de amônio em todas as fontes de carbono avaliadas.

**Tabela 3:** Velocidades de crescimento ( $h^{-1}$ ) previstas por FBA nas diferentes combinações de fontes de carbono e nitrogênio definindo a produção de biomassa como função objetivo.

| Fontes de nitrogênio | Fontes de Carbono |           |         |         |        |           |         |          |         |
|----------------------|-------------------|-----------|---------|---------|--------|-----------|---------|----------|---------|
|                      | Xilose            | Arabinose | Lactato | Acetato | Manose | Galactose | Glicose | Sacarose | Lactose |
| Sulfato de amônio    | 0,34              | 0,34      | 0,34    | 0,29    | 0,29   | 0,29      | 0,29    | 0,14     | 0,14    |
| reia                 | 0,41              | 0,41      | 0,33    | 0,29    | 0,41   | 0,41      | 0,42    | 0,29     | 0,29    |
| Glicina              | 0,34              | 0,34      | 0,38    | 0,36    | 0,29   | 0,29      | 0,29    | 0,14     | 0,14    |
| Alanina              | 0,34              | 0,34      | 0,42    | 0,43    | 0,29   | 0,46      | 0,29    | 0,14     | 0,14    |
| Arginina             | 0,42              | 0,42      | 0,34    | 0,30    | 0,43   | 0,43      | 0,43    | 0,43     | 0,43    |
| Asparagina           | 0,46              | 0,46      | 0,42    | 0,44    | 0,46   | 0,46      | 0,47    | 0,29     | 0,29    |
| Aspartato            | 0,34              | 0,34      | 0,42    | 0,43    | 0,29   | 0,29      | 0,29    | 0,14     | 0,14    |
| Glutamato            | 0,34              | 0,34      | 0,46    | 0,50    | 0,29   | 0,29      | 0,29    | 0,14     | 0,14    |
| Glutamina            | 0,50              | 0,49      | 0,49    | 0,50    | 0,48   | 0,48      | 0,49    | 0,29     | 0,29    |
| Isoleucina           | 0,34              | 0,34      | 0,35    | 0,32    | 0,29   | 0,29      | 0,29    | 0,14     | 0,14    |
| Leucina              | 0,34              | 0,34      | 0,35    | 0,32    | 0,29   | 0,29      | 0,29    | 0,14     | 0,14    |
| Treonina             | 0,34              | 0,34      | 0,30    | 0,26    | 0,29   | 0,29      | 0,29    | 0,14     | 0,14    |
| Triptofano           | 0,35              | 0,35      | 0,35    | 0,32    | 0,29   | 0,29      | 0,29    | 0,15     | 0,15    |
| Valina               | 0,34              | 0,34      | 0,36    | 0,32    | 0,29   | 0,29      | 0,29    | 0,14     | 0,14    |
| Alantoína            | 0,42              | 0,42      | 0,36    | 0,34    | 0,43   | 0,43      | 0,43    | 0,43     | 0,43    |
| Ornitina             | 0,37              | 0,37      | 0,34    | 0,30    | 0,31   | 0,31      | 0,31    | 0,16     | 0,16    |

Com base nas simulações e nos dados experimentais, as fontes de nitrogênio selecionadas para o experimento fatorial foram a ureia como fonte de nitrogênio orgânica e o sulfato de amônio como fonte de nitrogênio inorgânica. As fontes de carbono selecionadas foram: glicose, como fonte de carbono referência, xilose, lactose e sacarose. Essas escolhas foram feitas considerando não apenas as velocidades de crescimento, mas também a natureza das fontes de carbono em questão. Por exemplo, a xilose é abundante em materiais lignocelulósicos, como o bagaço de cana, que é um resíduo da indústria açucareira. A lactose está presente no soro de leite, que é um subproduto da indústria de laticínios, e a sacarose é um substrato relativamente fácil de obter, sendo encontrado em grande quantidade no melaço de cana-de-açúcar.

2.3.3. Avaliação da produção de biomassa por *P. laurentii* em meio de cultivo contendo as combinações das fontes de carbono e nitrogênio selecionadas por meio das análises *in silico*

Como mencionado anteriormente, a FBA foi utilizada para prever as velocidades de crescimento de *P. laurentii* em diferentes fontes de carbono e nitrogênio no intuito de selecionar as mais promissoras em termos de aumento da produção de biomassa. Sendo assim, os açúcares glicose, xilose, sacarose e lactose foram selecionados como fontes de carbono, enquanto sulfato de amônio e ureia foram selecionadas como fontes de nitrogênio. É importante destacar que os cultivos de *P. laurentii* foram conduzidos em três concentrações diferentes, mantendo uma razão carbono-nitrogênio (razão C:N) de 100:1, a fim de favorecer o fenótipo oleaginoso.

Ao avaliar a concentração de biomassa dos tratamentos, interações duplas significativas foram observadas entre as variáveis concentração de carbono-nitrogênio, concentração de carbono-fonte de carbono, e fonte de carbono-nitrogênio, apresentado um coeficiente de variação (CV) de 7,59% (Tabela 4). Referente à interação da concentração de carbono com a fonte de nitrogênio, foi observado que o aumento da concentração de carbono afetou a produção de biomassa em ambas as fontes de nitrogênio. Quando as concentrações de açúcares que fornecem 4 g L<sup>-1</sup> de carbono, ambas as fontes de nitrogênio ocasionaram médias de biomassa final semelhantes. No entanto, a partir das concentrações de açúcares que fornecem de 8 a 12 g L<sup>-1</sup> de carbono, a ureia favoreceu a obtenção maior de biomassa final (Tabela 4).

Além disso, na presença de sulfato de amônio, houve efeito positivo ( $p$ -valor  $< 0,05$ ) da concentração de carbono sobre a produção de biomassa, ou seja, concentrações superiores a  $4 \text{ g L}^{-1}$  de carbono são necessárias para alcançar maiores concentrações de biomassa. Porém, não foi possível ajustar uma regressão representativa entre a concentração de biomassa e concentração de carbono, portanto, não é razoável determinar qual concentração de carbono confere a maior produção de biomassa. No entanto, quando a ureia foi utilizada como fonte de nitrogênio, observou-se um aumento linear e crescente da concentração de biomassa nos cultivos com sacarose ou lactose, dentro do intervalo de concentrações avaliado. Isso indica a possibilidade de obtenção de valores ainda maiores de biomassa para concentrações acima de  $12 \text{ g L}^{-1}$  de carbono.

**Tabela 4:** Biomassa (g L<sup>-1</sup>) final de *P. laurentii* cultivada em diferentes combinações de fontes de carbono e nitrogênio: avaliação das interações duplas, concentração de carbono-fontes de nitrogênio, fontes de carbono-concentração de carbono e fontes de carbono-fontes de nitrogênio.

| <b>Interação: concentração de carbono e fonte nitrogênio</b> |                    |                    |                     |   |
|--|--------------------|--------------------|---------------------|---|
| <b>Concentração de carbono (g L<sup>-1</sup>)</b>            |                    |                    |                     |   |
| <b>Fonte de nitrogênio</b>                                   | <b>4</b>           | <b>8</b>           | <b>12</b>           | <b>Equação de regressão</b>                   |
| Sulfato de amônio  | 1,26 <sup>a</sup>  | 1,41 <sup>b</sup>  | 1,37 <sup>b</sup>   | Y = 1,244 + 0,0137x<br>R <sup>2</sup> = 0,582 |
| ureia  | 1,34 <sup>a</sup>  | 1,60 <sup>a</sup>  | 1,74 <sup>a</sup>   | Y = 1,168 + 0,0491x<br>R <sup>2</sup> = 0,969 |
| <b>Interação: fonte de carbono e concentração de carbono</b> |                    |                    |                     |   |
| <b>Concentração de carbono (g L<sup>-1</sup>)</b>            |                    |                    |                     |   |
| <b>Fonte de carbono</b>                                      | <b>4</b>           | <b>8</b>           | <b>12</b>           | <b>Equação de regressão</b>                   |
| Glicose  | 1,21 <sup>b</sup>  | 1,40 <sup>b</sup>  | 1,32 <sup>c</sup>   | ###   |
| Xilose   | 1,19 <sup>b</sup>  | 1,32 <sup>b</sup>  | 1,36 <sup>bc</sup>  | ###   |
| Sacarose   | 1,32 <sup>ab</sup> | 1,45 <sup>b</sup>  | 1,54 <sup>b</sup>   | Y = 1,221 + 0,0273x<br>R <sup>2</sup> = 0,992 |
| Lactose  | 1,47 <sup>a</sup>  | 1,86 <sup>a</sup>  | 1,99 <sup>a</sup>   | Y = 1,262 + 0,0641<br>R <sup>2</sup> = 0,930  |
| <b>Interação: fonte de carbono e fonte de nitrogênio</b>     |                    |                    |                     |   |
| <b>Fonte de carbono</b>                                      |                    |                    |                     |   |
| <b>Fonte de nitrogênio</b>                                   | <b>Glicose</b>     | <b>Xilose</b>      | <b>Sacarose</b>     | <b>Lactose</b>                                |
| Sulfato de amônio  | 1,26 <sup>aB</sup> | 1,23 <sup>aB</sup> | 1,39 <sup>aAB</sup> | 1,51 <sup>bA</sup>                            |
| ureia  | 1,37 <sup>aB</sup> | 1,35 <sup>aB</sup> | 1,49 <sup>aB</sup>  | 2,04 <sup>aA</sup>                            |

