



DAYANA PEREIRA DE ANDRADE

**PRODUÇÃO DE γ -DECALACTONA POR
LEVEDURAS EM BATELADA SIMPLES E
BATELADA ALIMENTADA**

LAVRAS – MG

2015

DAYANA PEREIRA DE ANDRADE

**PRODUÇÃO DE γ -DECALACTONA POR LEVEDURAS EM
BATELADA SIMPLES E BATELADA ALIMENTADA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Disney Ribeiro Dias

Coorientadoras

Dra. Rosane Freitas Schwan

Dra. Beatriz Ferreira Carvalho

LAVRAS – MG

2015

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados
informados pelo (a) próprio(a) autor(a).**

Andrade, Dayana Pereira de.

Produção de γ -decalactona por leveduras em batelada simples e batelada alimentada / Dayana Pereira de Andrade. – Lavras: UFLA, 2015.

68 p.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador: Disney Ribeiro Dias.

Bibliografia.

1. Lactonas microbianas. 2. *Lindnera saturnus*. 3. Glicerol bruto. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

DAYANA PEREIRA DE ANDRADE

**PRODUÇÃO DE γ -DECALACTONA POR LEVEDURAS EM
BATELADA SIMPLES E BATELADA ALIMENTADA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 25 de fevereiro de 2015.

Dra. Ivana Aparecida da Silveira

UNILAVRAS

Dr. Cledir Rodrigues Santos

Universidade do Minho, Portugal

Dr. Disney Ribeiro Dias

Orientador

LAVRAS – MG

2015

Aos meus pais, Waldir e Margarida.
À minha irmã, Michely.
As minhas sobrinhas, Júlia, Luíza e Isabela.
E ao meu marido, Dreigson.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida, por não me deixar desistir, por estar sempre me dando forças para enfrentar os obstáculos e realizar meus sonhos.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Biologia.

Ao professor Dr. Disney Ribeiro Dias, pela orientação, atenção, ensinamentos, paciência, compreensão e confiança na realização deste trabalho.

À professora Dra. Rosane Freitas Schwan, pela coorientação, confiança e ensinamentos.

À pós-doutoranda Beatriz, pela disponibilidade, ensinamentos, sugestões e contribuição na realização deste trabalho.

Ao professor Whasley, pela atenção, ensinamentos e contribuição nas análises cromatográficas.

À secretária Rose que, pacientemente, nos atendia, auxiliando nas informações do mestrado.

À Cidinha, Maria Gabriela e Suzana, pelo apoio, carinho e contribuição nas análises cromatográficas.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Às minhas amigas Rafaela, Nádia, Letícia, Tamara, Tenille, Luciana Ribeiro, Andréia e Luciana Siqueira, pela amizade, carinho, conselhos, ensinamentos durante a realização do trabalho e companhia nas horas difíceis.

Aos amigos e técnicos do laboratório Angélica, Kelly, Monique, Camila, Roberta, Cíntia, Juliana Amorim, Josiane, Sílvia, José, Mariana Dias, Igor, Vanessa Mesquita, Ivani, Juliana Tensol e Paulinho, pela ajuda, pelos momentos de descontração e agradáveis companhias.

Aos meus amigos, Michelly e Deliandro, Rafaela e Guilherme, Daniela e Sávio, Lorryne e Deny, Núbia e Romário, Gustavo e Patrícia, entre outros, pela amizade, histórias vividas e momentos alegres.

Aos meus pais, Waldir e Margarida, pelo carinho, amor, educação, exemplo de vida, esforço pela minha formação, incentivo e por sempre estarem do meu lado.

Ao meu marido, Dreigson, pelo amor, carinho, compreensão, incentivo, pelas ausências nos finais de semanas e muitas noites, pela companhia nas madrugadas e finais de semana no laboratório.

À minha família, irmã, sobrinhas, avós, tios (as), primos (as), cunhadas (os), sogra (o), pelo carinho, apoio, orações e por serem meu alicerce em todos os momentos.

À equipe Zé Maria Representações, pelo incentivo, amizade, compreensão e ausências nos trabalhos para a realização do mestrado.

RESUMO GERAL

As lactonas são compostos formadores de aromas de grande interesse para as indústrias de alimentos. Entre as lactonas, a γ -decalactona é a mais utilizada etemaroma frutado de pêssego. Na maioria dos processos biotecnológicos, o óleo de rícino, o ácido ricinoleico ou ésteres dos mesmos são utilizados como substrato para a síntese de γ -decalactona por microrganismos. Este composto é sintetizado através da biotransformação na via da β -oxidação peroxissomal microbiana. O glicerol bruto é o principal subproduto proveniente da produção do biodiesel e tem se apresentado como uma alternativa de substrato para diversas aplicações biotecnológicas, gerando produtos de valores agregados por sua ampla disponibilidade e custo competitivo. Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar as melhores condições para a produção de γ -decalactona por leveduras. O glicerol bruto e o óleo de rícino foram avaliados como substrato em diferentes concentrações (10%, 20% e 30%), em batelada simples e batelada alimentada. Após essa primeira etapa, a influência do pH e da agitação foi investigada no crescimento e na produção de γ -decalactona pelas leveduras *Yarrowia lipolytica* CCMA 0242 e *Lindnera saturnus* CCMA 0243. A levedura *Y. Lipolytica* CCMA 0242, no cultivo suplementado com 30% do óleo de rícino, apresentou melhor resultado, não havendo diferença quanto aos processos fermentativos testados. O crescimento da levedura *Y. Lipolytica* CCMA 0242 também foi maior quando inoculada no meio de cultivo com óleo de rícino. O pH e a agitação não interferiram na produção do aroma pelas leveduras. A produção de γ -decalactona pela levedura *L. saturnus* CCMA 0243 foi 97,5% maior do que pela *Y. Lipolytica* CCMA 0242. A população da levedura *L. saturnus* CCMA 0243 atingiu maior crescimento na agitação de maior velocidade (200 rpm). Nas condições testadas, o óleo de rícino a 30% apresentou melhores resultados para a produção de γ -decalactona. A levedura *Lindnera saturnus* CCMA 0243 produziu quantidades consideráveis de γ -decalactona.

Palavras-chave: Lactonas microbianas. *Lindnera saturnus*. *Yarrowia lipolytica*. Glicerol bruto.

GENERAL ABSTRACT

Lactones are compounds with sensory properties of great interest for food industries. Among lactones, γ -decalactone is the most used and it has a fruity peach aroma. In most biotechnological processes, castor oil, ricinoleic acid or its esters are used as a substrate for the synthesis of γ -decalactone by microorganisms. This compound is synthesized by microbial biotransformation on the peroxisomal β -oxidation pathway. Crude glycerol is the main by-product derived from the production of biodiesel and it is used as an alternative substrate for a variety of biotechnological applications, generating value-added products because of its wide availability and competitive cost. The objective of this study was to evaluate the best conditions for the production of yeast γ -decalactone. Crude glycerol and castor oil in different concentrations (10, 20 and 30%) were evaluated as substrate, in simple batch and fed-batch. After that first stage, the influence of pH and agitation were evaluated on the growth and production of γ -decalactone from yeasts *Yarrowia lipolytica* CCMA 0242 and *Lindnera saturnus* CCMA 0243. *Y. lipolytica* CCMA 0242 showed better results in the culture supplemented with 30% castor oil. There was no difference in the tested fermentation processes. The growth of yeast *Y. lipolytica* CCMA 0242 was also higher when inoculated into the medium with castor oil. Agitation and pH did not affect the production of aroma by yeasts. Production of γ -decalactone by yeast *L. saturnus* CCMA 0243 was 97,5% greater than the *Y. lipolytica* CCMA 0242. The population of yeast *L. saturnus* CES-Y677 UFLA obtained a higher growth when was agitated at high speed (200 rpm). In the evaluated conditions, 30% castor oil showed the best results for the production of γ -decalactone. Yeast *Lindnera saturnus* CCMA 0243 produced considerable amounts of γ -decalactone.

Keywords: Microbial lactones. *Lindnera saturnus*. *Yarrowia lipolytica*. Crude glycerol.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	10
1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	Metabólitos microbianos na indústria	13
2.2	Produção microbiana de aromas	14
2.2.1	Produção de γ- Decalactona por leveduras	16
2.2.1.1	Via de produção de γ-decalactona: β-oxidação peroxissomal	20
2.3	Fontes de carbono para a produção de γ- Decalactona	24
2.3.1	Óleo de rícino	24
2.3.2	Glicerol	26
	REFERÊNCIAS	31
	SEGUNDA PARTE	39
	ARTIGO 1 Produção de γ-decalactona por <i>Yarrowia lipolytica</i> CCMA 0242 e <i>Lindnera saturnus</i> CCMA 0243 em diferentes substratos e condições de produção	39
1	INTRODUÇÃO	42
2	MATERIAIS E MÉTODOS	45
2.1	Microrganismos	45
2.2	Condições de cultivo e preparo do inoculo	45
2.3	Biotransformação	45
2.4	Avaliação da produção de γ-decalactona	46
2.5	Contagem de Células Viáveis	47
2.6	Experimento 1 - Crescimento e produção de γ-decalactona por <i>Yarrowia lipolytica</i> CCMA 0242 em diferentes fontes de carbono e condições de cultivo	48
2.7	Experimento 2 - Influência do pH e da agitação do meio de cultivo sobre o crescimento e produção de γ-decalactona por <i>Yarrowia lipolytica</i> CCMA 0242 e <i>Lindnera saturnus</i> CCMA 0243	49
3	RESULTADOS	51
3.1	Experimento 1	51
3.1.1	Crescimento durante o processo de biotransformação	51
3.1.2	Produção de γ-decalactona	53
3.2	Experimento 2	54
3.2.2	Crescimento durante o processo de biotransformação	54
3.2.3	Produção de γ-decalactona por diferentes espécies de leveduras	58
4	DISCUSSÃO	59
5	CONCLUSÃO	64
	REFERÊNCIAS	65

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

As lactonas que apresentam menos de 12 átomos de carbono são formadoras de aromas de grande interesse para as indústrias de aromas. Entre as lactonas, a γ -decalactona é a mais utilizada nas indústrias de alimentos, por apresentar um aroma frutado de pêssego, podendo ser obtida por processos biotecnológicos pelos microrganismos e ser classificada como natural (ALCHIHAB et al., 2010a; SCHRADER et al., 2004; WACHÉ et al., 2003). Nos últimos anos, a procura por aromas naturais tem aumentado, em comparação com os produtos similares obtidos por métodos químicos (ROMERO-GUIDO et al., 2011).

Os microrganismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos, são conhecidos por produzirem compostos aromatizantes, tais como ácidos, álcoois, ésteres, lactonas e terpenos (SCHINDLER; SCHMID, 1982). Esses microrganismos estão bem equipados metabolicamente para atuar como biocatalisadores na química de produtos naturais e prosperam por meio de suas habilidades para alterar metabolicamente as estruturas de vários compostos orgânicos (SARIASLANI; ROSAZZA, 1984).

Na maioria dos processos biotecnológicos, utilizam-se o óleo de rícino, o ácido ricinoleico ou ésteres dos mesmos como substrato para a síntese de γ -decalactona (SCHRADER et al., 2004), que é produzida pela via da β -oxidação peroxissomal, por meio da biotransformação do ácido ricinoleico (ácido 12-hidroxi-octadec-9-enoico). A biossíntese de γ -decalactona envolve duas etapas: a biotransformação do ácido ricinoleico em ácido 4-hidroxidecanoico pelas leveduras e, em seguida, acidificação e tratamento térmico do meio de cultivo (ALCHIHAB et al., 2010a; ORKUI; UCHIYAMA; MIZUGAKI, 1963). Os

processos que utilizam estirpes de *Yarrowia lipolytica* para a produção de lactonas são os que obtêm maiores rendimentos do produto em relação às outras espécies de microrganismos utilizadas (WACHÉ et al., 2001).

No cultivo de microrganismos, altas concentrações de lactona podem ser um fator limitante nas aplicações industriais, pois o aroma produzido pode ser tóxico para as leveduras produtoras (FERON et al., 1997). Outro fato é que as leveduras podem consumir a γ -decalactona como fonte de carbono na ausência do substrato, permitindo seu completo desaparecimento do meio (PAGOT et al., 1997). No entanto, uma alternativa para superar esses problemas é a utilização da fermentação em batelada alimentada. O cultivo em batelada alimentada permite alcançar maior densidade de células, altos rendimentos do produto desejado e redução do potencial de toxicidade do produto para as células, devido ao fornecimento de mais substratos para as células (GOMES; TEIXEIRA; BELO, 2012; LEE et al., 1998).

Outro substrato que pode ser avaliado, o glicerol bruto, que é o principal subproduto proveniente da produção do biodiesel, tem se apresentado como uma alternativa de substrato para diversas aplicações biotecnológicas, gerando produtos de alto valor agregado (PAPANIKOLAOU et al., 2008). Diferentes elementos químicos, como fósforo, enxofre, magnésio, cálcio, nitrogênio e sódio, estão presentes no glicerol bruto e estes são fáceis de serem metabolizados pelos microrganismos (THOMPSON; HE, 2006).

Portanto, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar as melhores condições para a produção de γ -decalactona. O glicerol bruto e o óleo de rícino foram utilizados como substrato em diferentes concentrações (10%, 20% e 30%), por meio da fermentação em batelada simples e batelada alimentada, pela levedura *Yarrowia lipolytica* CCMA 0242. A influência do pH e da agitação no crescimento e na produção γ -decalactona pelas leveduras

Yarrowia lipolytica CCMA 0242 e *Lindnera saturnus* CCMA 0243 foi investigada.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Metabólitos microbianos na indústria

Existem dois grupos de metabólitos microbianos de interesse para a microbiologia industrial. São eles os metabólitos primários, que são sintetizados durante a fase exponencial de crescimento do microrganismo e os metabólitos secundários, que são produzidos próximo ao final da fase de crescimento ou na fase estacionária de crescimento. Em muitos processos industriais, a formação do produto desejado não é durante a fase exponencial de crescimento, mas somente na fase estacionária. Uns dos metabólitos de interesse industrial, complexos e importantes, são os secundários (MADIGAN et al., 2010).

