



V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA 05 a 07 de agosto de 2015, Londrina – PR

Influência de Sesamol no Metabolismo Lipídico e na Produção de Ácidos Orgânicos por *Yarrowia lipolytica*

**Luana Vieira da Silva, Gabrielle Coelho Leal, Maria Alice Zarur Coelho e Priscilla
Filomena Fonseca Amaral**

Universidade Federal do Rio de Janeiro - Departamento de Engenharia Bioquímica
Av. Athos da Silveira Ramos, 149 - Bloco E, lab 123 – Ilha do Fundão - Rio de Janeiro - RJ - CEP:21941-
909 - E-mail: luanarural@yahoo.com.br

RESUMO

Yarrowia lipolytica tem a capacidade de produzir ácido cítrico e lipídeos. O objetivo deste estudo foi avaliar a presença de sesamol como inibidor da fase lipogênica e, conseqüentemente, aumentar a produtividade de ácido cítrico. A adição de sesamol na concentração de 1,5 mM interferiu no metabolismo de produção de lipídeos, reduzindo a quantidade total obtida para aproximadamente 66% e em 170 h de fermentação em relação ao experimento controle. Os dados obtidos para a intensidade de fluorescência apresentaram valores mais baixos na presença de sesamol em relação ao meio sem sesamol indicando uma produção menor de corpúsculos lipídicos, porém o resultado não foi satisfatório para a produção de ácido cítrico, uma vez que a presença de sesamol no meio promoveu redução da produção de ácido cítrico.

INTRODUÇÃO

Y. lipolytica possui a capacidade de produzir e secretar ácido cítrico no meio de cultura utilizando glicerol como fonte de carbono (Rymowicz *et al.*, 2008). Quando a concentração de ácido cítrico alcança um valor crítico no interior da mitocôndria, este é secretado para o citosol e é clivado por ATP-citrato liase a oxaloacetato e acetil-CoA, precursor da biossíntese de ácidos graxos por micro-organismos oleaginosos durante a fase lipogênica (Ratledge e Wynn, 2002). Somente após a exaustão da fonte de carbono, esses ácidos graxos passam a ser metabolizados e o ácido cítrico acumulado passa a ser secretado (Makri *et al.*, 2010). Wynn *et al.* (1997) investigaram a influência da substância sesamol no metabolismo de *Mucor circinelloides in vivo* e observaram que esta substância inibiu a síntese de ácidos graxos. Um ensaio enzimático foi realizado, mostrando que sesamol causou inibição da atividade da enzima málica, envolvida na síntese de ácidos graxos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de sesamol no metabolismo de *Y. lipolytica* de forma a reduzir a atividade da enzima málica e, conseqüentemente, a disponibilidade da coenzima NADPH necessária na fase lipogênica com a finalidade de aumentar a produtividade de ácido cítrico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Micro-organismo e Inóculo: A cepa selvagem *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 selecionada de um estuário no Rio de Janeiro, Brasil foi utilizada. O inóculo foi preparado em meio YPD (%p/v: glicose, 2; peptona, 2; extrato de lêvedo, 1) e incubado em um agitador rotatório a 28°C, 160 rpm de agitação por 72 h. O volume centrifugado desse inóculo era suficiente para se obter uma concentração inicial de células de 1,0 mg p.s.cél/mL nos meios de produção.

Universidade Estadual de Londrina - Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445, Km 380 - Campus Universitário
Caixa Postal 10.011 CEP 86057-970 Centro de Ciências Exatas - Departamento de Bioquímica e
Biotecnologia Fone +55 (43) 3371.4270 - biq@uel.br

V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

05 a 07 de agosto de 2015, Londrina – PR

Influência de sesamol: Foi utilizado o meio descrito por Da Silva (2010) composto por 30 g/L de glicerol, 0,1705 g/L de extrato de levedo e componentes do meio mineral tamponado sem sesamol (como experimento controle) e com 1,5 mM de sesamol. Os experimentos foram realizados em frascos de Erlenmeyer de 1 L contendo 0,4 L de meio de cultivo a 28 °C e 250 rpm de agitação em *shaker* durante 170 h.