**Para a interação concentração de carbono-fontes de nitrogênio**, os dados são apresentados como média de duas repetições, as letras diferentes indicam diferenças significativas no teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) entre as fontes de nitrogênio, observando as colunas, enquanto que as equações de regressão se referem ao efeito da concentração de carbono sobre a concentração de biomassa. p-valor da interação: 0.0048. **Para a interação fontes de carbono-concentração de carbono**, os dados são apresentados como média de duas repetições, as letras diferentes indicam diferenças significativas no teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) entre as fontes de carbono, observando as colunas. A equação de regressão se refere ao efeito da concentração de carbono sobre a concentração de biomassa, enquanto que os símbolos ### representam a ausência de efeito da concentração de carbono sobre a variável resposta. p-valor da interação: 0.0236. **Para a interação fontes de carbono-fontes de nitrogênio**, os dados são apresentados como média de duas repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas no

teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas comparam as médias entre as fontes de nitrogênio observadas nas colunas, enquanto as letras maiúsculas comparam as médias entre as fontes de carbono observadas nas linhas. p-valor da interação:  $1e^{-04}$ .

Ao analisar o efeito da interação fonte de carbono-concentração de carbono (Tabela 4), observa-se que, para todas as concentrações avaliadas, os cultivos em meios contendo lactose resultaram em uma maior produção de biomassa, exceto na concentração que fornece  $4 \text{ g L}^{-1}$  de carbono, na qual a concentração de biomassa foi semelhante entre os dissacarídeos lactose e sacarose. Para estes dois açúcares, o efeito da concentração é linear e crescente ( $p\text{-valor} < 0,05$ ), o que não é observado nos cultivos com glicose e xilose. É relevante destacar que, ao comparar o impacto da variação da concentração de carbono, constatou-se que, dentro de uma mesma faixa de variação, a lactose promoveu um aumento na biomassa superior a duas vezes em relação à sacarose. Com base nesses resultados, a combinação entre lactose e ureia como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente, mostra-se a mais interessante.

Com relação à interação fonte de carbono-nitrogênio, as duas fontes de nitrogênio avaliadas apresentaram produções médias de biomassa semelhantes, exceto quando se utilizou lactose como fonte de carbono (Tabela 4). Para o cultivo em lactose, a utilização de ureia como fonte de nitrogênio favoreceu o aumento significativo da produção de biomassa. Em geral, os cultivos de *P. laurentii* em meio de fermentação contendo lactose registraram, tanto em sulfato de amônio, como em ureia, os maiores valores de biomassa final. Contudo, cabe destacar que, para a combinação sacarose e sulfato de amônio, a média obtida não difere da combinação de lactose com sulfato de amônio. Estes resultados demonstram que as predições de crescimento de *P. laurentii* por FBA foram consistentes com as condições mais favoráveis à produção de biomassa.

#### 2.3.4. Análise do título lipídico por *P. laurentii* em resposta às diferentes combinações de fontes de carbono e nitrogênio

Em todos os cultivos realizados, a levedura *P. laurentii* apresentou o fenótipo oleaginoso, isto é, pelo menos 20% da sua biomassa na forma de lipídios (Tabela 5). Com relação ao título lipídico, observou-se interação tripla significativa ( $p\text{-valor} < 0,05$ ) e um CV de 10,32% (Tabela 6). As fontes de nitrogênio não afetaram os títulos lipídicos obtidos com os cultivos em xilose e sacarose. Para glicose na concentração de  $4 \text{ g L}^{-1}$  de carbono, o título

lipídico foi maior no cultivo contendo sulfato de amônio como fonte de nitrogênio. Para lactose nas concentrações de 8 g L<sup>-1</sup> e 12g L<sup>-1</sup>, a utilização da ureia como fonte de nitrogênio favoreceu o aumento dos títulos de lipídios, os quais foram superiores aos títulos registrados nos cultivos em outras fontes de carbono. Ao avaliar as concentrações de carbono, a combinação de lactose e ureia apresentou uma regressão linear ( $Y = 28,2547 + 0,9125x$ ;  $R^2 = 0,876$ ; p-valor < 0,05) indicando que o título lipídico aumenta com o aumento da concentração da fonte de carbono. Verificou-se ainda que houve efeito positivo do título lipídico para a combinação xilose e sulfato de amônio, ou seja, são necessárias concentrações superiores a 4 g L<sup>-1</sup> de carbono fornecidas pela xilose para alcançar maior título lipídico. Porém, não foi possível ajustar uma regressão representativa entre o título lipídico e a concentração de carbono fornecida por xilose ( $Y = 0,2914 + 0,0187x$ ;  $R^2 = 0,678$ ; p-valor < 0,05), sendo assim, não é prudente afirmar que a concentração de 12 g L<sup>-1</sup> de carbono seja necessária. Com relação ao aumento da concentração de carbono fornecida por glicose combinada com ureia, não foi observado efeito linear significativo. Entretanto, foi observado um aumento no título lipídico ao aumentar a concentração de carbono de 4 g L<sup>-1</sup> para 8 g L<sup>-1</sup>. Por outro lado, não foi identificado um aumento adicional no título lipídico ao aumentar a concentração de carbono de 8 g L<sup>-1</sup> para 12 g L<sup>-1</sup>. Para as demais combinações de carbono e nitrogênio, a concentração da fonte de carbono não afetou as médias (Tabela 5).

**Tabela 5:** Médias dos teores lipídicos (%) de *P. laurentii* cultivada em diferentes combinações de fontes de carbono e nitrogênio: avaliação da interação tripla.

|                 | Teor lipídico (%)                            |                     |                     |                     |                      |                     |
|-----------------|--|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|---------------------|
|                 | Concentração de carbono (g L <sup>-1</sup> ) |                     |                     |                     |                      |                     |
|                 | 4  |                     | 8                   |                     | 12                   |                     |
|                 | Sulfato de amônio                            | Ureia               | Sulfato de amônio   | Ureia               | Sulfato de amônio    | Ureia               |
| <b>Glicose</b>  | 43,06 <sup>aA</sup>                          | 35,29 <sup>bA</sup> | 39,35 <sup>aA</sup> | 37,06 <sup>aA</sup> | 43,34 <sup>aA</sup>  | 32,03 <sup>bA</sup> |
| <b>Xilose</b>   | 30,12 <sup>aB</sup>                          | 34,04 <sup>aA</sup> | 39,12 <sup>aA</sup> | 31,06 <sup>bA</sup> | 37,42 <sup>aAB</sup> | 30,82 <sup>bA</sup> |
| <b>Sacarose</b> | 36,89 <sup>aA</sup>                          | 37,27 <sup>aA</sup> | 38,79 <sup>aA</sup> | 36,51 <sup>aA</sup> | 38,55 <sup>aAB</sup> | 37,0 <sup>aA</sup>  |
| <b>Lactose</b>  | 38,57 <sup>aA</sup>                          | 35,11 <sup>aA</sup> | 36,27 <sup>aA</sup> | 34,25 <sup>aA</sup> | 35,99 <sup>aB</sup>  | 32,28 <sup>aA</sup> |

Os dados são apresentados como média de duas repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas no teste de Tukey (p < 0,5). Letras minúsculas comparam as médias entre as fontes de nitrogênio observadas nas linhas, em uma determinada fonte de carbono e concentração, enquanto as letras maiúsculas comparam as médias entre as fontes de carbono observadas nas colunas, em uma

determinada fonte de nitrogênio e concentração. A sigla "S.A" corresponde ao sulfato de amônio. O CV dos dados apresentou um valor de 6,58%. p-valor da interação tripla: 0.0281.