Muitos metabólitos secundários microbianos são de alto valor biotecnológico para a medicina, a agricultura e a indústria de alimentos. Constituem uma importante classe de compostos altamente valiosos que cobrem um amplo espectro de aplicações, incluindo medicamentos (antibióticos, agentes antitumorais, imunossupressores), agroquímicos (pesticidas, inseticidas), biocombustíveis (esqualeno, óleo-resina) e aditivos alimentares (carotenoides, flavonoides, óleos essenciais e compostos voláteis) (NGUYEN et al., 2012). Os metabólitos secundários têm sido obtidos, provavelmente, por pesquisas envolvendo muitos microrganismos durante algumas décadas. Entretanto, diferentes compostos são produzidos por diferentes isolados (DONADIO et al., 2002).

A microbiologia industrial utiliza microrganismos para a síntese de produtos comerciais ou para a realização de importantes transformações químicas, sendo os fungos (leveduras e bolores) os mais utilizados nos processos industriais. Os microrganismos utilizados em processos industriais devem sintetizar o produto de interesse em grandes quantidades, crescer rapidamente

em meio de cultura de baixo custo, estar disponível em grandes quantidades, ser de fácil manipulação genética e não patogênico (MADIGAN et al., 2010).

Os microrganismos têm a capacidade de sintetizar uma grande variedade de metabólitos secundários, adicionalmente às reações bioquímicas necessárias para sintetizar uma nova célula durante o metabolismo primário. O objetivo atual é a procura de novos compostos que são produtos do metabolismo secundário. A eficácia da seleção destes compostos é determinada por dois principais fatores, a avaliação do microrganismo produtor e o teste de seleção empregado (RYWINSKA et al., 2013).

2.2 Produção microbiana de aromas

Os aromas são formados por uma mistura complexa de diversas moléculas orgânicas voláteis, tais como ésteres, aldeídos, cetonas, lactonas, álcoois e outros. A obtenção dos compostos de aroma natural pode ser por extração de folhas de plantas, flores e frutas, podendo também ser produzidos por vários microrganismos (XIE; SUN; YU, 2006; ZHANG; ZENG; LI, 2006). Embora a maioria desses produtos seja obtida por síntese química ou por extração a partir de plantas, a utilização de processo microbiano tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas. O processo microbiano apresenta vantagens como rápida produção, facilidade no controle dos compostos, sistemas simples de estudo das vias biossintéticas e matéria-prima de baixo custo e de fácil aquisição para a produção de substâncias que podem ser utilizadas nas indústrias alimentícias (BRENNAN, 2003; SCHRADER et al., 2004).

A produção dos aromas por síntese química está associada a vários problemas, como baixa produção, reações colaterais, geração de misturas racêmicas indesejáveis, subprodutos e processos de produção de que são

prejudiciais ao meio ambiente. Os aromas produzidos por síntese química não são legalmente rotulados como “naturais”, mas como “naturais idênticos” ou “artificiais” (AGUEDO et al., 2004; LONGO; SANROMÁN, 2006).

A obtenção de aromas por microrganismo no processamento de alimentos é antiga e tem o objetivo de aumentar o tempo útil dos produtos, ocasionado pelos processos fermentativos. No entanto, em alimentos e em bebidas fermentadas, a ação microbiana não só aumenta a vida de prateleira, mas também produz um aroma característico (GATFIELD, 1995). Na obtenção dos produtos naturais, bactérias, fungos filamentosos e leveduras podem atuar como biocatalisadores, nos quais alteram metabolicamente as estruturas de diferentes compostos orgânicos através dos seus sistemas enzimáticos (SARIASLANI; ROSAZZA, 1984).

A cromatografia gasosa emergente substituiu os métodos clássicos de análises orgânicas e facilitou a separação e a elucidação estrutural de compostos voláteis (KRINGS; BERGER, 1998). Muitos trabalhos utilizam a cromatografia gasosa realizando a extração com solventes, cromatografia gasosa com espectrometria de massa (GC-MS) e microextração de fase sólida, acoplado à cromatografia gasosa com espectrometria de massa (SPME-GC-MS) como métodos analíticos para a identificação de γ -decalactona. No entanto, Zhao et al. (2014) estudaram um novo método rápido para a quantificação de γ -decalactona, utilizando o método de determinação quantitativa por espectrofotometria baseado na reação hidroxamato férrico, verificando que esse método reduz o tempo e o custo da matéria-prima utilizada.

Tahara e Mizutani (1975) avaliaram a produção de aromas por *Sporobolomyces odorus*, o qual foi o primeiro relato de microrganismos produtores de aromas. Os compostos identificados foram: álcool isoamílico, álcool benzílico, álcool fenil etílico, γ -decalactona, ácido 4-hidroxi-cis-6-dodecanoico e lactonas.

2.2.1 Produção de γ -decalactona por leveduras

As lactonas apresentam propriedades sensoriais e são amplamente utilizadas nas indústrias de aromas, sendo encontradas naturalmente em frutas e em alguns produtos fermentados (LIN; LEE; CHOU, 1996). As lactonas são ésteres cíclicos derivados da esterificação intramolecular (ou ciclização) de um ácido hidroxilado. Dois principais aromas de lactonas são conhecidos, gama e delta-lactona e são distinguidos pela posição do grupo hidroxila no ácido graxo (ALCHIHAB et al., 2010a; FERON et al., 1997).

A posição do grupo hidroxila determina qual lactona será produzida (γ ou δ), independente das instaurações da cadeia carbônica. Ácidos graxos com o grupo hidroxila na posição 10 ou 12 são convertidos a γ -decalactona e o grupo hidroxila na posição 11 ou 13 é convertido a δ -decalactona (FERON et al., 1997). A obtenção destes compostos pode ser feita diretamente das frutas ou por síntese química, sendo a extração a partir de produtos naturais muito cara e a obtida por síntese química responde menos às exigências do consumidor (ALCHIHAB et al., 2010b). Porém, o aumento da demanda por compostos aromáticos naturais tem incentivado o desenvolvimento da produção de lactonas naturais por processos biotecnológicos utilizando microrganismos ou enzimas. Os compostos aromáticos são classificados como naturais, pela legislação de alimentos dos EUA e da Europa (ENDRIZZI; AWADÉ; BELIN, 1993; SOUZANETO; PASTORE; MACEDO, 2004).

A γ -decalactona ($C_{10}H_{18}O_2$), que apresenta um importante aroma frutado de pêssego, manga, damasco, morango e de chocolate, é uma das lactonas mais produzidas, sendo centenas de toneladas por ano. No início dos anos 1980, a γ -decalactona natural era um composto aromático extremamente caro e raro (preço > US\$ 10.000 kg⁻¹). Com a subsequente introdução e a otimização por processos

microbianos verificou-se uma redução no preço para cerca de US\$ 300 kg⁻¹ (LEE; LIN; CHOU, 1995; SCHRADER et al., 2004).

Várias lactonas naturais podem apresentar atividades biológicas, tais como antibacteriana, antifúngica ou anti-inflamatória (NAGO; MATSUMOTO; NAKAI, 1993). Este composto também tem efeito tóxico contra as células produtoras; em condições de produção, resulta na inibição do crescimento celular e na limitação da taxa de produção (ALCHIHAB et al., 2009, 2010a; FERON et al., 1996; WACHÉ et al., 2003). Propõe-se que o efeito tóxico da lactona produzida pelas leveduras esteja relacionado com a interação da molécula com os componentes e os lipídeos da membrana celular (AGUEDO et al., 2003).

Na maioria dos processos biotecnológicos, estirpes de leveduras produzem a γ -decalactona por meio da biotransformação do ácido ricinoleico (ácido 12-hidroxi-octadec-9-enoico). O ácido ricinoleico é ácido graxo C₁₈ hidroxilado que, na sua forma esterificada, é o principal constituinte (cerca de 86%) do óleo de rícino (PUTHLI; RATHOD; PANDIT, 2006).

A *Yarrowia lipolytica* é uma das espécies de levedura mais utilizadas para a biotransformação do ácido ricinoleico em γ -decalactona (Figura 1), apresentando maior rendimento devido à capacidade de crescer em substratos hidrofóbicos, graças às suas lipases eficientes, numerosos citocromos P450 e acil-CoA oxidase (WACHÉ et al., 2003). O processo envolve a degradação do substrato pela via da β -oxidação peroxissomal, levando à formação do ácido-4-hidroxi-decanoico, que cicliza em γ -decalactona. A levedura também é conhecida por ser produtora de lipases. Estas enzimas hidrolisam os triacilglicerídeos em glicerol e ácidos graxos livres, disponibilizando os substratos de ácidos graxos para o microrganismo (AGUEDO et al., 2003; BLIN-PERRIN et al., 2000; LOPES et al., 2008; NAJJAR et al., 2011).

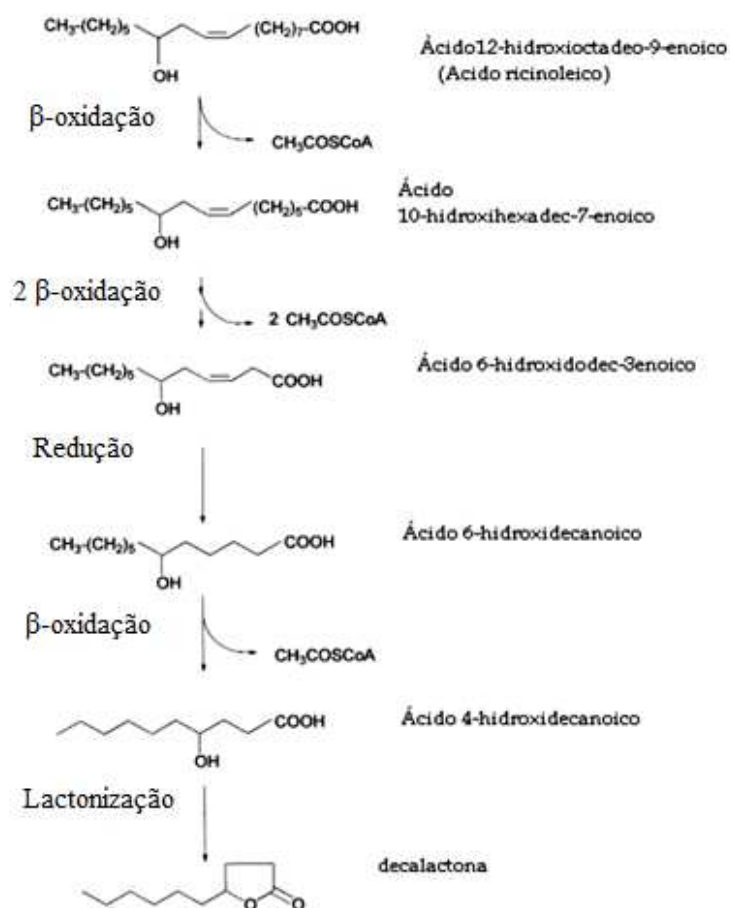


Figura 1 Bioconversão do ácido ricinoleico em γ -decalactona por *Yarrowia lipolytica*. Adaptado de Schrader et al. (2004)

A via metabólica da *Yarrowia lipolytica* pode ser influenciada pela concentração de O_2 dissolvido e o estado oxidativo do meio de cultivo, assim como a produção de ácidos orgânicos ou a oxidação de alcanos dependente de citocromo (FICKERS et al., 2005; KAMZOLOVA et al., 2003). O O_2 é um fator que intervém na via metabólica da β -oxidação, participando nas reações de produção e de reconsumo do aroma (GOMES et al., 2007).

A produção de γ -decalactona a partir do ácido ricinoleico por leveduras do gênero *Candida* sp. foi inicialmente observada por Okui, Uchiyama e Mizugaki (1963). Os processos que utilizam estirpes de *Yarrowia lipolytica* para a produção de lactonas são os que obtêm maiores rendimentos do produto em relação às outras espécies de microrganismos utilizadas (WACHÉ et al., 2001).

Alchihab et al. (2009) avaliaram alguns fatores, incluindo temperatura, pH inicial e concentração de óleo rícino, na produção de γ -decalactona produzida pela cepa psicofílica e outramesofílica de *Rhodotorula aurantiaca*. A maior produção de γ -decalactona em frascos (5,8 g/L) foi obtida com a cepa psicofílica A19, a 14 °C e pH 7,0 inicial, em meio contendo 20 g/L de óleo de rícino. Em fermentador, uma concentração γ -decalactona de 6,6 g/L foi alcançada com a cepa A19, ao passo que foi obtido um máximo de 0,1 g/L com a cepa mesofílica.

A produção de γ -decalactona foi realizada acelerando-se a hidrólise do óleo de rícino pela lipase anteriormente produzida por culturas de *Yarrowia lipolytica*. Para esse efeito, a produção de lipase foi primeiramente testada utilizando-se duas cepas de *Y. lipolytica* (W29 ATCC20460 e IMUFRJ50862) e azeite como o indutor, demonstrando que a maior produção do aroma (1.600 mg L⁻¹) foi obtida sem um indutor de lipase. No entanto, a pré-indução de lipase diminuiu a fase de latência para a secreção de γ -decalactona (BRAGA; GOMES; BELO, 2012).

Braga e Belo (2013) realizaram a produção de γ -decalactona utilizando diferentes materias (polimetacrilatode metilo e DupUM®) para a imobilização da *Yarrowia lipolytica*. A maior concentração de aroma foi obtida com células imobilizadas em DupUM®, em que o reconsumo do aroma pelas células foi evitado, ao contrário do que acontece com as células livres.