Métodos Analíticos

Quantificação da concentração celular: Em espectrofotômetro por densidade óptica a 570 nm e convertido para mg peso seco de células (p.s.cél)/mL.

Quantificação de ácidos orgânicos: Por cromatografia de fase líquida de alta eficiência (Waters 1525) com coluna analítica composta de polímero de octadecilsilano (YMC-Pack ODSAQ,S-5 µm, 12nm) acoplada a um detector ultra violeta com lâmpada de zinco a 214 nm. A dosagem foi realizada seguindo a metodologia descrita por Da Silva (2010).

Quantificação de glicerol: Por cromatografia líquida de alta eficiência (Waters 1525) com coluna *Aminex*® HPX- 87H, 300 x 7,8 mm (*Bio-Rad Laboratories Ltd*) e detector de índice de refração (Waters 2414). A fase móvel utilizada foi H₂SO₄ 5mM com vazão de 0,8mL/min e a temperatura da coluna mantida a 60°C.

Determinação de lipídeo intracelular: Através de citometria de fluxo Partec modelo Cyflowspace equipado com laser de 488 nm, utilizando *Nile Red* (NR) como fluorocromo. A análise citométrica e a correlação entre a fluorescência emitida e o teor de lipídeos foi obtida por metodologia descrita por Kameda *et al.* (2014).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Tabela 1 ilustra que a quantidade de lipídeo total segue a mesma tendência durante o cultivo na presença ou ausência de sesamol na concentração estudada, evidenciando um aumento gradativo do acúmulo de lipídeo intracelular. No entanto, observa-se que a quantidade acumulada foi maior durante toda a cinética de crescimento de *Y. lipolytica* na ausência de sesamol e o maior valor obtido foi alcançado em 170 h de cultivo. Logo, os resultados mostram que a adição de sesamol interfere no metabolismo de produção de lipídeos (fase lipogênica) dessa levedura, reduzindo a quantidade total obtida em aproximadamente 66%.

Tabela 1 - Teor lipídico obtido em células de *Yarrowia lipolytica* cultivadas com e sem sesamol em meio descrito por Da Silva (2010).

Tempo (h)	Teor Lipídico (g lipídeo/100 g biomassa seca)	
	Ausência de sesamol	Presença de sesamol
24	5,40	4,63
48	6,61	4,90
72	7,05	5,75
96	7,63	5,57
170	9,33	6,20

A Figura 1 apresenta os perfis de lipídeos polares e neutros para o mesmo cultivo. É possível observar que há maior quantidade na ausência de sesamol. Uma vez que o lipídeo polar é constituinte da parede celular da célula, este resultado é corroborado com a cinética de crescimento celular ilustrada pela Figura 2, onde se observa maior concentração celular para o

experimento sem sesamol. Na presença de sesamol, a fluorescência relacionada ao lipídeo neutro apresenta valores inferiores em relação ao experimento controle, indicando uma produção menor de corpúsculos lipídicos (lipídeo neutro).