**Tabela 6:** Médias dos títulos lipídicos ( $\text{g L}^{-1}$ ) de *P. laurentii* cultivada em diferentes combinações de fontes de carbono e nitrogênio: avaliação da interação tripla.

| Título lipídico ( $\text{g L}^{-1}$ )         |                      |                      |                     |                     |                     |                      |
|---|----------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| Concentração de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) |                      |                      |                     |                     |                     |                      |
|   | 4                    |                      | 8                   |                     | 12                  |                      |
|   | Sulfato de amônio    | Ureia                | Sulfato de amônio   | Ureia               | Sulfato de amônio   | Ureia                |
| <b>Glicose</b>                                | 0,565 <sup>aA</sup>  | 0,394 <sup>bB</sup>  | 0,52 <sup>aA</sup>  | 0,552 <sup>aB</sup> | 0,496 <sup>aA</sup> | 0,481 <sup>aBC</sup> |
| <b>Xilose</b>                                 | 0,336 <sup>aB</sup>  | 0,432 <sup>aAB</sup> | 0,501 <sup>aA</sup> | 0,419 <sup>aB</sup> | 0,486 <sup>aA</sup> | 0,437 <sup>aC</sup>  |
| <b>Sacarose</b>                               | 0,471 <sup>aAB</sup> | 0,557 <sup>aA</sup>  | 0,572 <sup>aA</sup> | 0,503 <sup>aB</sup> | 0,552 <sup>aA</sup> | 0,613 <sup>aB</sup>  |
| <b>Lactose</b>                                | 0,518 <sup>aA</sup>  | 0,566 <sup>aA</sup>  | 0,572 <sup>bA</sup> | 0,731 <sup>aA</sup> | 0,577 <sup>bA</sup> | 0,766 <sup>aA</sup>  |

Os dados são apresentados como média de duas repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas no teste de Tukey ( $p < 0,5$ ). Letras minúsculas comparam as médias entre as fontes de nitrogênio observadas nas linhas, em uma determinada fonte de carbono e concentração, enquanto as letras maiúsculas comparam as médias entre as fontes de carbono observadas nas colunas, em uma determinada fonte de nitrogênio e concentração. A sigla "S.A" corresponde ao sulfato de amônio. O CV dos dados apresentou um valor de 10,32%. p-valor da interação tripla: 0.0121.

Com base nesses resultados, verifica-se que a combinação de lactose e ureia como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente, mostrou-se a mais promissora para a produção de lipídios por *P. laurentii*. Essa combinação permitiu alcançar uma concentração de biomassa significativamente maior, com um aumento de 62,72% em relação à condição de referência, que consistiu no meio SS2 modificado de Tanimura et al. (2014) com glicose fornecendo  $12 \text{ g L}^{-1}$  de carbono (glicose a  $30 \text{ g L}^{-1}$ ) e sulfato de amônio a  $0,523 \text{ g L}^{-1}$  (Tabela 7). Além disso, também foi possível obter um aumento de 54,43% no título lipídico em comparação com a condição de referência (Tabela 7). Vale ressaltar que os resultados demonstraram uma correlação linear entre o aumento na concentração de lactose e o aumento na biomassa. Visto que a extração de lipídios foi realizada no período de 48 horas em todos os cultivos, os resultados da produtividade volumétrica de lipídios apresentam o mesmo perfil do título lipídico.

2.3.5. Avaliação da produção de biomassa e título lipídico por *P. laurentii* em resposta ao aumento da concentração de carbono e extrato de levedura

Haja vista que a combinação de lactose e ureia se mostrou promissora para a produção de biomassa e lipídios por *P. laurentii*, principalmente nas concentrações mais elevadas desse dissacarídeo, um novo experimento fatorial (4x3) foi conduzido, variando a concentração de lactose (28,56; 38,08 e 47,6 g L<sup>-1</sup>) e de extrato de levedura (0,1; 0,5; 1; 1,5 g L<sup>-1</sup>). Observou-se efeito significativo apenas para a concentração do extrato de levedura sobre a concentração de biomassa e título lipídico, conforme ilustrado nas figuras 2-A e 2-B, respectivamente. Quanto ao teor lipídico, tanto a concentração de extrato de levedura quanto a concentração de carbono promoveram efeitos significativos (Figura 2-C). O modelo que melhor se ajustou à variável resposta biomassa foi o modelo de platô linear (Figura 2-A), representado pela equação:

$Y = a + b(x - c)$ , para  $x \leq C$ , no qual:

$$Y = 7,806884 + 11,617712(x - 0,521675)$$

$$R^2 = 0,969939$$

$$CV = 5,75\%$$

$$p\text{-valor} = 1,515e^{-10}$$

Verificou-se, portanto, que o aumento na biomassa ocorreu somente com o aumento da concentração de extrato de levedura até 0,5 g L<sup>-1</sup>, resultando em uma biomassa de 7,52 g L<sup>-1</sup> (Figura 2-A). Esse valor representa um aumento significativo (Tabela 7) de 500% em relação à condição referência mencionada anteriormente

Em relação ao título lipídico, o modelo que melhor se ajustou aos dados foi o modelo quadrático (Figura 2-B), representado pela equação:

$Y = a + bx + Cx^2$ , no qual:

$$Y = 0,900388 + 4,546832X + -2,420476X^2$$

$$R^2 = 0,695784$$

$$CV = 17,88\%$$

$$p\text{-valor} = 1,441e^{-06}$$

Na concentração de extrato de levedura de 0,5 g L<sup>-1</sup> foi obtido o maior título lipídico, atingindo 2,99 g L<sup>-1</sup> de lipídeos (Figura 2-B). Esse resultado representa um aumento significativo (Tabela 7) de 502,82% em relação à condição referência mencionada anteriormente.

Para o teor lipídico o modelo de superfície de resposta obtido é representado pela equação:

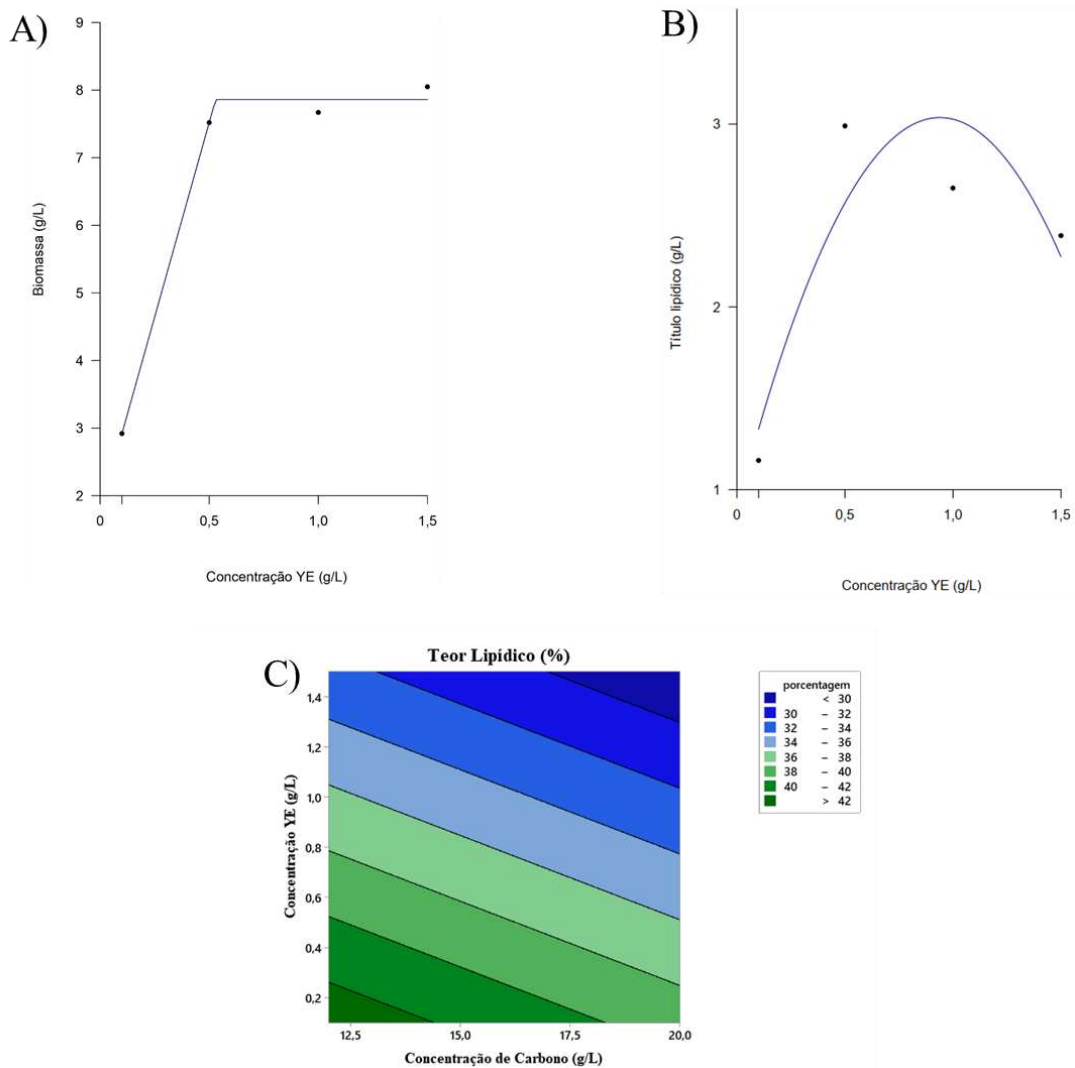
$$Y = 50,19 - 0,514cc - 7,64cye$$

$$R^2 = 0,5978$$

$$CV = 9,84\%$$

$$p\text{-valor} = 2,704e-05$$

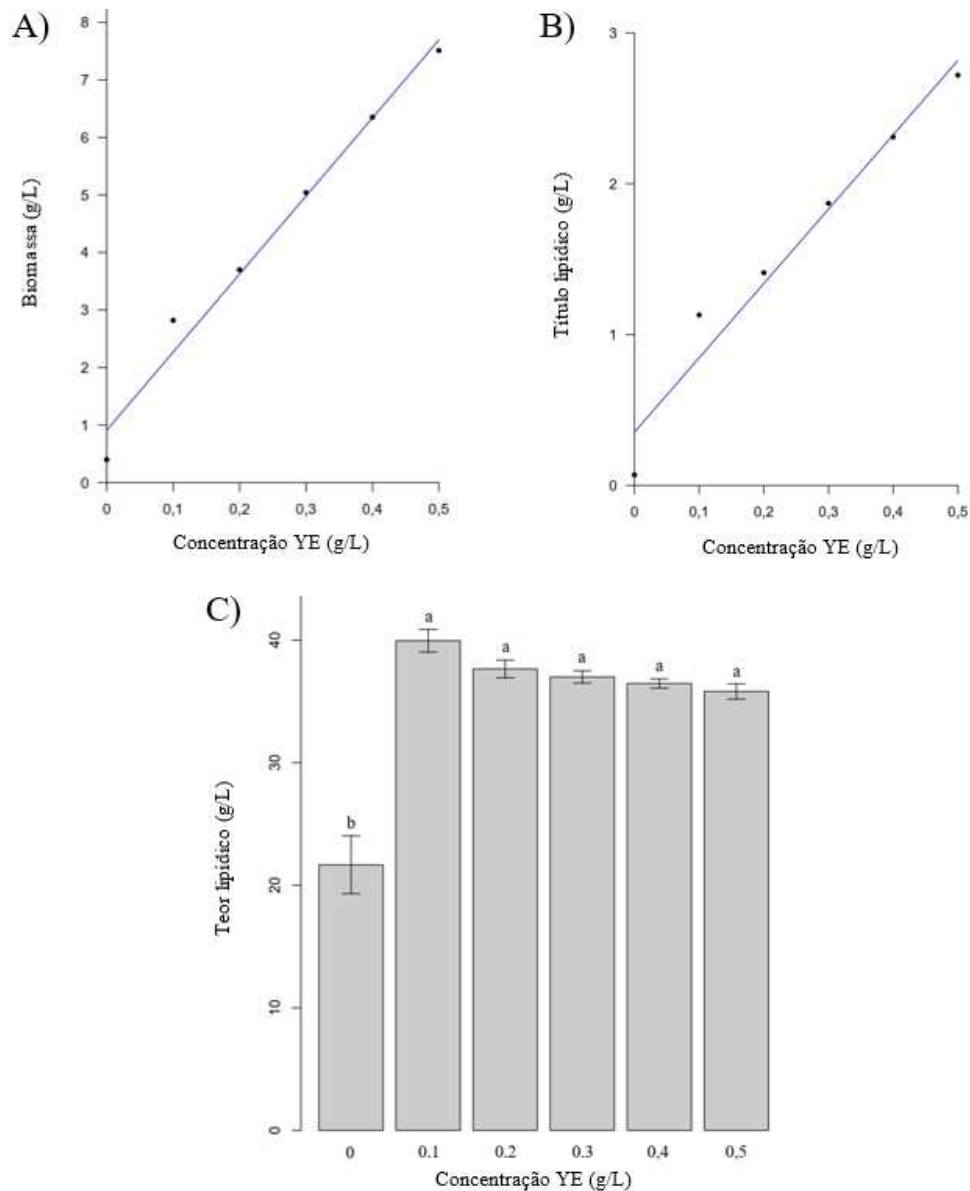
No modelo, *cc* representa a concentração de carbono fornecida pela lactose em g L<sup>-1</sup>, enquanto *cye* representa a concentração de extrato de levedura em g L<sup>-1</sup> (Figura 2-C). A análise do modelo de superfície de resposta indicou que o teor lipídico diminui de forma simultânea com o aumento das concentrações de carbono e extrato de levedura. No entanto, observou-se que a redução no teor lipídico é mais sensível ao aumento na concentração do extrato de levedura, o que pode ser melhor visualizado no gráfico de contorno (Figura 2-C), no qual o eixo que representa a concentração de extrato de levedura apresenta um maior número de pontos de interseção.



**Figura 2:** **A)** Biomassa em g L<sup>-1</sup>. **B)** Título lipídico em g L<sup>-1</sup>. **C)** Gráfico de contorno do modelo de superfície de resposta: Teor lipídico em g L<sup>-1</sup>. A escala de cores empregada indica o teor lipídico em forma percentual, sendo que a tonalidade verde escura corresponde a um maior teor lipídico, enquanto o azul escuro representa um teor lipídico menor.

Uma vez que a produção máxima de biomassa e o título máximo lipídico foram obtidas na concentração de 0,5 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, e concentrações superiores desse componente do meio de cultivo não foram favoráveis, um estudo experimental adicional foi conduzido para investigar a relação entre a concentração de extrato de levedura e a produção de biomassa e título lipídico no intervalo de 0 a 0,5 g L<sup>-1</sup>. A relação linear foi observada para ambas as variáveis resposta, corroborando a eficácia do aumento na produção de biomassa e título lipídico até a concentração de 0,5 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura (Figura 3). A regressão linear obtida para a produção de biomassa apresentou um coeficiente de correlação de 0,98, um CV de 8,79% e um p-valor de 1,205e<sup>-09</sup> (Figura 3-A). Enquanto que a regressão linear

obtida para o título lipídico apresentou um coeficiente de correlação de 0,95, um CV de 12,25% e um p-valor de  $3,48e^{-08}$  (Figura 3-B). Além disso, houve efeito significativo sobre o teor lipídico apenas entre a condição de ausência de extrato de levedura a  $0 \text{ g L}^{-1}$  com as demais concentrações (Figura 3-C).



**Figura 3:** Efeito da concentração do extrato de levedura nas concentrações de 0 a  $0,5 \text{ g L}^{-1}$ . **A)** Efeito sobre a biomassa em  $\text{g L}^{-1}$ . **B)** Efeito sobre o título lipídico em  $\text{g L}^{-1}$ . **C)** Efeito sobre o teor lipídico.

**Tabela 7:** Parâmetros fermentativos de *P. laurentii* cultivada sob condições padrão e condições otimizadas.

| <b>Parâmetros fermentativos</b>  |                                    |                          |   |   |
|--|------------------------------------|--------------------------|---|---|
| <b>Condição de Cultivo</b>   | <b>Biomassa (g L<sup>-1</sup>)</b> | <b>Teor lipídico (%)</b> | <b>Título lipídico (g L<sup>-1</sup>)</b> | <b>Produtividade volumétrica (mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>)</b> |
| <b>Condição Padrão: SS2; S.A (0,523 g L<sup>-1</sup>); Glicose (30 g L<sup>-1</sup>); E.L (0,1 g L<sup>-1</sup>)</b> | 1,26                               | 43,34                    | 0,496                                     | 10,33   |
| <b>Otimização 1: SS2; Ur (0,234 g L<sup>-1</sup>); Lactose (28,56 g L<sup>-1</sup>); E.L 0,1 g L<sup>-1</sup>;</b>   | 2,04                               | 32,28                    | 0,766                                     | 15,96   |
| <b>Otimização 2: SS2; Ur (0,234 g L<sup>-1</sup>); Lactose (28,56 g L<sup>-1</sup>); E.L 0,5 g L<sup>-1</sup>;</b>   | 7,52                               | 40,17                    | 2,99                                      | 62,30   |

SS2, S.A, Ur e E.L correspondem ao meio de cultivo, sulfato de amônio, ureia e extrato de levedura, respectivamente. Os cultivos foram realizados em a 30 °C com agitação de 200 rpm por 48 h.