Braga et al. (2015) avaliaram a influência da mistura do meio de cultivo e as condições de transferência de massa de oxigênio (KLa) na produção de γ -

decalactona em dois diferentes biorreatores, o de agitação mecânica e o de arlift. Concluíram que, independentemente do tipo de biorreator utilizado, o aumento na taxa de transferência de oxigênio melhorou a produção de γ -decalactona, porém, diminuiu a concentração final do aroma. A concentração máxima (3 g/L) foi atingida em biorreator de arlift.

2.2.1.1 Via de produção de γ -decalactona: β -oxidação peroxissomal

O metabolismo lipídico de leveduras envolvido na biotransformação pela via da β -oxidação peroxissomal foi descrito pela primeira vez por Okui, Uchiyama e Mizugaki (1963). Alguns aspectos das reações da β -oxidação (especialmente aqueles que envolvem enzimas auxiliares e organização dos fluxos) e lactonização caminho do produto não são bem conhecidos (WACHÉ et al., 2003).

A β -oxidação é um sistema de oxidações cíclicas de ácidos graxos, constituído por quatro reações sucessivas catalisadas por três enzimas, entre os quais acil-CoA-oxidase controla o passo chave produzindo um acil-CoA. As reações envolvidas são: 1) desidrogenação: liberação de trans 2,3 enoil-CoA; 2) hidratação da instauração: liberação de 3-hidroxiacil-CoA; 3) oxidação: formação de 3-cetoacil-CoA e 4) liberação de acetil-CoA e acil-CoA sem dois carbonos. Esta sequência se repete várias vezes, até a degradação do substrato (ALCHIHAB et al., 2010a; WACHÉ et al., 1998). Os fungos filamentosos e as leveduras são eucariotos que apresentam dois compartimentos subcelulares, mitocôndria e peroxissomos, hábeis em realizar a β -oxidação de ácidos graxos (SOUZA NETO; PASTORE; MACEDO, 2004) (Figura 2).

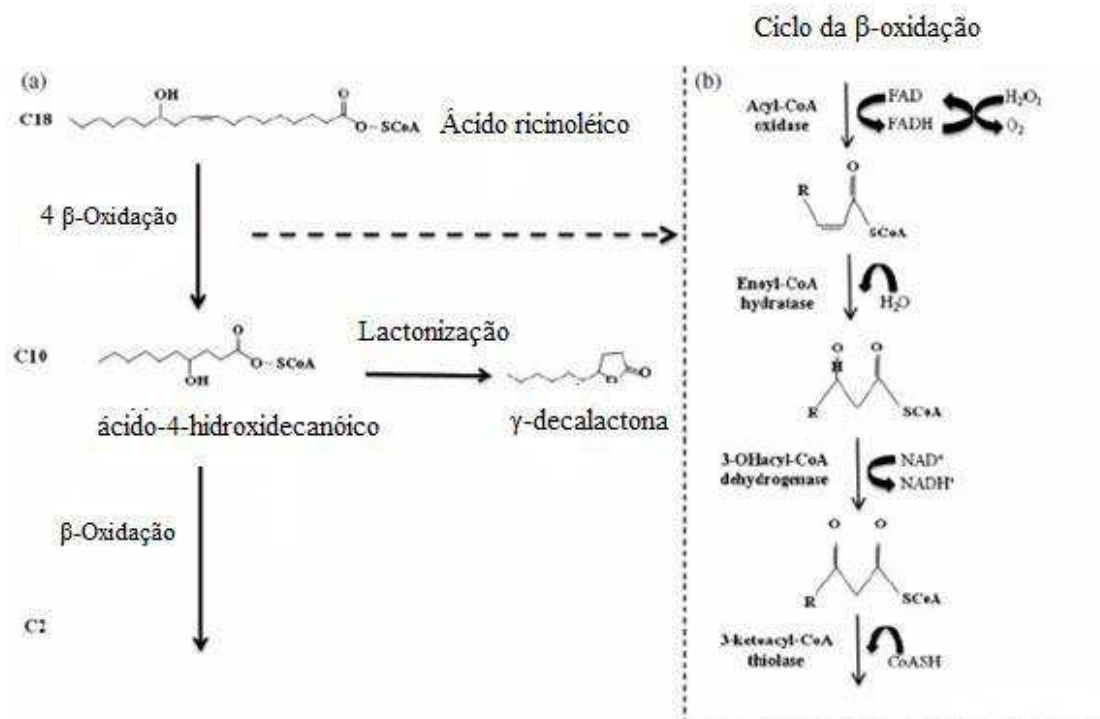


Figura 2 Via de biotransformação do ácido ricinoléico em γ -decalactona (a) e as enzimas da β -oxidação peroxisomal de leveduras (b). Adaptado de Waché et al. (1998)

Antes de os ácidos graxos entrarem nos peroxissomas, eles são ativados no citoplasma em ésteres de coenzima A, pela ação de uma acetil-CoA sintetase. Quando já estão nos peroxissomas das leveduras, a β -oxidação é catalisada pela enzima acil-CoA oxidase e, em seguida, por duas atividades de uma enzima multifuncional, 2-enoil-CoA hidratase e 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase, e pela 3-cetoacil-CoA tiosulfolase (WACHÉ et al., 1998). As atividades das enzimas acil-CoA oxidase e 3-hidroxiacil-CoA-desidrogenase podem ser influenciadas pelo O_2 , que é necessário para a regeneração dos cofactores FAD^+ e, mais indiretamente, NAD^+ (BAKKER et al., 2001).

O processo de lactonização do γ -decalactona ocorre em pH baixo (2,0). A lactonização ocorre espontaneamente no C10, quando o produto de degradação, o ácido ricinoleico, tem sua hidroxila interposta no carbono em γ . Esta esterificação ocorre competitivamente à β -oxidação e pode acontecer entre as quatro reações, dependendo dos dados cinéticos (WACHÉ et al., 2002).

Na via da β -oxidação, durante a biotransformação do ácido ricinoleico em γ -decalactona, pode haver a formação de compostos implícitos, 3-hidroxi- γ -decalactona, dec-2-en-4-olide e dec-3-en-4-olide, que são originados a partir do precursor direto da γ -decalactona (ácido-4-hidroxidecanoico) e podem ser detectados no meio (Figura 3). Estes três compostos não são utilizados atualmente nas indústrias de aromas. Na verdade, o dec-3-en-4-olide apresenta um aroma frutado de pêssego mais potente do que a γ -decalactona, porém, sua utilização depende de um método barato para separar seu isômero, que tem aroma de cogumelo (WACHÉ et al., 2003).

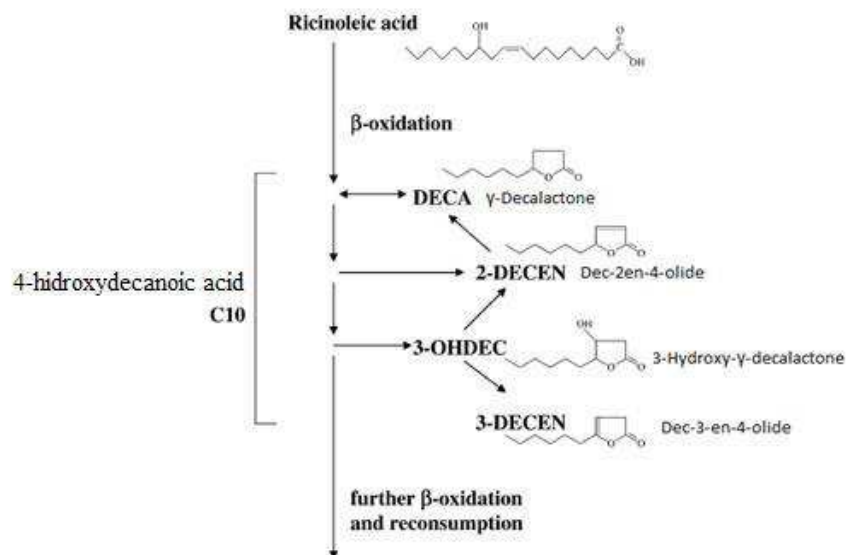


Figura 3 Via de degradação do ácido ricinoleico em várias lactonas. Adaptado de Waché et al. (2001)

As diferentes lactonas produzidas durante o processo de biotransformação são produzidas em níveis elevados, diminuindo a produtividade e complicando a extração de γ -decalactona. As atividades das enzimas da via são responsáveis por esses processos, pois o acúmulo de γ -decalactona, por exemplo, aumenta quando a atividade da acil-CoA-oxidase diminui (WACHÉ et al., 2001). Entretanto, na maioria das vezes, a regulação desta via em leveduras permanece incompreendida (AGUEDO et al., 2005).

Vários microrganismos, incluindo as leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida maltosa*, *Candida tropicalis* e *Yarrowia lipolytica*, foi identificada a presença da enzima acil-CoA oxidase, que catalisa o passo inicial da β -oxidação dos ácidos graxos nos peroxissomas (ALCHIHAB et al., 2010a). Alguns autores estudaram o modelo de degradação oxidativa ou ricinoleica, por

quatro diferentes cepas de *Sporidiobolus* sp., o qual produziu quantidades diferentes de γ -decalactona (BLIN-PERRIN et al., 2000).

A *Y. lipolytica* é uma levedura que exibe um alto rendimento na produção de γ -decalactona. Esta espécie possui genes POX1 a POX5 que codificam uma família de cinco acil-CoA oxidase (Aox1p a Aox5p), enzimas especializadas na degradação de substratos hidrofóbicos (PAGOT et al., 1997). A enzima acil-CoA oxidase, catalisa a primeira reação da β -oxidação, algumas das quais são específicas para a degradação de ácidos graxos de cadeias longas (Aox2p) (WANG et al., 1999) ou específicas de ácidos graxos de cadeias curtas (Aox3p) (LUO et al., 2000, 2002).

2.3 Fontes de carbono para a produção de γ -decalactona

2.3.1 Óleo de rícino

O óleo de rícino é um triacilglicerol, natural e não tóxico e pode ser obtido a partir das sementes da planta de rícino, *Ricinus communis* (mamona). É um óleo vegetal renovável, disponível comercialmente por conter hidroxilas funcionais, numa elevada percentagem de ácido graxo. Sendo este óleo utilizado na produção de γ -decalactona, é necessária a hidrolização de seus triglicerídios, a fim de liberar o ácido ricinoleico. Existem vários métodos descritos para promover a hidrólise, originando altas conversões (PUTHLI; RATHOD; PANDIT, 2006) (Figura 3).

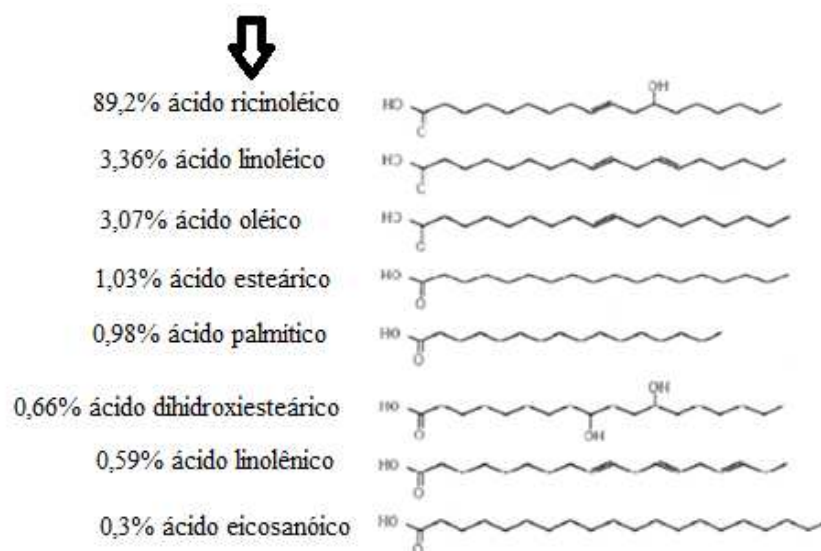


Figura 4 Composição do óleo de rícino. Adaptado de Lakshminarayana et al.(1984)

Normalmente, o ácido ricinoleico é produzido por saponificação seguida de acidificação. Embora as condições de reação sejam leves (70-100°C), o produto obtido tem odor e coloração inaceitáveis e elevada quantidade de subproduto, Na_2SO_4 , o que é difícil de remover. Os processos de produção de ácidos graxos à alta temperatura e alta pressão não são adequados para a hidrólise do óleo de rícino, uma vez que conduzem à formação de um produto indesejável chamado ácido ricinoleico estolide e podem causar a desnaturação do produto. Com isso, surge como uma alternativa a à hidrólise enzimática do óleo de rícino que pode ser utilizada com sucesso para superar as desvantagens dos métodos convencionais (GOSWAMI et al., 2009; RATHOD; PANDIT, 2009).

O ácido ricinoleico tem sido utilizado para várias aplicações, como pigmento de corante, dispersor em tintas de impressão, na indústria têxtil de acabamento e sabonetes de limpeza a seco. No entanto, seu principal uso é como intermediário químico para a produção de diversos óleos químicos. Os óleos são

ácido ricínico (ácido ricinoleico desidratado), ácido subérico (oxidação de ácido ricinoleico com HNO₃), ácido azeláico (ozonólise de ácido ricinoleico), metil ricinoleato e álcool ricinoleico, que são utilizados na preparação de emulsionantes, plastificantes e sabões (PUTHLI; RATHOD; PANDIT, 2006).

O efeito de diferentes concentrações de óleo de rícino para a produção de γ -decalactona por uma estirpe de *Yarrowia lipolytica* foi investigada em processo em batelada simples, verificando ser 30 g/L a concentração ótima do óleo. A hidrólise enzimática de óleo de rícino por lipases comerciais também foi estudada em diferentes condições de funcionamento. Lipozyme TL IM foi encontrada por ser mais eficaz e as condições de hidrólise ótimas foram pH 8 e 27 °C. A utilização de hidrolisado de óleo de rícino na produção de aromas permitiu uma diminuição na fase de latência para a secreção de γ -decalactona (GOMES et al., 2013).