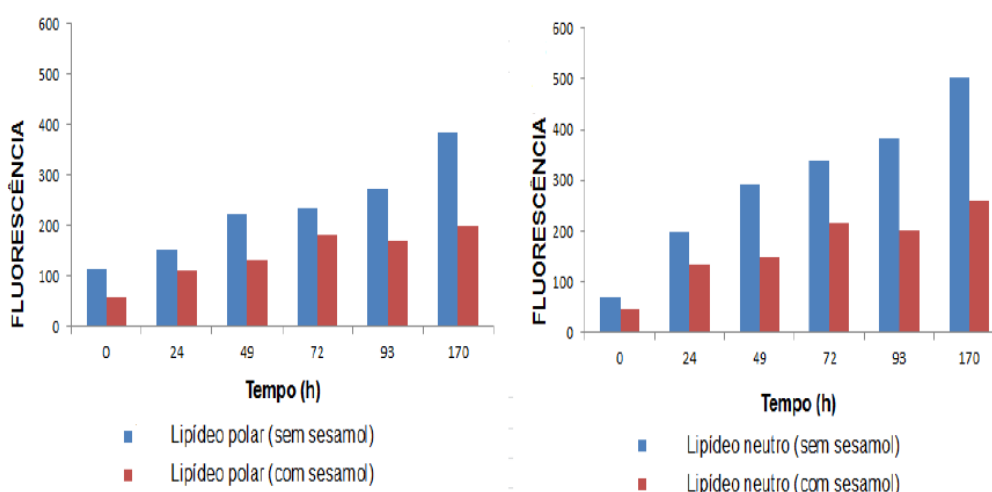


Figura 1. Perfil do teor de lipídeos polares e neutros de células da levedura *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 cultivada em meio descrito por Da Silva (2010) na ausência e presença de sesamol

Após identificar que sesamol influencia no metabolismo lipídico de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682, foi realizada a verificação da sua influência na produção de ácido cítrico. Através da Figura 2(A), é possível observar que a produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 em meio sem sesamol iniciou na fase de desaceleração da curva de crescimento. Porém, a produção de ácido isocítrico foi mais expressiva em relação à produção de ácido cítrico desde o início da fase exponencial. A produção máxima de ácido isocítrico foi 14,82 g/L em 48 h de fermentação e após este tempo observou-se uma estagnação e redução da produção do ácido isocítrico e aumento na produção de ácido cítrico, o que sugere que o ácido isocítrico foi utilizado como fonte de carbono pela levedura. O glicerol continuou sendo consumido, indicando que o citrato formado também era produzido a partir desta fonte de carbono.

A Figura 2(B) apresenta os resultados cinéticos obtidos por *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 em meio adicionado de sesamol 1,5 mM. A produção máxima de ácido cítrico foi reduzida para 6,14 g/L (170 h) em relação ao teste controle (8,64 g/L em 170 h). A produção de ácido isocítrico foi de 9,39 g/L em 170 h, similar ao experimento controle, conforme é mostrado na Tabela 2. A partir dos dados apresentados na Figura 2(A e B), é possível identificar que a presença de sesamol interferiu na produção de ácido isocítrico, retardando o início da sua produção. Em 24 h de fermentação, a produção de ácido isocítrico foi, aproximadamente, 3 vezes maior para o cultivo controle em relação ao meio com sesamol. A presença de sesamol na concentração testada afetou a concentração celular reduzindo de 4,3 g p.s.cél/L para 3,18 g p.s.cél/L em 170 h de fermentação. Portanto, a adição de sesamol não favoreceu a produção de ácido cítrico. A produção máxima de ácido isocítrico foi similar para as duas condições experimentais, sendo $14,82 \pm 0,53$ g/L em 48 h sem sesamol e $14,06 \pm$ g/L em 72 h com sesamol.