## 2.4. Discussão

A otimização da produção de biomassa e metabólitos por microrganismos baseia-se, geralmente, no delineamento de experimentos fatoriais com um elevado número de unidades experimentais (Singh et al., 2017; Weuster-Botz, Dirk, 2000). Isto é ainda mais evidente quando se busca otimizar a produção de biomassa ou metabólitos por microrganismos não modelos, cujas características fisiológicas são pouco conhecidas, tornando o delineamento experimental mais intuitivo. Este estudo apresenta uma metodologia para guiar de forma racional o delineamento de experimentos fatoriais que avaliam o efeito de fontes nutricionais sobre a produção de biomassa microbiana. Nesse sentido, a primeira etapa deste trabalho focou em identificar as fontes de carbono e nitrogênio que pudessem favorecer o crescimento de *P. laurentii* por meio da FBA. Portanto, o delineamento dos experimentos fatoriais foi norteado por meio de predições obtidas pela FBA, a qual permitiu avaliar o efeito de combinações de diferentes fontes de carbono e nitrogênio sobre a velocidade de crescimento

de *P. laurentii*. A estratégia adotada mostrou-se eficiente, resultando em aumentos significativos de produção de biomassa e lipídios por *P. laurentii*.

Com relação às predições por FBA, considerando as fontes de nitrogênio, arginina e alantoína, a uma taxa de captação de  $1 \text{ mmol gMS}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , as maiores velocidades de crescimento foram obtidas quando a sacarose ou lactose foram as fontes de carbono. Visto que estes dissacarídeos são encontrados em matérias-primas alternativas e econômicas, tais como o melaço de cana-de-açúcar e o soro de leite, respectivamente (Asku & Eren et al. 2007; Bento et al. 2019; Szczerba et al. 2020; Wang et al. 2018), o desenvolvimento de meios de fermentação a partir dessas matérias-primas para a produção de lipídios por *P. laurentii* é promissor. É importante ressaltar que a utilização de substratos de baixo custo é desejável, pois possibilitam uma redução nos custos de produção, visto que a fonte de carbono pode representar até 80% dos gastos de um meio de cultivo (Fei et al., 2011a; 2011b).

Outra observação promissora foi a predição de altas velocidades de crescimento em condições de cultivo nas quais a ureia foi a fonte de nitrogênio empregada. As velocidades de crescimento em ureia foram superiores tanto em comparação com o sulfato de amônio quanto com sete dos aminoácidos avaliados, a saber: glicina, valina, leucina, isoleucina, triptofano, treonina e ornitina. Os altos valores de velocidade de crescimento em ureia, aliadas ao seu menor custo em comparação com as demais fontes orgânicas de nitrogênio avaliadas, a tornam atrativa para ser utilizada como fonte de nitrogênio em meios de fermentação para o cultivo de *P. laurentii*. As velocidades de crescimento registradas quando a alantoína foi utilizada como fonte de nitrogênio demonstraram valores elevados. Entretanto, é importante destacar que a principal via de obtenção desse composto nitrogenado envolve a extração de fontes vegetais, a qual apresenta baixo rendimento. Esta característica, do ponto de vista ecológico e sustentável, não é desejável, razão pela qual a alantoína não foi incluída como variável no experimento fatorial (Fedoreyev et al., 2012; Zhang et al., 2022). Glutamina e asparagina também se destacaram como fontes de nitrogênio, demonstrando altas velocidades de crescimento. No entanto, é importante notar que a implementação em larga escala desses aminoácidos pode se revelar desafiadora devido ao aumento do custo do meio de fermentação.

Com base nessas predições, a ureia e o sulfato de amônio foram selecionados como fontes de nitrogênio orgânica e inorgânica, para o delineamento dos experimentos fatoriais. Em relação às fontes de carbono, as velocidades de crescimento preditas na presença de

hexoses e pentoses foram similares. Portanto, optou-se por selecionar a glicose, como representante das hexoses, a qual é encontrado na fração celulósica de biomassas lignocelulósicas e a xilose, como representante das pentoses, por ser o carboidrato mais abundante encontrado na fração hemicelulósica de biomassas lignocelulósicas. Cabe salientar que estas biomassas são subprodutos agroindustriais abundantes e de baixo custo utilizados como matérias-primas em biorrefinarias (Song et al. 2018; Wang et al. 2019). Além desses carboidratos, os dissacarídeos lactose e sacarose foram selecionados por serem encontrados também em subprodutos agroindustriais de baixo custo (Bento et al. 2019; Wang et al. 2018; Szczerba et al. 2020). Portanto, o experimento fatorial considerou duas fontes de nitrogênio, quatro fontes de carbono e três concentrações da fonte de carbono, a saber: sulfato de amônio e ureia como fontes de nitrogênio, glicose e xilose ambas a 10, 20 e 30 g L<sup>-1</sup>, sacarose e lactose ambas a 9,52, 19,04 e 28,56 g L<sup>-1</sup>, configurando um fatorial 4x3x2.

Verificou-se neste estudo que algumas predições obtidas por meio da FBA foram consistentes com os resultados experimentais. Por exemplo, para os experimentos que utilizaram a ureia como fonte de nitrogênio, a combinação com lactose também levou à maior produção de biomassa, superando, inclusive, em 35,58% o valor obtido da combinação de sulfato de amônio com lactose. Este resultado corrobora com a predição de que a velocidade de crescimento é maior na condição que empregou ureia como fonte de nitrogênio. Por outro lado, as simulações indicaram que as velocidades de crescimento em sacarose e lactose foram similares; todavia, isto não foi observado experimentalmente em termos de produção de biomassa. É importante ressaltar que uma alteração na taxa de captação *in silico* pode alterar o perfil de análise; portanto, as definições de taxas de captação nas simulações devem ser realizadas cuidadosamente para as predições se aproximarem dos valores experimentais. Neste trabalho, as taxas de captação das fontes de nitrogênio para a FBA foram estabelecidas com base na taxa de captação determinada experimentalmente para o sulfato de amônio, referente a 1 mmol gMS<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (dados não publicados). Esse valor foi então extrapolado para as demais fontes de nitrogênio para padronizar a comparação do impacto dessas fontes na velocidade de crescimento por FBA. Mensurar as taxas de captação específicas de cada fonte de nitrogênio pode proporcionar análises *in silico* com maior representatividade biológica, contudo um dos escopos do trabalho foi analisar a capacidade da metodologia em direcionar experimentos para organismos com disponibilidade de dados limitada e reduzir o número de experimentos necessários.

Outro aspecto relevante a ser considerado é o efeito das concentrações das fontes de carbono combinadas com as fontes de nitrogênio. Quando a ureia foi utilizada como fonte de nitrogênio, foi observado um aumento contínuo na concentração de biomassa ao longo da faixa de concentração de carbono avaliada. Entretanto, para o sulfato de amônio o aumento na concentração de biomassa ocorreu apenas até a concentração de 8 g L<sup>-1</sup> de carbono (Tabela 4). Esse padrão também foi observado para sacarose e lactose, evidenciando-se uma correlação linear positiva entre o aumento da concentração de biomassa e o aumento da concentração de carbono ao longo da faixa avaliada. No entanto, o coeficiente angular da equação de regressão foi maior para lactose, ou seja, em uma mesma faixa de variação de concentração de carbono, a lactose promove um aumento na biomassa superior em relação à sacarose. Portanto, a melhor combinação de fontes de carbono e nitrogênio foi lactose e ureia, resultando em um aumento de biomassa de 50,74% em relação à condição padrão, que consistiu no meio SS2 modificado, com 30 g L<sup>-1</sup> de glicose (Tanimura et al., 2014) (Tabela 7).

Em seguida, um novo experimento foi conduzido, aumentando as concentrações de lactose, e de extrato de levedura, resultando em um fatorial duplo com a concentração de extrato de levedura variando de 0,1 a 1,5 g L<sup>-1</sup> e a concentração de carbono variando de 12 g L<sup>-1</sup> a 20 g L<sup>-1</sup>, resultando no fatorial 4x3. O aumento da concentração do extrato de levedura objetivou investigar se o aumento da concentração de outros nutrientes, ainda não identificados previamente nas simulações da FBA, poderiam promover também o aumento da concentração de biomassa, justificando o aumento da concentração do extrato de levedura. Devido a *P. laurentii* ter sido isolada de uma amostra de solo, um ambiente complexo com uma ampla variedade de componentes nutricionais, é plausível que essa levedura possua requerimentos nutricionais específicos, bem como processos de sinalização celular que estimulam a produção de biomassa (Wang et al., 2022; Fan et al., 2021). O extrato de levedura é um substrato complexo, que compreende uma diversidade de compostos, incluindo proteínas, aminoácidos, glicanas, nucleotídeos, vitaminas e minerais. Essa composição fornece uma vasta gama de nutrientes que podem ser essenciais para o crescimento de um determinado microrganismo (Tomé, 2021; Tachibana; Watanabe; Konishi, 2019). Além disso, o extrato de levedura é um componente comum em diversos meios de cultivo (Lee & Little, 2015; Bekatorou; Psarianos; Koutinas, 2006). Portanto, o extrato de levedura se mostrou um componente de interesse para o estudo do crescimento de *P. laurentii*.