2.3.2 Glicerol

Glicerol, também chamado de glicerina ou propano-1, 2, 3-triol, é um composto orgânico pertencente à função álcool, sendo obtido durante a transesterificação de óleos vegetais e gorduras animais (Figura 4). Pode ser produzido por via química ou fermentativa e sua produção é de baixa complexidade tecnológica, o que facilita seu uso. Apresenta uma infinidade de aplicações, podendo ser utilizado na indústria cosmética, farmacêutica, alimentícia e química (RAMOS et al., 2009; SOLOMON et al., 1995).

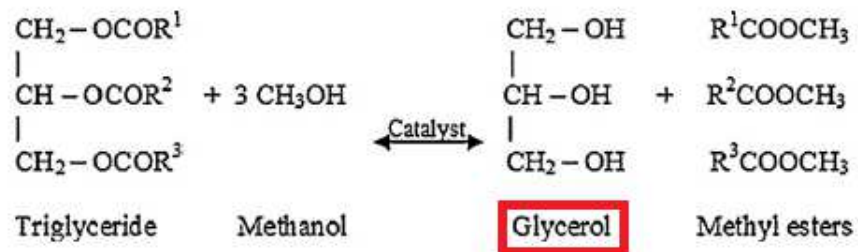


Figura 5 Equação geral para transesterificação de triglicerídeos. Adaptado de Meher, Sagar e Naik (2006)

O glicerol está presente em abundância em componentes estruturais de vários lipídios e na natureza. Pode ser utilizado naturalmente, por diversos microrganismos, como única fonte de carbono, durante o cultivo microbiano. É substituto dos tradicionais carboidratos, como glicose, sacarose e amido (SOLOMON et al., 1995). O estudo da caracterização e a identificação de microrganismos que tenham ótimo crescimento em glicerol e produzem metabólitos de interesse industrial são de grande importância, visando à descoberta de novas aplicações para o glicerol (SILVA; MACK; CONTIERO, 2009).

O glicerol bruto pode ser obtido como o principal resíduo da produção de biodiesel (Figura 5). Usualmente, apresenta de 55% a 90% de pureza e o restante consiste de triacilgliceróis não convertidos, metanol ou etanol, biodiesel, sabões e outros. A produção de biodiesel em grande escala gera um aumento na disponibilidade do glicerol, que pode ser usado na produção de biomassa, para suplementação na alimentação animal ou humana, agregando valor a este subproduto. A produção de biomassa também pode contribuir para a viabilidade econômica na produção de biodiesel (AMARAL et al., 2009; PAPANIKOLAOU et al., 2008).

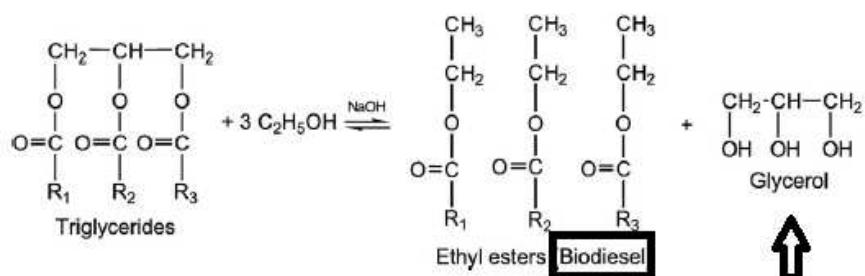


Figura 6 Glicerol obtido da produção de biodiesel. Adaptado de Silva, Mack e Contiero (2009)

O glicerol proveniente do biodiesel apresenta-se na forma de líquido viscoso pardo-escuro e é composto de 50% a 60% de glicerol, de 12% a 16% de álcalis, especialmente sob a forma de sabões alcalinos e hidróxidos, de 15% a 8% de metil ésteres, de 8% a 12% de metanol e de 2% a 3% de água. Além dos macronutrientes, o glicerol é composto por uma variedade de elementos traços (micronutrientes), sendo eles Ca, Mg, P, S, Zn e Fe. O aspecto do glicerol bruto está estreitamente relacionado ao conteúdo de sabão, que proporciona aparência de viscoso escuro (KOCISOVÁ; CVENGOS, 2006; OOI et al., 2004; THOMPSON; HE, 2006).

O aproveitamento do glicerol em processos biotecnológicos é devido ao alto custo de manipulação e de tratamento de efluentes de glicerol e águas de lavagem. Por não ser tóxico, irritante, sem cheiro e sabor, tem sido aplicado como conservante para alimentos e bebidas, na composição de cápsulas, anestésicos e xaropes, desodorantes e cosméticos, como lubrificante em máquinas processadoras de alimentos, na fabricação de tintas e resinas, e para amaciar e aumentar a flexibilidade das fibras têxteis (BORSCHIVER, 2006; FAIRBANKS, 2009).

A bioconversão do glicerol residual agrega valor significativo para a produtividade da indústria de biodiesel. Os processos de produção biotecnológica que utilizam esse composto demonstram ser uma nova fonte

promissora de carbono e energia, com muitas aplicações possíveis na microbiologia industrial (SILVA; MACK; CONTIERO, 2009).

O glicerol pode ser metabolizado por vários microrganismos. A espécie *Yarrowia lipolytica* é uma levedura que tem a capacidade de assimilar o glicerol. Estudos mostram que ela é capaz de produzir alguns compostos de interesse, a partir da biotransformação do glicerol residual, tais como surfactantes, lipídeos e ácidos orgânicos (AMARAL et al., 2009).

Vários microrganismos utilizam o glicerol como substrato para conversão em metabólitos de interesse industrial por vias biotecnológicas. Pode gerar 1,3-propanodiol por *Clostridium butyricum* (PAPANIKOLAOU et al., 2008), proteínas intracelulares e extracelulares por *Pichia pastoris* (GHOSALKAR; SAHAI; SRIVASTAVA, 2008), lipídios pela *Yarrowia lipolytica* (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2002; PAPANIKOLAOU et al., 2008) e *Mortierella isabellina* (PAPANIKOLAOU et al., 2008) e ácidos orgânicos, como o ácido cítrico, pela *Yarrowia lipolytica* (IMANDI et al., 2007; LEVINSON; KURTZMAN; KUO, 2007).

Gervais e Pécot (1991) avaliaram o acúmulo de γ -decalactona pela levedura *Sporidiobolus salmonicolor*, em baixa atividade de água. O glicerol puro, levulose e sorbitol foram comparados como agentes depressores da atividade de água. Estes autores verificaram que o crescimento das células em baixa atividade de água na presença do glicerol promoveu acúmulo do aroma.

Souza, Schwan e Dias (2014) verificaram o crescimento de quarenta leveduras em meio com glicerol bruto como fonte de carbono para a síntese de lipídeo e ácido cítrico microbial. Quatro leveduras, *Lindnera saturnus* CCMA 0243, *Yarrowia lipolytica* UFLA CM. 9.4, *Rhodotorula glutinis* NCYC 2439 e *Cryptococcus curvatus* NCYC 476, foram selecionadas, devido à capacidade de crescerem nesse substrato. A levedura *Yarrowia lipolytica* UFLA CM.9.4 foi

selecionada por manter a sua viabilidade celular em concentrações de 30% de glicerol bruto.

Além dos estudos para a produção de metabólitos, vários outros foram realizados para a produção de biomassa por diferentes leveduras como fonte de proteínas, substituindo as fontes de proteínas tradicionais, que apresentam alto custo. A levedura *Yarrowiali polytica* ACA-DC 50109, em meio suplementado com glicerol proveniente da síntese de biodiesel como principal fonte de carbono, produziu 7,1 g/L de biomassa (PAPANIKOLAOU et al., 2008).

REFERÊNCIAS

- AGUEDO, M. et al. Decalactone production by *Yarrowia lipolytica* under increased O₂ transfer rates. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 27, n. 20, p. 1617-1621, Oct. 2005.
- AGUEDO, M. et al. Impact of surfactants on the biotransformation of methyl ricinoleate into γ -decalactone by *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 29, n. 1/6, p. 31-36, June 2004.
- AGUEDO, M. et al. Increased electron donor and electron acceptor characters enhance the adhesion between oil droplets and cells of *Yarrowia lipolytica* as evaluated by a new cytometric assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 10, p. 3007-3011, 2003.
- ALCHIHAB, M. et al. Peroxisomal β -oxidation and production of γ -decalactone by the yeast *Rhodotorula aurantiaca*. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, Cluj-Napoca, v. 38, n. 2, p. 68-72, 2010a.
- ALCHIHAB, M. et al. Production d'arômes de type lactone par des levures. **Biotechnology, Agronomy and Society and Environment**, Gembloux, v. 14, n. 4, p. 681-691, 2010b.
- ALCHIHAB, M. et al. Production of γ -Decalactone by a Psychrophilic and a mesophilic strain of the yeast *Rhodotorula aurantiaca*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 158, n. 1, p. 41-50, July 2009.
- AMARAL, P. F. F. et al. Glycerol valorization: new biotechnological routes. **Food and Bioproducts Processing**, Davis, v. 87, n. 3, p. 179-186, 2009.
- BAKKER, B. M. et al. Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, Haren, v. 25, n. 1, p. 15-37, 2001.
- BLIN-PERRIN, C. et al. Metabolism of ricinoleic acid into γ -decalactone: β -oxidation and long chain acyl intermediates of ricinoleic acid in the genus *Sporidiobolus* sp. **Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 188, n. 1, p. 69-74, 2000.
- BORSCHIVER, S. Desafios da sustentabilidade. **Revista Brasileira de Engenharia Química**, São Paulo, v. 22, p. 24-25, 2006.

BRAGA, A.; BELO, I. Immobilization of *Yarrowia lipolytica* for aroma production from castor oil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 169, n. 7, p. 2202-2211, Apr. 2013.

BRAGA, A. et al. Aroma production by *Yarrowia lipolytica* in airlift and stirred tank bioreactors: differences in yeast metabolism and morphology. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 93, n. 15, p. 55-62, Jan. 2015.

BRAGA, A.; GOMES, N.; BELO, I. Lipase induction in *Yarrowia lipolytica* for castor oil hydrolysis and its effect on γ -Decalactone production. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Chicago, v. 89, n. 6, p. 1041-1047, June 2012.

BRENNA, E. Enzyme-mediated syntheses of chiral communication substances: fragrances for perfumery applications. **Current Organic Chemistry**, Hilversum, v. 7, n. 13, p. 1347-1367, 2003.

DONADIO, S. et al. Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 99, n. 3, p. 187-198, 2002.

ENDRIZZI, A.; AWADÉ, A. C.; BELIN, J. M. Presumptive involvement of methyl ricinoleate β -oxidation in the production of γ -decalactone by the yeast *Pichia guilliermondii*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 114, n. 2, p. 153-160, Dec. 1993.

FAIRBANKS, M. Glicerina. **Revista Química e Derivados**, São Paulo, n. 487, p. 1-12, 2009.

FERON, G. et al. Fatty acid accumulation in the yeast *Sporidiobolus salmonicolor* during batch production of γ -decalactone. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 149, n. 1, p. 17-24, 1997.

FERON, G. et al. Production, identification and toxicity of γ -decalactone and 4-hydroxydecanoic acid from *Sporidiobolus* spp. **Applied Environmental and Microbiology**, Clifton, v. 62, n. 8, p. 2826-2831, Aug. 1996.

FICKERS, P. et al. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. **FEMS Yeast Research**, New York, v. 5, n. 6/7, p. 527-543, 2005.

GATFIELD, I. L. Enzymatic and microbial generation of flavours. **Perfumer & Flavorist**, Wheaton, v. 20, p. 5-14, 1995.

GERVAIS, P.; PÉCOT, I. Osmotic accumulation of γ -decalactone by the yeast *Sporidiobolus salmonicolor*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 19, n. 2/3, p. 211-220, 1991.

GHOSALKAR, A.; SAHAI, V.; SRIVASTAVA, A. Optimization of chemically defined medium for recombinant *Pichia pastoris* for biomass production. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, n. 16, p. 7906-7910, 2008.

GOMES, N. et al. Impact of lipase-mediated hydrolysis of castor oil on γ -decalactone production by *Yarrowia lipolytica*. **Journal of the American Oil Chemistry Society**, Chicago, v. 90, n. 8, p. 1131-1137, Aug. 2013.

GOMES, N. et al. Oxygen mass transfer in a biphasic medium : Influence on the biotransformation of methyl ricinoleate into γ -decalactone by the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 35, n. 3, p. 380-386, 2007.

GOMES, N.; TEIXEIRA, J. A.; BELO, I. Fed-batch versus batch cultures of *Yarrowia lipolytica* for γ -decalactone production from methyl ricinoleate. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 34, n. 4, p. 649-654, Apr. 2012.

GOSWAMI, D. et al. Maximization of bioconversion of castor oil into ricinoleic acid by response surface methodology. **Bioresource Technology**, Essex, v. 100, n. 18, p. 4067-4073, 2009.

IMANDI, S. B. et al. Optimization of medium constituents for the production of citric acid from byproduct glycerol using Doehlert experimental design. **Enzyme Microbial and Technology**, New York, v. 40, n. 5, p. 1367-1372, 2007.

KAMZOLOVA, S. V. et al. Oxygen requirements for growth and citric acid production of *Yarrowia lipolytica*. **FEMS Yeast Research**, New York, v. 3, n. 2, p. 217-222, 2003.

KOCSISOVÁ, T.; CVENGOS, J. G-phase from methyl ester production-splitting and refining. **Petroleum and Coal**, Bratislava, v. 48, n. 2, p.1-5, June 2006.

KRINGS, U.; BERGER, R. G. Biotechnological production of flavours and fragrances. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Clifton, v. 49, n. 1, p. 1-8, Jan. 1998.