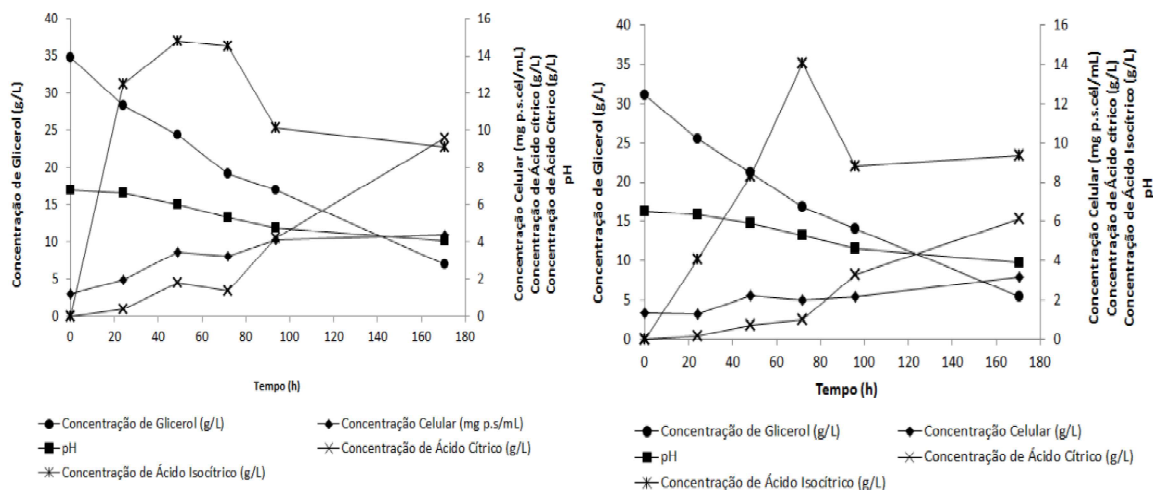


Figura 2. Perfil de concentração celular, consumo de glicerol, produção de ácidos cítrico e isocítrico e pH do experimento com *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 na ausência de sesamol (esquerda) e na presença de sesamol (direita).

Tabela 2. Parâmetros cinéticos no ponto de máxima concentração de ácido cítrico (170 h) na ausência e presença de 1,5 mM sesamol em meio descrito por Da Silva (2010).

Sesamol	P _{AC} (g/L)	Y _{P/S} (g/g)	Q _{AC} (g/L.h)	Y _{P/X} (g/g)	Y _{X/S} (g/g)	P _{AIC} (g/L)	R _{AC/ISC}
Ausência	8,64±0,01 ^a	0,31	0,05	2,73	0,11	9,08±0,53 ^a	0,95
Presença	6,14±0,4 ^b	0,24	0,04	3,37	0,07	9,39±0,82 ^b	0,65

^a± Desvio Padrão da triplicata do experimento realizado na ausência de sesamol

^b± Desvio Padrão da duplicata do experimento realizado na presença de sesamol

CONCLUSÃO

A adição de 1,5 mM de sesamol ao meio de produção de ácido cítrico descrito por Da Silva (2010) afetou o metabolismo lipídico de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682, reduzindo seu acúmulo no interior das células (lipídeo neutro). No entanto, a produção de ácido cítrico foi reduzida na presença deste composto. Estes resultados evidenciam que a fase lipogênica é necessária para que haja produção maior de ácido cítrico por esta cepa.

REFERÊNCIAS

- Da Silva, L. V., 2010. Produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* utilizando glicerol como fonte de carbono. Dissertação submetida ao Corpo Docente do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1 – 94.
- Kameda, E., Martins, F. F., Amaral, P. F. F., Valoni, E. A., Coelho, M. A. Z., (2014). Flow cytometry as a tool to verify media influence in bio-oil accumulation by *Yarrowia lipolytica*. Chemical Engineering Transactions. 38, 529-534.
- Ratledge, C., Wynn, J., 2002. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms, Adv. Appl. Microbiol. 51, 1–51.
- Rymowicz, W., Rywinska, A., Gladkowski, W., 2008. Simultaneous production of citric acid and erythritol from crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* Wratlavia K1. Chemical Papers. 62, 3, 239–246.
- Wynn, J. P., Kendrick, A., Ratledge, C., 1997. Sesamol as an Inhibitor of Growth and Lipid Metabolism in *Mucor circinelloides* via Its Action on Malic Enzyme. Lipids. 32, 6, 605-610.
- Makri, A., Fakas, S., Aggelis, G., 2010. Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeated batch cultures. Bioresource Technology. 10, 2351-2358.