O aumento da concentração de extrato de levedura até 0,5 g L<sup>-1</sup> resultou em um aumento substancial na concentração de biomassa (Figura 1-A), cerca de 370% em relação à

melhor combinação do fatorial 4x3x2 e de 500% em relação à condição referência mencionada anteriormente (Tabela 7). No entanto, concentrações de extrato de levedura acima de 0,5 g L<sup>-1</sup> não apresentaram efeito significativo na produção de biomassa. O valor máximo de título lipídico também foi obtido na concentração de 0,5 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, representando um aumento de 503% em relação à condição de referência (Tabela 7). Em concentrações de extrato de levedura acima de 0,5 g L<sup>-1</sup> ocorreu uma diminuição gradual no título lipídico (Figura 1-B). Estes resultados demonstram a importância da utilização do extrato de levedura para o crescimento de *P. laurentii*, sendo a concentração de 0,5 g L<sup>-1</sup> a recomendada. Também foi observado que a ausência do extrato de levedura limita a produção de biomassa e o título lipídico (Figura 2), visto que da ausência de extrato de levedura, para a adição do mesmo na concentração de 0,5 g L<sup>-1</sup>, há um aumento de 7 vezes na produção de biomassa e de 16 vezes no título lipídico, reforçando a importância desse componente no meio de cultivo.

O presente estudo avaliou o efeito de algumas fontes de carbono e nitrogênio e o extrato de levedura sobre o crescimento de *P. laurentii* e, dentre as condições avaliadas, ganhos significativos na produção de biomassa e título lipídico foram obtidos. Entretanto, estudos adicionais abrangendo outros nutrientes ainda podem ser conduzidos, visando o desenvolvimento de um meio de fermentação otimizado para esta levedura. Uma opção seria realizar uma análise de custo reduzido das reações de captação de nutrientes empregando o modelo metabólico em escala genômica de *P. laurentii*. Os custos reduzidos refletem o impacto do fluxo de uma reação específica na função objetivo e servem como um parâmetro de sensibilidade (Maarleveld et al., 2013; Goffin et al., 2010). Essa análise pode revelar o potencial de cada nutriente em aumentar a biomassa quando a função objetivo é definida como o crescimento (Marinos et al., 2020). Portanto, a análise de custo reduzido tem o potencial de direcionar novos experimentos fatoriais e auxiliar na determinação dos requerimentos nutricionais necessários para estimular o crescimento de *P. laurentii* e obter maiores produções de biomassa.

Com base nos resultados obtidos, a combinação de ureia e lactose, fornecendo 12 g L<sup>-1</sup> de carbono, foi a mais favorável para a produção de biomassa e lipídios. Essa característica é interessante, pois a mesma condição que promove o aumento da biomassa reflete também no aumento da produção de lipídios. Dessa forma, o objetivo de aumentar a biomassa é alcançado sem comprometer o potencial de utilização de *P. laurentii* como plataforma de produção óleos microbianos. Portanto, é recomendado o uso do meio SS2

modificado de Tanimura et al. (2014), com lactose como fonte de carbono em uma concentração de 28,56 g L<sup>-1</sup>, ureia como fonte de nitrogênio a uma concentração de 0,234 g L<sup>-1</sup> e extrato de levedura a uma concentração de 0,5 g L<sup>-1</sup>, tanto para a obtenção de biomassa quanto para a produção de lipídios. Nesse meio recomendado foram observados os aumentos de biomassa em 500% e do título lipídico em 503% em relação à condição de referência mencionada anteriormente (Tabela 7).

Embora os valores de produção de biomassa e título lipídico de *P. laurentii* obtidos neste estudo tenham sido inferiores à maioria das leveduras e condições de cultivo listadas na Tabela 7, a produtividade volumétrica de lipídios, um parâmetro normalizado pelo tempo de cultivo, foi superior ou comparável aos valores obtidos por outras leveduras oleaginosas mencionadas, destacando seu potencial. É importante salientar que até o momento, fatores importantes, tais como a quantidade inicial de inóculo, pH, temperatura e aeração ainda não foram avaliados; portanto, espera-se que a otimização desses fatores aumente ainda mais a produção de biomassa e lipídios de *P. laurentii*.

Tabela 7: Comparação dos parâmetros de fermentação de *P.laurentii* com diferentes leveduras oleaginosas em diferentes cultivos.

| Organismo                                  | Biomassa (g L <sup>-1</sup> ) | Título lipídico (g L <sup>-1</sup> ) | Produtividade volumétrica (mg L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) | Teor lipídico (%)  | Fonte de carbono                                | Referência                  |
|--|-------------------------------|--------------------------------------|---|--------------------|---|-----------------------------|
| <i>P. laurentii</i> UFV-1                  | 1,26 ± 0,09                   | 0,496 ± 0,05                         | 10,33 ± 1,06  | 43,34 ± 2,7        | Glicose (meio SS2)                              | Presente trabalho           |
| <i>P. laurentii</i> UFV-1                  | 7,52 ± 0,43                   | 2,94 ± 0,5                           | 62,3 ± 11,1   | 39,76 ± 3,9        | Lactose (meio SS2)                              | Presente trabalho           |
| <i>P. laurentii</i> UFV-1                  | 9,31±0.33                     | 5.90±0.28                            | 82 ± 3,9  | 63.5± 1.05         | Xilose (meio SS2)                               | Vieira et al. (2020)        |
| <i>P. laurentii</i> UFV-1                  | 19,34 <sup>#</sup>            | 7,2 <sup>#</sup>                     | 150 <sup>#</sup>  | 37,27 <sup>#</sup> | Lactose (soro de ricota)                        | Cotrim (2021)               |
| <i>Prunus domestica</i>                    | 7,3 ± 0,10                    | 2,0 ± 0,11                           | 41,6 <sup>**</sup>  | 27,3 ± 1,88        | Sacarose (meio YPD)                             | Maina et al. (2017)         |
| <i>Rhodospiridium toruloides</i> DMKU-RE16 | 20,5 ± 0,8                    | 11,6 ± 0,2                           | 53,6 ± 1,0  | 56,7 ± 3,1         | Glicose (caldo meio limitado por nitrogênio II) | Poontawee et al. (2017)     |
| <i>Rhodotorula taiwanensis</i> DMKU-CE53   | 19,5 ± 0,7                    | 6,9 ± 0,4                            | 28,9 ± 1,5  | 35,7 ± 0,8         | Glicose (caldo meio limitado por nitrogênio II) | Poontawee et al. (2017)     |
| <i>Rhodotorula. toruloides</i> Y-1588      | 13,325 ± 0,499                | 4,61 ± 0,89                          | 38 ± 7  | 34,54 ± 6,03       | Glicose (meio GMY)                              | Maza et al. (2020)          |
| <i>Rhodotorula. toruloides</i> Y-6985      | 16,12 ± 0,974                 | 1,18 ± 0,34                          | 59 ± 11   | 43,88 ± 7,02       | Glicose (meio GMY)                              | Maza et al. (2020)          |
| <i>Malus domestica</i>                     | 8,0 ± 0,06                    | 2,5 ± 0,20                           | 52,1 <sup>**</sup>  | 31,9 ± 2,27        | Sacarose (meio YPD)                             | Maina et al. (2017)         |
| <i>Rhodospiridium fluviale</i> DMKU-SP314  | 12,0 ± 0,4                    | 8,2 ± 1,4                            | 48,9 ± 8,1  | 68,3 ± 9,5         | Glicose (caldo meio limitado por nitrogênio II) | Poontawee et al. (2017)     |
| <i>Lipomyces starkeyi</i>                  | 21,2 ± 0,3                    | 7,6 ± 0,0                            | 52,7 <sup>**</sup>  | 35,8 <sup>#</sup>  | Glicose (caldo YM)                              | Thanapimmetha et al. (2021) |
| <i>Rhodotorula. glutinis</i> R4            | 14,32 ± 0,427                 | 6.80 ± 1,84                          | 57 ± 15   | 47,24 ± 11,2       | Glicose (meio GMY)                              | Maza et al. (2020)          |

\*\* corresponde a resultados calculados a partir das informações disponíveis nos trabalhos de referência, pois não foram disponibilizados pelos autores. # corresponde a dados com erro padrão não informados. Todos os parâmetros fermentativos foram obtidos por regime de fermentação em batelada.