LAKSHMINARAYANA, G. et al. Characteristics and composition of newer varieties of Indian castor seed and oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 61, n. 12, p.1871-1872, Dec. 1984.

LEE, S. et al. Production of γ -decalactone from ricinoleic acid by immobilized cells of *Sporidiobolus salmonicolor*. **Process Biochemistry**, London, v. 33, n. 4, p. 453-459, 1998.

LEE, S.; LIN, S.; CHOU, C. Growth of and production of γ -decalactone by *Sporobolomyces odoratus* in jar fermentors as affected by pH, aeration and fed-batch technique. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 80, n. 2, p. 195-199, 1995.

LEVINSON, W. E.; KURTZMAN, C. P.; KUO, T. M. Characterization of *Yarrowia lipolytica* and related species for citric acid production from glycerol. **Enzyme Microbial and Technology**, New York, v. 41, n. 3, p. 292-295, 2007.

LIN, S.; LEE, S.; CHOU, C. Effects of various fatty acid components of castor oil on the growth and production of γ -decalactone by *Sporobolomyces odoratus*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 82, n. 1, p. 42-45, 1996.

LONGO, M. A.; SANROMÁN, M. A. Production of food aroma compounds: microbial and enzymatic methodologies. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 44, n. 3, p. 335-353, 2006.

LOPES, M. et al. *Yarrowia lipolytica* lipase production enhanced by increased air pressure. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 255-260, 2008.

LUO, Y. et al. The acyl-CoA oxidases from the yeast *Yarrowia lipolytica*: characterization of Aox2p. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 407, n. 1, p. 32-38, 2002.

LUO, Y. et al. Purification and characterization of the recombinant form of Acyl CoA oxidase 3 from the Yeast *Yarrowia lipolytica*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 384, n. 1, p. 1-8, 2000.

MADIGAN, M. et al. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160 p.

MEHER, L.C.; SAGAR, D.V.; NAIK, S.N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, New York, v. 10, n. 3, p. 248-268, June 2006.

NAGO, H.; MATSUMOTO, M.; NAKAI, S. 2-deceno-delta lactone producing fungi, strains of *Fusarium solani*, isolated by using a medium containing decano-delta-lactone as the sole carbon source. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v.57, n. 12, p.2107-2110, 1993.

NAJJAR, A. et al. Quantitative study of lipase secretion, extracellular lipolysis, and lipid storage in the yeast *Yarrowia lipolytica* grown in the presence of olive oil: analogies with lipolysis in humans. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 89, n. 6, p. 1947-1962, 2011.

NGUYEN, Q. et al. Metabolomics methods for the synthetic biology of secondary metabolism. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 586, n. 15, p. 2177-2183, 2012.

OKUI, S.; UCHIYAMA, M.; MIZUGAKI, M. Metabolism of hydroxy fatty acids: II., intermediates of the oxidative breakdown of ricinoleic acid by genus *Candida*. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 54, p. 536-540, 1963.

OOI, T. L. et al. Glycerol residue: a rich source of glycerol and medium chain fatty acids. **Journal of Oleo Science**, Athens, v. 53, n. 1, p. 29-33, 2004.

PAGOT, Y. et al. Utilization of an auxotrophic strain of the yeast *Yarrowia lipolytica* to improve gamma-decalactone production yields. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 25, n. 2, p. 113-116, Aug. 1997.

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

PAPANIKOLAOU, S. et al. Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: production of 1, 3-propanediol, citric acid and single cell oil. **Biomass & Bioenergy**, Oxford, v. 32, n. 1, p. 60-71, 2008.

PUTHLI, M. S.; RATHOD, V. K.; PANDIT, A. B. Enzymatic hydrolysis of castor oil: process intensification studies. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 31, n. 1, p. 31-41, 2006.

RAMOS, M. J. et al. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. **Bioresource Technology**, Essex, v. 100, n. 1, p. 261-268, 2009.

RATHOD, V. K.; PANDIT, A. B. Effect of various additives on enzymatic hydrolysis of castor oil. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 47, n. 1/3, p. 93-99, 2009.

ROMERO-GUIDO, C. et al. Biochemistry of lactone formation in yeast and fungi and its utilisation for the production of flavour and fragrance compounds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 89, n. 3, p. 535-547, Feb. 2011.

RYWINSKA, A. et al. Glycerol as a promising substrate for *Yarrowia lipolytica* biotechnological applications. **Biomass & Bioenergy**, Oxford, v. 48, p. 148-166, Jan. 2013.

SARIASLANI, F. S.; ROSAZZA, J. P. N. Biocatalysis in natural products chemistry. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 6, n. 6, p. 242-253, June 1984.

SCHRADER, J. et al. Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavour compounds: current industrial processes and future prospects. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 26, n. 6, p. 463-472, Mar. 2004.

SCHINDLER, J.; SCHMID, R.D. Fragrance or aroma chemicals: microbial synthesis and enzymatic transformation: a review. **Process Biochemistry**, London, v. 17, n. 5, p. 2-8, Sept. 1982.

SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, New York, v. 27, n. 1, p. 30-39, 2009.

SOLOMON, B. O. et al. Comparison of the energetic efficiencies of hydrogen and oxychemicals formation in *Klebsiella pneumoniae* and *Clostridium butyricum* during anaerobic growth on glycerol. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 39, n. 2, p. 107-117, Apr. 1995.

SOUZA, K. S. T.; SCHWAN, R. F.; DIAS, D. R. Lipid and citric acid production by wild yeasts grown in glycerol. **Journal Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 24, n. 4, p. 497-506, 2014.

SOUZA NETO, R.; PASTORE, G.; MACEDO, G. Biocatalysis and biotransformation producing γ -Decalactone. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 69, n. 9, p. 677-680, 2004.

TAHARA, S.; MIZUTANI, J. δ -Lactones produced by *Sporobolomyces odorosus*. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 39, n. 1, p. 281-282, 1975.

THOMPSON, J. C.; HE, B. B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. **Applied Engineering in Agriculture**, Saint Joseph, v. 22, n. 2, p. 261-265, Mar. 2006.

WACHÉ, Y. et al. Acyl-CoA oxidase, a key step for lactone production by *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 5, n. 1/4, p. 165-169, Sept. 1998.

WACHÉ, Y. et al. Catabolism of hydroxyacids and biotechnological production of lactones by *Yarrowia lipolytica*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 61, n. 5/6, p. 393-404, June 2003.

WACHÉ, Y. et al. Optimization of *Yarrowia lipolytica*'s Beta-oxidation pathway for gamma-decalactone production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 20, n. 2, p. 347-351, Dec. 2002.

WACHÉ, Y. et al. Role of β -Oxidation enzymes in γ -Decalactone production by the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**, Berlin, v. 67, n. 12, p. 5700-5704, 2001.

WANG, H. J. et al. Evaluation of Acyl coenzyme A oxidase (Aox) isozyme function in the n -Alkane-assimilating yeast *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 181, n. 17, p. 5140-5148, 1999.

XIE, J.; SUN, B.; YU, M. Constituents of top fragrance from fresh flowers of *Robinia Pseudoacacia* L. occurring in China. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 21, n. 5, p. 798-800, 2006.

ZHANG, Z.; ZENG, D.; LI, G. The study of the aroma profile characteristics of durian pulp during storage by the combination sampling method coupled with GC - MS. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 22, n. 1, p. 71-77, 2006.

ZHAO, Y. et al. A new rapid spectrophotometric quantitative determination method for γ -decalactone and application in high-throughput screening for γ -decalactone producing strains. **Food Science and Biotechnology**, New York, v. 23, n. 6, p. 1935-1940, Dec. 2014.

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

Produção de γ -decalactona por *Yarrowia lipolytica* CCMA 0242 e *Lindnera saturnus* CCMA 0243 em diferentes substratos e condições de produção

RESUMO

A γ -decalactona é um aromatizante utilizado como aditivo em alimentos. Esse composto é classificado como natural, quando obtido por produção biotecnológica utilizando microrganismos. O trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar diferentes condições para a produção de γ -decalactona por leveduras. No primeiro experimento, o glicerol bruto e o óleo de rícino foram avaliados como substratos em diferentes concentrações (10%, 20% e 30%), por meio de dois tipos de fermentação (batelada simples e batelada alimentada). As melhores condições para a produção de γ -decalactona no primeiro experimento foram selecionadas para avaliar os efeitos do pH e da agitação do meio de cultivo sob o crescimento e a produção de γ -decalactona pelas leveduras *Yarrowia lipolytica* CCMA 0242 e *Lindnera saturnus* CCMA 0243. A maior produção de γ -decalactona (75,8 mg/L) pela levedura *Y. Lipolytica* CCMA 0242 foi obtida quando 30% de óleo de rícino foram utilizados como substrato. O crescimento da levedura também foi maior quando o óleo de rícino foi utilizado. A produção do aroma não apresentou diferença em relação ao tipo de fermentação utilizada. A maior agitação do meio resultou em maior população de células de *L. saturnus* CCMA 0243. A maior produção de γ -decalactona (206,6 mg/L) foi obtida pela fermentação da *L. Saturnus* CCMA 0243. Os resultados sugerem que, nas condições avaliadas, o óleo de rícino apresentou melhores resultados para a produção de γ -decalactona. A levedura *L. saturnus* CCMA 0243 apresenta potencial para a produção de γ -decalactona por processos biotecnológicos.

Palavras-chave: γ -Decalactona microbiana. Glicerol bruto. Óleo de rícino. Leveduras.

ABSTRACT

γ -Decalactone is a flavoring, used as a food additive. This compound is classified as natural when obtained by biotechnological production using microorganisms. The objective of this work was to evaluate different conditions in the production of γ -decalactone by yeasts. In the first experiment, crude glycerol and castor oil were evaluated as substrate in different concentrations (10, 20 and 30%) using two fermentation processes (simple batch and fed-batch). The best conditions for the production of γ -decalactone in the first experiment were selected to evaluate the effects of pH and agitation of the culture media on the growth and production of γ -decalactone by yeasts *Yarrowia lipolytica* CCMA 0242 and *Lindnera saturnus* CCMA 0243. Yeast *Y. lipolytica* CCMA 0242 highest production of γ -decalactone (75.8mg/L) was obtained when 30% of castor oil was used as substrate. When castor oil was used, the yeast growth was also higher. There was no aroma production difference in relation to the fermentation process. A higher agitation resulted in a higher population of cells of *L. saturnus* CCMA 0243. An increasing production of γ -decalactone (206.6 mg/L) was obtained by *L. saturnus* CCMA 0243 fermentation. The results suggest that under these conditions, castor oil showed better results for the production of γ -decalactone. Yeast *L. saturnus* CCMA 0243 shows potential for the production of γ -decalactone by biotechnological processes.

Keywords: Microbial γ -decalactone. Crude glycerol. Castor oil. Yeasts

1 INTRODUÇÃO

As lactonas são formadoras de aromas que podem ser obtidos diretamente a partir de frutas ou por métodos químicos. A produção de aromas por síntese química está associada a vários problemas, tais como baixo rendimento, formação de subprodutos, processos prejudiciais ao meio ambiente, reações secundárias e geração de misturas racêmicas indesejáveis (LONGO; SANROMÁN, 2006). Devido à preferência dos consumidores por aromas naturais, em relação aos produtos análogos obtidos por síntese química, os processos biotecnológicos por meio do cultivo de microrganismos têm sido utilizados como uma alternativa para a produção de aromas naturais (AN; OH, 2013; ROMERO-GUIDO et al., 2011).

A γ -decalactona, entre as lactonas, é a mais produzida e apresenta aroma frutado de pêssago, aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), como aditivo em alimentos, razão do grande interesse em sua produção biotecnológica. O ácido ricinoleico (ácido 12-hidroxi-octadec-9-enoico) é utilizado como substrato na maioria dos processos de produção de γ -decalactona (MORADI; ASADOLLAHI; NAHVI, 2013; SCHRADER et al., 2004). Esse ácido graxo é transformado em γ -decalactona por estirpes de leveduras, pela via da β -oxidação peroxissomal. O ácido ricinoleico é um ácido graxo C_{18} hidroxilado que, na sua forma esterificada, é o principal constituinte (cerca de 86 %) do óleo de rícino (GOMES; TEIXEIRA; BELO, 2010; PUTHLI; RATHOD; PANDIT, 2006). Além de ser um processo natural, outra vantagem da produção de lactona microbiana é que esta apresenta a mesma configuração enantiomérica da lactona que é encontrada em pêssagos e outras frutas (SERRA; FUGANTI; BRENNAN, 2005).

Outro substrato utilizado na produção de metabólitos de interesse industrial é o glicerol bruto, um subproduto gerado na produção do biodiesel que

está sendo fonte de carbono alternativa nos processos biotecnológicos (SILVA; MACK; CONTIERO, 2009). Os processos de fermentação microbiana utilizam o glicerol bruto como substrato, devido à sua ampla disponibilidade e custo competitivo (CHATZIFRAGKOU et al., 2011).

Durante o processo fermentativo, as lactonas podem apresentar efeito tóxico contra as células que as produzem, podendo ocorrer inibição do crescimento celular e limitação da taxa de produção (AGUEDO et al., 2005; PAGOT et al., 1997; WACHÉ et al., 2003). No cultivo em batelada simples, após algumas horas de fermentação, as leveduras podem utilizar a γ -decalactona como fonte de carbono, quando o substrato é completamente consumido, resultando no seu completo desaparecimento do meio (PAGOT et al., 1997). Uma alternativa a esse problema é a produção utilizando batelada alimentada, na qual o substrato é repostado no meio de produção. Esta operação permite alcançar maior densidade de células do que a fermentação em batelada simples e é utilizada para obter altos rendimentos e produtividades do produto desejado, por meio do controle da alimentação de nutrientes (LEE et al., 1999).

A *Yarrowia lipolytica* é a leveduramais utilizada para a biotransformação do ácido ricinoleico em γ -decalactona, apresentando maior rendimento devido à capacidade de crescer em substratos hidrofóbicos, graças às suas lipases eficientes, numerosos citocromos P450 e acil-CoA oxidase (WACHÉ et al., 2003). Não foram encontrados, na literatura, relatos da utilização da levedura *Lindnera saturnus* para a produção de γ -decalactona. Portanto, a utilização de nova cepa de *Yarrowia lipolytica* e nova espécie de levedura pode ser uma alternativa para produção do aroma.

Além da fonte de carbono e de sua concentração, diversos outros fatores exercem influência durante o processo fermentativo para a produção de biometabólitos primários e secundários. Para o crescimento de leveduras, assim como para a produção de γ -decalactona, os valores de pH e a agitação do meio

podem interferir na fermentação. A variação do pH afeta a ionização do substrato e das lipases livres (TIPTON; DIXON, 1979). A *Y. lipolytica* pode regular o pH intracelular em diferentes pH ambientais, pois este parâmetro pode modificar alguns fluxos intracelulares e a atividade das enzimas da β -oxidação, indiretamente, poderia ser afetada (GOMES; TEIXEIRA; BELO, 2011).

Os objetivos, neste trabalho, foram: 1º) avaliar o crescimento e a produção de γ -decalactona pela levedura *Yarrowia lipolytica* CCMA 0242, utilizando glicerol bruto residual da produção de biodiesel e óleo de rícino (fonte de ácido ricinoleico) como substrato em diferentes concentrações (10%, 20% e 30%) por meio de fermentação em batelada simples e em batelada alimentada e 2º) avaliar o crescimento e a produção de γ -decalactona pelas leveduras *Yarrowia lipolytica* CCMA 0242 e *Lindnera saturnus* CCMA 0243, em diferentes valores de pH e agitação.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Microrganismos

Duas leveduras, *Yarrowia lipolytica* CCMA0242 e *Lindnera saturnus* CCMA 0243, pertencentes à coleção do Laboratório de Fisiologia e Genética de Microrganismos, no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG, foram utilizadas neste trabalho.

2.2 Condições de cultivo e preparo do inóculo

As leveduras foram, inicialmente, reativadas, transferindo-se uma alíquota da cultura estoque em glicerol 20% para tubo de ensaio, contendo meio líquido YEPG (10 g/L extrato de levedura; 20 g/L peptona bacteriológica e 20 g/L glicose) que foi mantida a 28 °C/48 horas. Após esse período, 10% do inóculo inicial foram transferidos para volumes maiores, até atingirem um volume final de 200 mL. Foram mantidos nas mesmas condições e a 150 rpm, até o final da fase de crescimento exponencial. Quando esta fase foi atingida, todo o conteúdo foi centrifugado, a 4°C, a 6000 rpm, por 5 minutos e as células foram lavadas três vezes com água estéril antes de serem colocadas no novo meio para biotransformação (GOMES; TEIXEIRA; BELO, 2010).

2.3 Biotransformação

As leveduras foram ressuspensas e inoculadas no meio de biotransformação. O cultivo foi realizado em Erlenmeyer com 50 mL do meio *yeast nitrogen base*, YNB (Himedia) (6,7g/L), NH₄Cl (2,5g/L)

(Reagen/Quimibras) e Tween 80 (2g/L) (Amresco). Foram acrescentados separadamente glicerol bruto (Biodiesel) e óleo de rícino (Sigma Aldrich).

O cultivo em batelada simples e em batelada alimentada ocorreu à temperatura e agitação constantes de 29°C e 150 rpm, respectivamente. O valor do pH foi ajustado pela adição de NaOH (2M) e HCl (2M). Os cultivos foram mantidos por 120 horas, sendo retiradas as amostras necessárias para posteriores análises. Na avaliação do cultivo em batelada alimentada, a cada 18 horas após a inoculação foi realizada a alimentação com 125µL de óleo de rícino ou 125µL de glicerol bruto (MORADI; ASADOLLAHI; NAHVI, 2013).

2.4 Avaliação da produção de γ -decalactona

Após o processo de biotransformação, foram retiradas do meio amostras de 2 mL de cada condição de fermentação analisada. Para a quantificação total de γ -decalactona, o pH foi ajustado para 2, com HCl concentrado, para promover a lactonização total do ácido 4-hidroxicanoico (BRAGA; GOMES; BELO, 2012; GOMES et al., 2011). A γ -decalactona foi extraída do meio de biotransformação por éter dietílico (pureza 99,9% Sigma). Esta extração líquido/líquido foi realizada adicionando-se 2 mL de éter dietílico à amostra contida num frasco (tubo falcon de 15 mL), sendo invertido sessenta vezes seguidas para promover uma eficiente mistura. Após a completa separação das fases líquidas, a fase orgânica foi retirada e injetada no cromatógrafo gasoso (GC).

As amostras extraídas foram injetadas no cromatógrafo GC-17A, Shimadzu, com detector de ionização de chama, injetor split/splitless e uma coluna capilar, modelo DB-WAX (comprimento 30 m, diâmetro e espessura do filme 0,25 µm), com o N₂ como carreador gasoso num fluxo de 1.2 mL/min (GOMES; TEIXEIRA; BELO, 2010). A temperatura do injetor foi de 200°C e a

do detector, de 250 °C. A temperatura do forno foi mantida em 60°C por 3 minutos, aumentou para 200°C, numa razão de 20°C por minuto e, depois permaneceu em 200°C por 10 minutos. Os dados foram analisados por meio do programa de aquisição e integração GC - class, versão 2.5, da Shimadzu e comparados com a curva padrão previamente obtida para o composto γ -decalactona.

2.5 Contagem de células viáveis

A contagem de células foi realizada com o auxílio de uma câmara de Neubauer em microscópio óptico com aumento de 400x, utilizando o corante azul de metileno (azul de metileno, 0,01% m/v e citrato de sódio, 2% m/v). O cálculo, em cel/ml, foi obtido pela seguinte equação (DIAS; SCHWAN, 2010):

$$\text{Cel/mL} = \frac{\sum nq \times 25 \times fd \times 10^4}{n}$$

em que $\sum nq$ - soma algébrica do número de células viáveis contadas nos quadriculados; **25** - número total de quadriculados na câmara; **fd** - fator de diluição utilizado referente ao preparo da amostra com solução de azul de metileno; **10⁴** - constante da câmara que se refere ao inverso do volume do quadrante central utilizado para contagem; **n** - número de quadriculados contados, dentre os 25 disponíveis.

2.6 Experimento 1 - Crescimento e produção de γ -decalactona por *Yarrowia lipolytica* CCMA 0242, em diferentes fontes de carbono e condições de cultivo

O crescimento e a produção de γ -decalactona pela levedura *Yarrowia lipolytica* CCMA0242 foram avaliados em um arranjo fatorial ($2 \times 3 \times 2$), totalizando 12 combinações, sendo 2 (glicerol bruto e óleo de rícino) \times 3 (diferentes concentrações dos substratos – 10%, 20% e 30%) \times 2 (fermentação em batelada simples e batelada alimentada). Para a avaliação do crescimento foram retiradas amostras após 24, 48, 72, 96 e 120 horas de fermentação. O experimento foi conduzido em um delineamento de blocos ao acaso, com três blocos, sendo cada bloco diferentes períodos de condução do experimento. A fermentação foi conduzida à temperatura de 29°C, o pH do meio foi corrigido para 6 e a agitação foi de 150 rpm.

Os resultados do crescimento da levedura (número de células após cada período de crescimento) foram avaliados pelo seguinte modelo: $Y_{ijklm} = \mu + B_i + S_j + C_k + F_l + B(S \times C \times F)_{jkl} + T_m + (S \times C)_{jk} + (S \times F)_{jl} + (S \times T)_{jm} + (C \times F)_{kl} + (C \times T)_{km} + (F \times T)_{lm} + (S \times C \times F)_{jkl} + (S \times C \times T)_{jkm} + (S \times F \times T)_{jlm} + (C \times F \times T)_{klm} + \varepsilon_{ijklm}$, sendo μ = média geral; B_i = efeito de bloco ($i = 1-3$); S_j = efeito de substrato (j = glicerol bruto ou óleo de rícino); C_k = efeito da concentração dos substratos ($k = 10\%$, 20% ou 30%); F_l = efeito do tipo de fermentação ($l =$ batelada simples ou batelada alimentada); $B(S \times C \times F)_{jkl}$ = erro experimental (considerando a interação entre substrato, concentração e tipo de fermentação em cada bloco) usado para testar os efeitos do substrato da concentração e do tipo de fermentação, independentemente e identicamente distribuído em uma distribuição normal com média zero e variância σ^2 ; T_m = efeito do tempo de crescimento ($m = 24, 48, 72, 96$ e 120 horas); $(S \times C)_{jk}$ = efeito da interação entre substrato e concentração; $(S \times F)_{jl}$ = efeito da interação entre substrato e

fermentação; $(S \times T)_{jm}$ = efeito da interação entre substrato e tempo; $(C \times F)_{kl}$ = efeito da interação entre concentração e fermentação; $(C \times T)_{km}$ = efeito da interação entre concentração e tempo; $(F \times T)_{lm}$ = efeito da interação entre fermentação e tempo; $(S \times C \times F)_{jkl}$ = efeito da interação entre substrato, concentração e tempo; $(S \times C \times T)_{jkm}$ = efeito da interação entre substrato, concentração e tempo; $(S \times F \times T)_{jlm}$ = efeito da interação entre substrato, fermentação e tempo; $(C \times F \times T)_{klm}$ = efeito da interação entre concentração, fermentação e tempo; ε_{ijklm} = erro experimental independentemente e identicamente distribuído em uma distribuição normal com média zero e variância σ^2 .

Para avaliação da produção de γ -decalactona, amostras foram coletadas após 120 horas de fermentação. Os dados de produção foram analisados por um modelo contendo efeitos fixos de substrato, concentração e tipo de fermentação. Em todas as análises estatísticas o teste de Tukey foi utilizado para comparar as médias por meio do software SISVAR®.

2.7 Experimento 2 - Influência do pH e da agitação do meio de cultivo sobre o crescimento e a produção de γ -decalactona por *Yarrowia lipolytica* CCMA0242 e *Lindnera saturnus* CCMA 0243

As melhores condições para a produção de γ -decalactona avaliadas no primeiro experimento foram selecionadas para avaliar os efeitos do pH e da agitação do meio de cultivo sob o crescimento da *Yarrowia lipolytica* CCMA 0242 e *Lindnera saturnus* CCMA 0243. A produção de γ -decalactona pelas duas leveduras nessas diferentes condições foi comparada.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Os tratamentos foram dispostos em um arranjo fatorial $(2 \times 2 \times 2)$, totalizando 8 combinações, sendo 2 leveduras (*Yarrowia*

lipolytica e *Lindnera saturnus*) \times 2 valores de pH (5,0 e 6,0) \times 2 agitações (150 e 200 rpm). Para a avaliação do crescimento foram retiradas amostras após 24, 48, 72, 96 e 120 horas de fermentação. A fermentação em batelada simples foi conduzida à temperatura de 29 °C e, como substrato, foi utilizado óleo de rícino 30%. Os resultados do crescimento (número de células após cada período de crescimento) foram avaliados separadamente para cada levedura, pelo seguinte modelo: $Y_{jkl} = \mu + P_j + A_k + R(P \times A)_{jk} + T_l + (P \times A)_{jk} + (P \times T)_{jl} + (A \times T)_{kl} + (P \times A \times T)_{jkl} + \epsilon_{jkl}$, sendo μ = média geral; P_j = efeito de pH ($j = 5$ ou 6); A_k = efeito da agitação ($k = 150$ ou 200 rpm); $R(P \times A)_{jk}$ = erro experimental (considerando a interação entre pH e agitação em cada repetição) usado para testar os efeitos do pH e da agitação, independentemente e identicamente distribuído em uma distribuição normal com média zero e variância σ^2 ; T_l = efeito do tempo de crescimento ($l = 24, 48, 72, 96$ e 120 horas); $(P \times A)_{jk}$ = efeito da interação entre pH e agitação; $(P \times T)_{jl}$ = efeito da interação entre pH e tempo; $(A \times T)_{kl}$ = efeito da interação entre agitação e tempo; $(P \times A \times T)_{jkl}$ = efeito da interação entre pH, agitação e tempo; ϵ_{jkl} = erro experimental independentemente e identicamente distribuído em uma distribuição normal com média zero e variância σ^2 .

Para a avaliação da produção de γ -decalactona, amostras foram coletadas após 120 horas de fermentação. Os dados de produção foram analisados por um modelo contendo efeitos fixos de espécie de levedura, pH e agitação. Em todas as análises estatísticas, o teste de Tukey foi utilizado para comparar as médias por meio do software SISVAR®.

3 RESULTADOS

3.1 Experimento 1

3.1.1 Crescimento durante o processo de biotransformação

Sob as condições avaliadas no primeiro experimento, o crescimento celular da *Yarrowia lipolytica* CCMA 0242 diferiu quanto ao substrato, ao tipo de fermentação e ao tempo de fermentação (Tabela 1). As interações entre o substrato e a concentração utilizada e entre o substrato e o tempo de fermentação explicam o crescimento dessa levedura nas condições avaliadas (Tabela 1).

Tabela 1 Experimento 1 – Probabilidade dos efeitos do modelo estatístico para o crescimento da levedura *Yarrowia lipolytica* CCMA 0242

P													
F	S	C	T	FxS	FxC	FxT	SxC	SxT	CxT	FxSxC	FxSxT	FxCxT	SxCxT
0,03	<0,01	0,23	<0,01	0,87	0,27	0,19	<0,01	0,01	0,77	0,14	0,24	0,64	0,44

*F= fermentação, S= substrato, C= concentrações e T= tempo

O crescimento da *Y. lipolytica* CCMA 0242 foi maior em óleo de rícino, quando comparado com o crescimento em glicerol (Figura 1, Tabela 2). Essa diferença foi evidenciada nas primeiras 24 horas de crescimento, quando, em glicerol, o crescimento foi de 6,7% e, em óleo de rícino, de 8,4%, de 0 até 24 horas. A população da levedura atingiu a fase estacionária após 96 horas, quando cultivada em óleo de rícino e após 48 horas, quando cultivada em glicerol (Figura 1).