## 2.5. Conclusão

A aplicação da FBA empregando o modelo metabólico em escala genômica de *Papiliotrema laurentii* (papla-GEM) permitiu direcionar os experimentos fatoriais, selecionando fontes de carbono e nitrogênio promissoras para a produção de biomassa. Os cultivos empregando as condições indicadas por FBA resultaram em um aumento significativo na produção de biomassa de *P. laurentii* e, conseqüentemente, no título lipídico, demonstrando a eficácia dessa metodologia. A combinação de ureia com lactose mostrou-se a mais favorável para o aumento em todos os parâmetros fermentativos avaliados, exceto para o teor lipídico, o qual foi mantido inalterado nas diferentes condições avaliadas. Além disso, o aumento da concentração do extrato de levedura até 0,5 g L<sup>-1</sup> proporcionou um aumento substancial na concentração de biomassa e no título lipídico, sugerindo a existência de requerimentos nutricionais ainda desconhecidos para a produção de biomassa por *P. laurentii*. A produtividade volumétrica de lipídios alcançada por *P. laurentii* foi igual ou superior à de outras leveduras oleaginosas consideradas promissoras para a produção de óleos microbianos, evidenciando o seu potencial para essa aplicação.

## 2.6. Referências bibliográficas

ADRIO, José L. Oleaginous yeasts: promising platforms for the production of oleochemicals and biofuels. **Biotechnology and bioengineering**, v. 114, n. 9, p. 1915-1920, 2017.

AGREN, Rasmus et al. The RAVEN toolbox and its use for generating a genome-scale metabolic model for *Penicillium chrysogenum*. **PLoS computational biology**, v. 9, n. 3, p. e1002980, 2013.

AKSU, Zümriye; EREN, Ayşe Tuğba. Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. **Biochemical engineering journal**, v. 35, n. 2, p. 107-113, 2007.

ATES, A.; BUKOWSKI, M. **Approved by USDA's World Agricultural Outlook Board Oil Crops Outlook**: May 2023 Economic Research Service | Situation and Outlook Report Domestic Outlook International Outlook. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.ers.usda.gov/webdocs/outlooks/106531/ocs-23e.pdf?v=5539.9>>. Acesso em: 12 jul. 2023.

BEKATOROU, Argyro; PSARIANOS, Costas; KOUTINAS, Athanasios A. Production of food grade yeasts. **Food Technology & Biotechnology**, v. 44, n. 3, 2006.

BENTO, Heitor BS et al. Microbial biodiesel production: From sucrose-based carbon sources to alkyl esters via enzymatic transesterification. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 121, p. 349-356, 2019.

BHARATHIRAJA, B. et al. Microbial oil—a plausible alternate resource for food and fuel application. **Bioresource technology**, v. 233, p. 423-432, 2017.

BHUIYA, M. M. K. et al. Prospects of 2nd generation biodiesel as a sustainable fuel—Part: 1 selection of feedstocks, oil extraction techniques and conversion technologies. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 55, p. 1109-1128, 2016.

BLIGH, E. Graham; DYER, W. Justin. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian journal of biochemistry and physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BONATSOS, Nikolaos et al. Techno-economic analysis and life cycle assessment of heterotrophic yeast-derived single cell oil production process. **Fuel**, v. 264, p. 116839, 2020.

BRABENDER, Matthew et al. Urea and urine are a viable and cost-effective nitrogen source for *Yarrowia lipolytica* biomass and lipid accumulation. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 102, p. 2313-2322, 2018.

CHATTERJEE, Sulogna; MOHAN, S. Venkata. Yeast fermentation towards biodiesel: maximizing resource recovery by integrating with biohydrogen production in biorefinery framework. **Biomass and Bioenergy**, v. 142, p. 105747, 2020.

CHATURVEDI, S.; BHATTACHARYA, A.; KHARE, S. K. Trends in oil production from oleaginous yeast using biomass: biotechnological potential and constraints. **Applied biochemistry and microbiology**, v. 54, p. 361-369, 2018.

CHEAH, Yi Ern et al. Systematic identification and elimination of flux bottlenecks in the aldehyde production pathway of *Synechococcus elongatus* PCC 7942. **Metabolic engineering**, v. 60, p. 56-65, 2020.

COTRIM, Keyla Cristina Francisco. **Viabilidade da Produção de Lipídios por *Papiliotrema Laurentii* UFV-1 em Soro de Ricota**. Orientador: Wendel Batista da Silveira. 2021. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2021. f. 69.

DA SILVA, Gervásio Paulo; MACK, Matthias; CONTIERO, Jonas. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 1, p. 30-39, 2009.

DE ALMEIDA, Eduardo Luís Menezes et al. *Papiliotrema laurentii*: general features and biotechnological applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 106, n. 21, p. 6963-6976, 2022.

EL-SAYED, Ashraf SA et al. Purification and characterization of ornithine decarboxylase from *Aspergillus terreus*; Kinetics of inhibition by various inhibitors. **Molecules**, v. 24, n. 15, p. 2756, 2019.

FAN, Kunkun et al. Biodiversity of key-stone phylotypes determines crop production in a 4-decade fertilization experiment. **The ISME Journal**, v. 15, n. 2, p. 550-561, 2021.

FEDOREYEV, Sergey A et al. Production of allantoin, rabdosiin and rosmarinic acid in callus cultures of the seacoastal plant *Mertensia maritima* (Boraginaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 110, p. 183-188, 2012.

FEI, Qiang et al. The effect of volatile fatty acids as a sole carbon source on lipid accumulation by *Cryptococcus albidus* for biodiesel production. **Bioresource technology**, v. 102, n. 3, p. 2695-2701, 2011a.

FEI, Qiang et al. Exploring low-cost carbon sources for microbial lipids production by fed-batch cultivation of *Cryptococcus albidus*. **Biotechnology and bioprocess engineering**, v. 16, n. 3, p. 482-487, 2011b.

FOSTER, Charles J. et al. From *Escherichia coli* mutant <sup>13</sup>C labeling data to a core kinetic model: A kinetic model parameterization pipeline. **PLoS computational biology**, v. 15, n. 9, p. e1007319, 2019.

GARLAPATI, Vijay Kumar et al. Circular economy aspects of lignin: towards a lignocellulose biorefinery. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 130, p. 109977, 2020.

GENG, Jun; NIELSEN, Jens. *In silico* analysis of human metabolism: Reconstruction, contextualization and application of genome-scale models. **Current Opinion in Systems Biology**, v. 2, p. 29-38, 2017.

GIRODS, P. et al. Thermal removal of nitrogen species from wood waste containing urea formaldehyde and melamine formaldehyde resins. **Journal of Hazardous Materials**, v. 159, n. 2-3, p. 210-221, 2008.

GODARD, Patrice et al. Effect of 21 different nitrogen sources on global gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and cellular biology**, v. 27, n. 8, p. 3065-3086, 2007.

GOFFIN, Philippe et al. Understanding the physiology of *Lactobacillus plantarum* at zero growth. **Molecular systems biology**, v. 6, n. 1, p. 413, 2010.

GONÇALVES, Fabricio Gomes et al. Resistance of particleboards produced with ligno-cellulosic agro-industrial wastes to fungi and termites. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 157, p. 105159, 2021.

GUTIÉRREZ, Alicia et al. Genetic basis of variations in nitrogen source utilization in four wine commercial yeast strains. **PLoS one**, v. 8, n. 6, p. e67166, 2013.

KURTZMAN, C. P. Formation of hyphae and chlamydospores by *Cryptococcus laurentii*. **Mycologia**, v. 65, n. 2, p. 388-395, 1973.

LEE, Jason S.; LITTLE, Brenda J. Electrochemical and chemical complications resulting from yeast extract addition to stimulate microbial growth. **Corrosion**, v. 71, n. 12, p. 1434-1440, 2015.

LIU, X.-Z. et al. Phylogeny of Tremellomycetous yeasts and related dimorphic and filamentous basidiomycetes reconstructed from multiple gene sequence analyses. **Studies in mycology**, v. 81, n. 1, p. iii-iii, 2015.

MAARLEVELD, Timo R. et al. Basic concepts and principles of stoichiometric modeling of metabolic networks. **Biotechnology journal**, v. 8, n. 9, p. 997-1008, 2013.

MAINA, Sofia et al. Microbial oil production from various carbon sources by newly isolated oleaginous yeasts. **Engineering in Life Sciences**, v. 17, n. 3, p. 333-344, 2017.