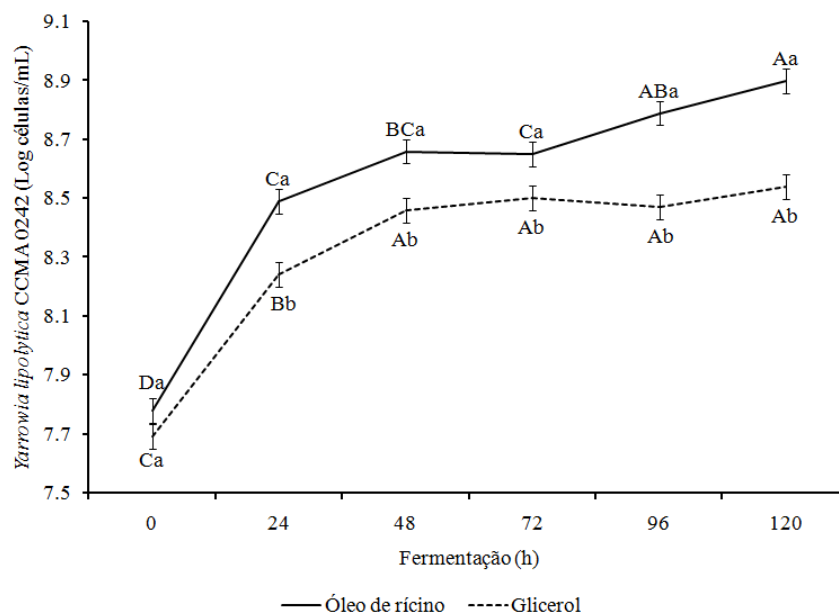


Figura 1 Experimento 1 – Interação entre os efeitos do tempo de fermentação e do substrato utilizado sobre o crescimento da levedura *Yarrowia lipolytica* CCMA 0242. Para um mesmo substrato nos diferentes tempos avaliados, médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Para um mesmo tempo de avaliação, médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). As barras representam o erro padrão das médias

O crescimento da *Y. Lipolytica* CCMA 0242 em 10%, 20% ou 30% de óleo de ricino não foi diferente (média de 8,54 Log células/mL) (Tabela 2). Em glicerol, o crescimento dessa levedura foi maior (8,41 Log células/mL), quando a menor concentração foi utilizada (Tabela 2).

Tabela 2 Experimento 1 – Análise da população da levedura *Yarrowia lipolytica* CCMA 0242 nas diferentes concentrações dos substratos (óleo de rícino e glicerol)

	Concentração			EPM
	10%	20%	30%	
	Log células/mL			
Óleo de rícino	8,50Aa	8,56Aa	8,57Aa	0,029
Glicerol	8,41Ab	8,26Bb	8,28Bb	

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si. Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si

O crescimento da levedura diferiu ($P < 0,03$) quanto aos processos de fermentação (Tabela 1). A população da levedura na fermentação em batelada alimentada (8,46 Log células/mL) foi maior do que na fermentação em batelada (8,40 Log células/mL).

3.1.2 Produção de γ -decalactona

Não houve diferença significativa ($P = 0,42$) entre a fermentação em batelada simples (18,96 mg/L) e em batelada alimentada (26,41 mg/L) sobre a produção de γ -decalactona (Tabela 3).

Tabela 3 Experimento 1 – Interação entre os efeitos da concentração do óleo rícino e do glicerol bruto sobre a produção (mg/L) de γ -decalactona pela levedura *Yarrowia lipolytica* CCMA 0242

<i>P</i>						
Fermentação	Substrato	Concentração	FxS	FxC	SxC	SxCxF
0,42	<0,01	0,08	0,33	0,17	0,06	0,23
Substrato	Concentração			EPM		
	10	20	30			
Óleo de rícino	27,8 Ba	29,3 Ba	75,8 Aa	11,205		
Glicerol	2,5 Aa	0,41 Aa	0,32 Ab			

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si. Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si

Tanto o óleo de rícino quanto o glicerol bruto possibilitaram a produção de γ -decalactona pela levedura *Y. Lipolytica* CCMA 0242 (Tabela 3). Entretanto, a produção de γ -decalactona pela levedura inoculada em meio com 30% óleo de rícino (75,8 mg/L) foi 30 vezes maior do que com glicerol bruto (2,5 mg/L). Analisando-se a produção do aroma em relação à concentração de células no meio, nas mesmas condições de substrato e dose (Tabelas 2 e 3), constatou-se que a maior produção foi alcançada com o maior número de células, para os dois substratos utilizados.

A produção de γ -decalactona em meio suplementado com óleo de rícino na concentração de 30% foi, aproximadamente, 2,5 vezes maior (75,8 mg/L) do que nas demais concentrações, 10% e 20% (27,8 mg/L e 29,3 mg/L, respectivamente) (Tabela 3). Na fermentação em glicerol 10%, a produção foi, aproximadamente, 6 vezes maior (2,5 mg/L), quando comparada com a produção nas concentrações de 20% e 30% (0,41 mg/L e 0,32 mg/L, respectivamente) (Tabela 3).

De acordo com os resultados, as melhores condições para a produção de γ -decalactona, entre as possibilidades avaliadas, foram com o óleo de rícino na concentração de 30%, em cultivo em batelada simples. Essas melhores condições selecionadas foram utilizadas para avaliar os efeitos do pH e da velocidade de agitação do meio sobre o crescimento e a produção de γ -decalactona pelas leveduras *Y. Lipolytica* CCMA 0242 e *L. saturnus* CCMA 0243.

3.2 Experimento 2

3.2.2 Crescimento durante o processo de biotransformação

Sob as condições avaliadas, o crescimento da *Y. Lipolytica* CCMA 0242 diferiu durante o período de fermentação avaliado (Tabela 4). O crescimento

máximo dessa levedura foi observado após as primeiras 24 horas, seguido de uma pequena redução e se mantendo até o final da avaliação (Figura 2).

As interações entre o pH e o tempo de fermentação e entre a agitação e o tempo de fermentação modificaram o crescimento dessa levedura ($P < 0,01$). A interação entre o pH e o tempo de fermentação foi, principalmente, marcante nas primeiras 48 horas de crescimento, quando foi observado um maior crescimento da *Y. Lipolytica* CCMA 0242 no meio de pH 6 (Figura 2A). Após a avaliação com 48 horas de fermentação, a população de leveduras não foi diferente nos dois valores de pH. De forma similar, a interação entre a velocidade de agitação do meio e o tempo de fermentação ocorreu nas primeiras 72 horas. No início da biotransformação, a maior velocidade de agitação do meio (200 rpm) resultou em um crescimento da *Y. Lipolytica* CCMA 0242 4,9% maior que na menor velocidade (150 rpm) (Figura 2B). Na avaliação com 72 horas, a menor velocidade de agitação resultou em um maior crescimento; apesar da diferença estatística, a diferença numérica foi pequena, 8,32 e 8,13 Log células/mL, na agitação de 150 e 200 rpm, respectivamente.

Tabela 4 Experimento 2 – Probabilidade dos efeitos do modelo estatístico para o crescimento das leveduras *Yarrowia lipolytica* CCMA 0242 e *Lindnera saturnus* CCMA 0243

Variável	P						
	pH	Agitação (A)	Tempo (T)	pHxA	pHxT	AxT	pHxAxT
<i>Yarrowia lipolytica</i> CCMA 0242	0,74	0,76	<0,01	0,31	<0,01	<0,01	0,30
<i>Lindnera saturnus</i> CCMA 0243	0,41	<0,01	<0,01	0,83	0,86	0,25	0,74

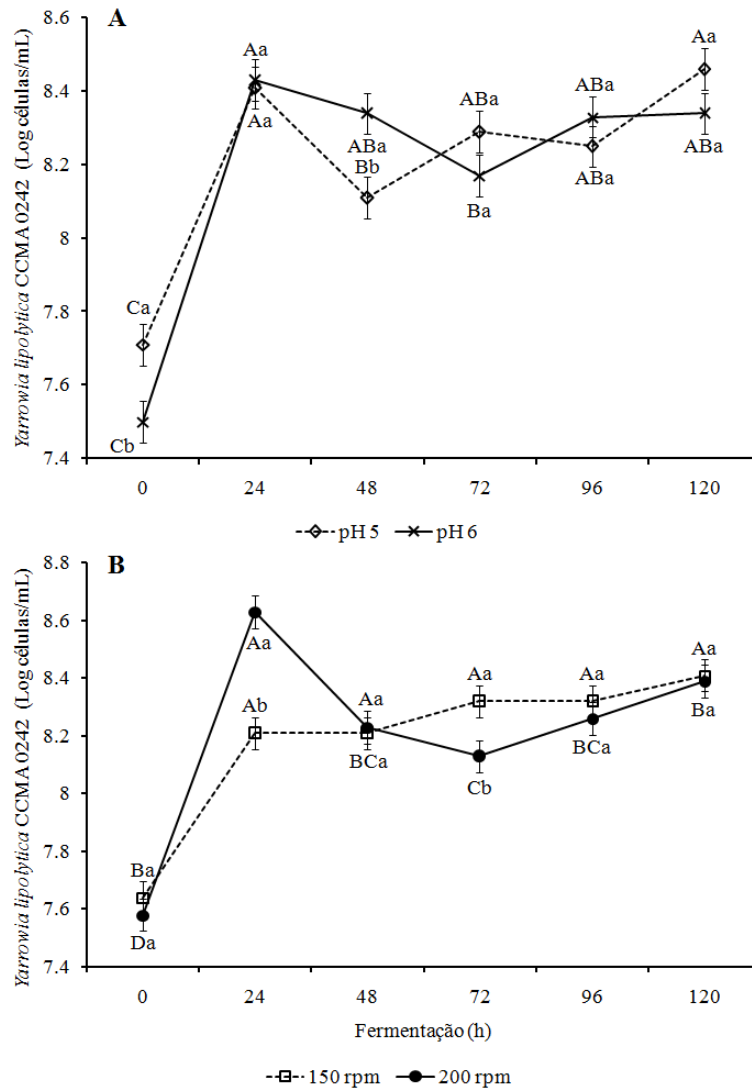


Figura 2 Experimento 2 Interação entre os efeitos do tempo de fermentação e pH (A) e do tempo de fermentação e agitação (B) sobre o crescimento da levedura *Yarrowia lipolytica* CCMA 0242. Para um mesmo pH e agitação nos diferentes tempos avaliados, médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Para um mesmo tempo de avaliação, médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). As barras representam o erro padrão das médias

O crescimento máximo da levedura *L. saturnus* CCMA 0243 ocorreu após 24 horas de fermentação ($P < 0,01$, para o efeito de tempo de fermentação) (Figura 3). Após 120 horas, a população atingiu 9 log de células/mL, entretanto, não foi diferente, estatisticamente, do crescimento com 24, 48, 72 ou 96 horas. As diferentes condições de agitação também modificaram o crescimento dessa levedura ($P < 0,01$) (Tabela 4). A população da levedura *L. saturnus* CCMA 0243 (8,87 Log células/mL) inoculada na maior velocidade de agitação (200 rpm) foi 1,6% maior, quando comparado com a população (8,73 Log células/mL) de menor velocidade de agitação (150 rpm).

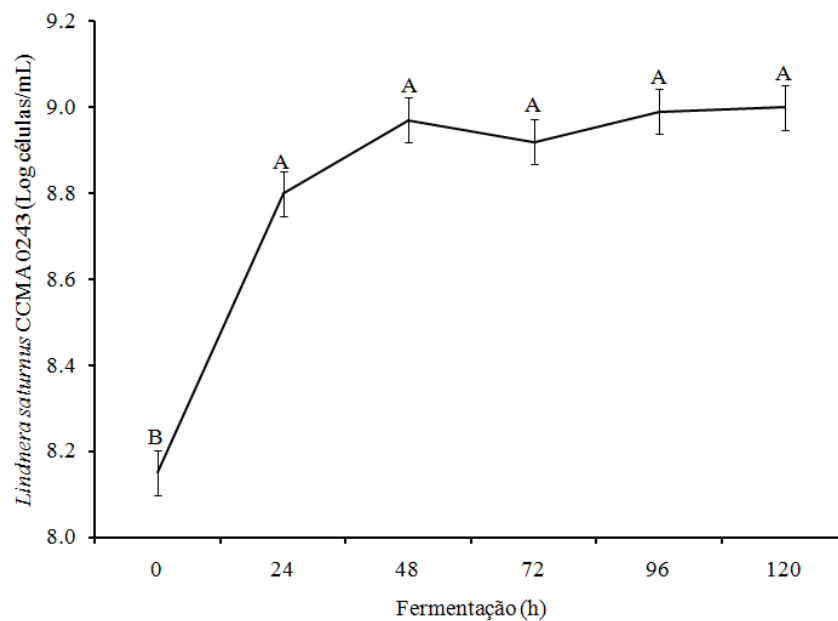


Figura 3 Experimento 2 Crescimento da levedura *Lindnera saturnus* UFLA CESH677, durante o tempo de fermentação. Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

3.2.3 Produção de γ -decalactona por diferentes espécies de leveduras

As diferentes espécies de leveduras diferiram quanto à produção de γ -decalactona ($P < 0,01$) (Tabela 5). A produção de γ -decalactona pela levedura *L. saturnus* CCMA 0243 (206,6 mg/L) foi 1,97 vezes maior, quando comparada com a produção da levedura *Y. lipolytica* CCMA 0242 (104,7 mg/L). Não houve diferença na produção de γ -decalactona resultante dos diferentes valores de pH e agitação utilizados no meio de biotransformação (Tabela 5).