MARINOS, Georgios; KALETA, Christoph; WASCHINA, Silvio. Defining the nutritional input for genome-scale metabolic models: A roadmap. **PLoS One**, v. 15, n. 8, p. e0236890, 2020.

MAZA, D. Daniela et al. Growth and lipid production of *Rhodotorula glutinis* R4, in comparison to other oleaginous yeasts. **Journal of biotechnology**, v. 310, p. 21-31, 2020.

MENG, Xin et al. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable energy**, v. 34, n. 1, p. 1-5, 2009.

MONTEIRO, Alvaro Ferreira et al. High concentration and yield production of mannose from açai (*Euterpe oleracea* Mart.) seeds via mannanase-catalyzed hydrolysis. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 10939, 2019.

NIEDERBERGER, Peter et al. A strategy for increasing an in vivo flux by genetic manipulations. The tryptophan system of yeast. **Biochemical Journal**, v. 287, n. 2, p. 473-479, 1992.

NIELSEN, Jens. Systems biology of metabolism. **Annu Rev Biochem**, v. 86, n. 1, p. 245-275, 2017.

O'BRIEN, Edward J.; MONK, Jonathan M.; PALSSON, Bernhard O. Using genome-scale models to predict biological capabilities. **Cell**, v. 161, n. 5, p. 971-987, 2015.

OECD, P. (2015). OECD-FAO agricultural outlook 2015-2024.

ORTH, Jeffrey D.; THIELE, Ines; PALSSON, Bernhard Ø. What is flux balance analysis? **Nature biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 245-248, 2010.

OYEKOLA, Oluwaseun O.; VAN HILLE, Robert P.; HARRISON, Susan TL. Kinetic analysis of biological sulphate reduction using lactate as carbon source and electron donor: Effect of sulphate concentration. **Chemical Engineering Science**, v. 65, n. 16, p. 4771-4781, 2010.

POONTAWEE, Rujiralai; YONGMANITCHAI, Wichien; LIMTONG, Savitree. Efficient oleaginous yeasts for lipid production from lignocellulosic sugars and effects of lignocellulose degradation compounds on growth and lipid production. **Process Biochemistry**, v. 53, p. 44-60, 2017.

RATLEDGE, C. Microorganisms for lipids. **Acta Biotechnologica**, v. 11, n. 5, p. 429-438, 1991.

ROBLES-IGLESIAS, Raúl et al. Factors affecting the optimisation and scale-up of lipid accumulation in oleaginous yeasts for sustainable biofuels production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 171, p. 113043, 2023.

SAENGE, Chanika et al. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 210-218, 2011.

SAIKA, Azusa et al. Screening and isolation of the liamocin-producing yeast *Aureobasidium melanogenum* using xylose as the sole carbon source. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 129, n. 4, p. 428-434, 2020.

SCHAFFERER, Lukas et al. AmcA—a putative mitochondrial ornithine transporter supporting fungal siderophore biosynthesis. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 252, 2015.

SEIBOTH, Bernhard; METZ, Benjamin. Fungal arabinan and L-arabinose metabolism. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, p. 1665-1673, 2011.

SHI, Ning et al. Characterization of hydrochar and process water formed by hydrothermal carbonization of waste wood containing urea–formaldehyde resin. **Biomass Conversion and Biorefinery**, p. 1-11, 2021.

SINGH, Vineeta et al. Strategies for fermentation medium optimization: an in-depth review. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 2087, 2017.

SITEPU, Irnayuli et al. Carbon source utilization and inhibitor tolerance of 45 oleaginous yeast species. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 7, p. 1061-1070, 2014.

SLININGER, Patricia J. et al. Comparative lipid production by oleaginous yeasts in hydrolyzates of lignocellulosic biomass and process strategy for high titers. **Biotechnology and bioengineering**, v. 113, n. 8, p. 1676-1690, 2016.

SONG, Mingming; PEI, Haiyan. The growth and lipid accumulation of *Scenedesmus quadricauda* during batch mixotrophic/heterotrophic cultivation using xylose as a carbon source. **Bioresource Technology**, v. 263, p. 525-531, 2018.

SPIER, Franciela; BUFFON, Jaqueline G.; BURKERT, Carlos AV. Bioconversion of raw glycerol generated from the synthesis of biodiesel by different oleaginous yeasts: lipid content and fatty acid profile of biomass. **Indian Journal of Microbiology**, v. 55, p. 415-422, 2015.

SREEHARSHA, Rachapudi Venkata; MOHAN, S. Venkata. Obscure yet promising oleaginous yeasts for fuel and chemical production. **Trends in biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 873-887, 2020.

SREEHARSHA, Rachapudi V.; TEJASWINI, G. Sai; MOHAN, S. Venkata. Dual-stage biorefinery to convert spentwash hydrolysate into oleochemicals using *Trichosporon cutaneum* and *Yarrowia lipolytica*. **Bioresource Technology**, v. 354, p. 127146, 2022.

SU, Ying et al. Nitrogen sources preferences of non-*Saccharomyces* yeasts to sustain growth and fermentation under winemaking conditions. **Food Microbiology**, v. 85, p. 103287, 2020.

SUTHERS, Patrick F. et al. Recent advances in constraint and machine learning-based metabolic modeling by leveraging stoichiometric balances, thermodynamic feasibility and kinetic law formalisms. **Metabolic engineering**, v. 63, p. 13-33, 2021.

SZCZERBA, Hubert et al. A novel biocatalyst, *Enterobacter aerogenes* LU2, for efficient production of succinic acid using whey permeate as a cost-effective carbon source. **Biotechnology for biofuels**, v. 13, n. 1, p. 1-12, 2020.

TACHIBANA, Seiga; WATANABE, Kazuki; KONISHI, Masaaki. Estimating effects of yeast extract compositions on *Escherichia coli* growth by a metabolomics approach. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 128, n. 4, p. 468-474, 2019.

TANIMURA, Ayumi et al. Selection of oleaginous yeasts with high lipid productivity for practical biodiesel production. **Bioresource technology**, v. 153, p. 230-235, 2014.

THANAPIMMETHA, Anusith et al. Lipid production by the yeast *Lipomyces starkeyi* grown on sugars and oil palm empty fruit bunch hydrolysate. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 11, p. 1197-1210, 2021.

TOMÁS-PEJÓ, E.; MORALES-PALOMO, S.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C. Microbial lipids from organic wastes: outlook and challenges. **Bioresource Technology**, v. 323, p. 124612, 2021.

- TOMÉ, Daniel. Yeast extracts: Nutritional and flavoring food ingredients. *ACS Food Science & Technology*, v. 1, n. 4, p. 487-494, 2021.
- VENTORIM, Rafaela Zandonade et al. Genome-scale metabolic model of oleaginous yeast *Papiliotrema laurentii*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 180, p. 108353, 2022.
- VIEIRA, Nívea Moreira et al. Isolation of a new *Papiliotrema laurentii* strain that displays capacity to achieve high lipid content from xylose. **3 Biotech**, v. 10, p. 1-14, 2020a.
- WANG, Feifei et al. Integrated biorefinery strategy for tofu wastewater biotransformation and biomass valorization with the filamentous microalga *Tribonema minus*. **Bioresourcetechnology**, v. 292, p. 121938, 2019.
- WANG, Peixin et al. Manure application increases soil bacterial and fungal network complexity and alters keystone taxa. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, p. 1-12, 2022.
- WANG, Y. et al. Microbial lipid production from pectin-derived carbohydrates by oleaginous yeasts. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 7, p. 1097–1102, jul. 2015.
- WANG, Yan et al. Growth of engineered *Pseudomonas putida* KT2440 on glucose, xylose, and arabinose: Hemicellulose hydrolysates and their major sugars as sustainable carbon sources. **GCB Bioenergy**, v. 11, n. 1, p. 249-259, 2019.
- WEUSTER-BOTZ, Dirk. Experimental design for fermentation media development: statistical design or global random search?. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 90, n. 5, p. 473-483, 2000.
- XU, Xin et al. Microbial production of mevalonate by recombinant *Escherichia coli* using acetic acid as a carbon source. **Bioengineered**, v. 9, n. 1, p. 116-123, 2018.
- YANG, Fan et al. A recombinant strain of *Komagataeibacter xylinus* ATCC 23770 for production of bacterial cellulose from mannose-rich resources. **New Biotechnology**, v. 76, p. 72-81, 2023.
- ZHANG, Fengjuan et al. Biosynthesis of allantoin in *Escherichia coli* via screening a highly effective urate oxidase. **Biotechnology and bioengineering**, v. 119, n. 9, p. 2518-2528, 2022.