Tabela 5 Experimento 2 – Produção (mg/L) de γ -decalactona pela levedura *Yarrowia lipolytica* CCMA 0242 e *Lindnera saturnus* CCMA 0243, nos diferentes valores de pH e agitação

<i>P</i>						
Levedura	pH	Agitação	LxpH	LxA	pHxA	LxpHxA
< 0,01	0,75	0,36	0,82	0,70	0,45	0,67
Variável					γ -Decalactona	EPM
Levedura	<i>Yarrowia lipolytica</i> CCMA 0242			104,7 b		
	<i>Lindnera saturnus</i> CCMA 0243			206,6 a		
pH	5			149,8		25,18
	6			161,5		
Agitação	150			138,8		
	200			172,5		

4 DISCUSSÃO

O melhor crescimento da *Y.lipolytica* CCMA 0242 foi resultante da fermentação com óleo de rícino na maior concentração avaliada (30%). O ácido ricinoleico, principal componente desse óleo, é um dos substratos mais utilizados para bioprodução de γ -decalactona (BRAGA; BELO, 2014; ORKUI; UCHIYAMA; MIZUGAKI, 1963). O crescimento dessa levedura em glicerol foi maior quando a menor concentração (10%) foi utilizada. As maiores concentrações de glicerol podem ter exercido um efeito tóxico sobre as células. O glicerol bruto apresenta impurezas, podendo ser encontrado, em sua composição, metanol, que pode prejudicar o crescimento de algumas espécies de leveduras.

O crescimento da população de *Y. lipolytica* CCMA 0242 cultivada na fermentação em batelada alimentada foi maior, comparado com o obtido na batelada. A fermentação em batelada alimentada previne o efeito tóxico do substrato e do produto para as células por meio do controle da alimentação de nutrientes (LEE et al., 1999).

Durante a avaliação da influência do pH e da agitação sobre o crescimento, as populações de *Y.lipolytica* CCMA 0242 e da *L. saturnus* CCMA 0243 cultivadas em óleo de rícino apresentaram rápido crescimento nas primeiras horas de cultivo. Esses resultados corroboram os obtidos por Lee, Lin e Chou (1995), ao avaliarem a população de *Sporobolomyces odorus*, cultivada com ácido ricinoleico. Os autores observaram um aumento populacional nas primeiras 72 horas de cultivo e estabilização no crescimento, até o final da fermentação (168h). O maior valor de pH (6) e de agitação (200 rpm) favoreceu o crescimento das cepas de leveduras avaliadas.

No cultivo da *Y. lipolytica* CCMA 0242 suplementada com glicerol bruto, a produção de γ -decalactona (2,5 mg/L) apresentou baixo rendimento. O

glicerol bruto não apresentou potencial, como substrato, para a produção do aroma pela levedura *Y. lipolytica* CCMA 0242. O glicerol bruto não foi anteriormente avaliado como substrato para a produção de γ -decalactona. No entanto, em outros trabalhos avaliou-se a utilização de glicerol bruto como suplemento nutricional para a levedura *Yarrowia lipolytica*. Este subproduto foi substrato para a síntese de vários produtos metabólicos de interesse industrial, entre eles, lipídeos e ácidos orgânicos (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2002; SOUZA; SCHWAN; DIAS, 2014). A cepa *Y. lipolytica* CCMA 0242, utilizada neste trabalho, provavelmente transformou o substrato em outros metabólitos (lipídeos ou ácido cítrico) ou utilizou-o como fonte de carbono para o seu crescimento. De acordo com Silva, Mack e Contiero (2009), o glicerol bruto pode ser utilizado pelos microrganismos como única fonte de carbono, substituindo os tradicionais carboidratos.

A produção da γ -decalactona na fermentação em óleo de rícino foi trinta vezes maior, quando comparada com a produção em glicerol bruto. Na maioria dos meios de cultivo, o óleo de rícino é o substrato mais apropriado e utilizado para o crescimento e a produção de γ -decalactona pelas leveduras produtoras (LEE; CHOU, 1994). O óleo de rícino é composto por vários ácidos graxos e o principal constituinte deste composto é o ácido ricinoleico (86%) (PUTHLI; RATHOD; PANDIT, 2006). Altas produtividades de γ -decalactona por *Yarrowia lipolytica* foram obtidas por Braga e Belo (2013, 2014), Gomes et al. (2011, 2013) e Moradi, Asadollahi e Nahvi (2013), utilizando óleo de rícino como fonte de carbono.

Na avaliação do cultivo em diferentes concentrações do óleo de rícino, observou-se que a melhor produção de γ -decalactona foi resultante da maior concentração do substrato. Apesar de Lee et al. (1998) relatarem que os substratos podem inibir o crescimento das células, altas concentrações do mesmo não inibiram o crescimento das leveduras, permanecendo praticamente

viáveis durante todo o tempo de fermentação. Esses resultados são semelhantes aos de Braga e Belo (2014), segundo os quais a produção do aroma pela levedura *Yarrowia lipolytica* inoculada em diferentes concentrações de óleo de rícino foi maior quando se utilizou a maior concentração do substrato (60 g/L). O acúmulo de γ -decalactona está diretamente relacionado com a concentração do substrato, pois altas produções do aroma ocorrem quando a concentração do substrato é alta (GOMES et al., 2011). Em contraste com os resultados observados, Gomes et al. (2013) e Gomes, Teixeira e Belo (2010) analisaram a produção de γ -decalactona, utilizando três diferentes concentrações de metil ricinoleto e de óleo de rícino (10, 30 e 50 g/L). A produção máxima de γ -decalactona foi obtida quando 30 g/L do substrato foram utilizados.

O tipo de fermentação utilizada (batelada ou batelada alimentada) não foi significativo sobre a produção de γ -decalactona pela cepa *Y. lipolytica* CCMA 0242 (Tabela 3). Quando diferentes tipos de fermentações (batelada simples e batelada alimentada) foram avaliados para a produção de γ -decalactona pela cepa *Y. lipolytica* W29, a produção do aroma foi semelhante nas duas condições (BRAGA; BELO, 2014). Vários autores utilizaram a técnica de fermentação em batelada alimentada, pelo fato deste cultivo permitir um aumento significativo da população de células de leveduras, altos rendimentos do produto e prevenir o efeito tóxico da lactona para as células (GOMES; TEIXEIRA; BELO, 2012; LEE; LIN; CHOU, 1995; MORADI; ASADOLLAHI; NAHVI, 2013).

A *Y. lipolytica* é a levedura mais utilizada para a biotransformação do ácido ricinoleico em γ -decalactona, apresentando maiores rendimentos devido à capacidade de crescer em substratos hidrofóbicos (WACHÉ et al., 2003). Os resultados mostraram que a cepa *L. saturnus* CCMA 0243 foi capaz de produzir quantidades consideráveis de γ -decalactona, sendo sua produção 97,5% maior que a produção da cepa *Y. lipolytica* CCMA 0242.

Este foi o primeiro estudo a avaliar produção de γ -decalactona pela levedura *L. saturnus*. A γ -decalactona tem sido produzida em cultivos utilizando diferentes espécies de leveduras, as quais foram capazes de produzir γ -decalactona, sendo elas *Pichia guilliermondii* (ENDRIZZI; AWADÉ; BELIN, 1993), *Candida* sp.(ENDRIZZI; BELIN, 1995; OKUI; UCHIYAMA; MIZUGAKI, 1963), *Rhodotorula aurantiaca* (ALCHIHAB et al., 2009, 2010), *Sporidiobolus salmonicolor* (LEE et al., 1998, 1999), *Waltomyces lipofer* (AN; OH, 2013) e *Sporobolomyces odorus* (LEE; LIN; CHOU, 1995).

A produção de γ -decalactona pela levedura *Y. lipolytica* CCMA 0242 (104,7 mg/L) foi menor comparada com a de alguns relatos encontrados na literatura, como 263 mg/L (AGUEDO et al., 2005), 168 mg/L (GOMES; TEIXEIRA; BELO, 2012), 220 mg/L (MORADI; ASADOLLAHI; NAHVI, 2013), 1.600 mg/L (BRAGA; GOMES; BELO, 2012) e 3 g/L (BRAGA et al., 2015). Porém, a produção do aroma pela cepa do presente trabalho foi maior do que alguns relatos, como 87 mg/L (GOMES; TEIXEIRA; BELO, 2010) e 34 mg/L (BRAGA; BELO, 2013). Esses resultados podem ser explicados pelo fato de a cepa utilizada no presente trabalho ser diferente e os trabalhos apresentarem condições de cultivo diferentes. Outro fato é que, em cultivo em batelada simples, após algumas horas de fermentação, as leveduras podem utilizar a γ -decalactona como fonte de carbono, quando o substrato é completamente consumido, resultando no seu completo desaparecimento do meio de biotransformação (PAGOT et al., 1997).

A utilização dos diferentes valores de pH inicial e agitação no cultivo não influenciou a produção de γ -decalactona pelas cepas *Y. lipolytica* CCMA 0242 e *L. saturnus* CCMA 0243. Os relatos na literatura diferem do resultado deste trabalho. A produção de γ -decalactona em diferentes valores de pH inicial (4,5, 5,6 e 6,7) pela levedura *Yarrowia lipolytica* obteve melhor resultado (1.284 mg/L) em pH 6,7 (GOMES; TEIXEIRA; BELO, 2011). Utilizando a levedura

Rhodotorula aurantiaca inoculada em diferentes valores de pH (5,0, 6,0, 7,0, 8,0 e 9,0) inicial, a melhor produção do aroma (5,3 g/L) foi em pH 7 (ALCHIHAB et al., 2009). Gomes, Teixeira e Belo (2010) estudaram a influência da agitação na produção de γ -decalactona pela levedura *Yarrowia lipolytica* e verificaram que a agitação de 600 rpm resultou em maior produção do aroma (aproximadamente 81%), quando comparada com a agitação de 400 rpm. No trabalho de Aguedo et al. (2005), utilizaram-se diferentes agitações, 300 e 600 rpm para a produção de γ -decalactona pela levedura *Yarrowia lipolytica*, observando que a produção foi maior (110mg/L) na agitação de 600 rpm.

5 CONCLUSÃO

Diante das condições avaliadas, o óleo de rícino, na concentração de 30%, apresentou melhor resultado como substrato na produção de γ -decalactona pela cepa *Yarrowia lipolytica* CCMA 0242. Não houve diferença entre os dois tipos de fermentação (batelada simples e batelada alimentada) na produção de γ -decalactona.

A levedura *Lindnera saturnus* CCMA 0243 foi capaz de converter com sucesso o ácido ricinoleico em γ -decalactona. Diante desses resultados, esta espécie de levedura pode ser uma alternativa para a utilização em processos biotecnológicos de produção de γ -decalactona. Diferentes condições de pH e agitação no meio de biotransformação não interferiram na produção de γ -decalactona pelas leveduras *Yarrowia lipolytica* CCMA 0242 e *Lindnera sturnus* CCMA 0243.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às agências de financiamento CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e FAPEMIG (Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais), pelo apoio financeiro e a concessão de bolsas de estudos.

REFERÊNCIAS

- AGUEDO, M.; GOMES, N.; GARCIA, E.E.; WACHÉ, Y.; MOTA, M.; TEIXEIRA, J.A.; BELO, I. Decalactone production by *Yarrowia lipolytica* under increased O₂ transfer rates. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 27, n. 20, p. 1617-1621, Oct. 2005.
- ALCHIHAB, M.; ALDRIC, J. M.; AGUEDO, M.; DESTAIN, J.; WATHELET, J. P.; THONART, P. The use of Macronet resins to recover γ -decalactone produced by *Rhodotorula aurantiaca* from the culture broth. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 37, n. 2, p. 167-172, Feb. 2010.
- ALCHIHAB, M.; DESTAIN, J.; AGUEDO, M.; MAJAD, L.; GHAIFI, H.; WATHELET, J. P.; THONART, P. Production of γ -Decalactone by a Psychrophilic and a mesophilic strain of the yeast *Rhodotorula aurantiaca*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 158, n. 1, p. 41-50, July 2009.
- AN, J. U.; OH, D. K. Increased production of γ -lactones from hydroxy fatty acids by whole *Waltomyces lipofer* cells induced with oleic acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Clifton, v. 97, n. 18, p. 8265-8272, Sept. 2013.
- BRAGA, A.; BELO, I. Immobilization of *Yarrowia lipolytica* for aroma production from castor oil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 169, n. 7, p. 2202-2211, Apr. 2013.
- BRAGA, A.; BELO, I. Production of γ -decalactone by *Yarrowia lipolytica*: insights into experimental conditions and operating mode optimization. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, London, v. 90, n. 3, p. 559-565, Mar. 2014.
- BRAGA, A.; GOMES, N.; BELO, I. Lipase induction in *Yarrowia lipolytica* for castor oil hydrolysis and its effect on γ -Decalactone production. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Chicago, v. 89, n. 6, p. 1041-1047, June 2012.
- BRAGA, A.; MESQUITA, D.P.; AMARAL, A.L.; FERREIRA, E.C.; BELO, I. Aroma production by *Yarrowia lipolytica* in airlift and stirred tank bioreactors: differences in yeast metabolism and morphology. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 93, n. 15, p. 55-62, Jan. 2015.

CHATZITRAGKOU, A.; MAKRI, A.; BELKA, A.; BELLOU, S.; MAUROU, M.; MASTORIDOU, M.; MYSTRIOTI, P.; ONJORO, G.; AGGELIS, G.; PAPANIKOLAOU, S. Biotechnological conversions of derived biodiesel by yeast and fungal species. **Energy**, Oxford, v. 36, n. 2, p. 1097-1108, Feb. 2011.

DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. **Manual de biologia dos solos tropicais: amostragem e caracterização da biodiversidade.** Lavras: UFLA, 2010. 368 p.

ENDRIZZI, A.; AWADÉ, A. C.; BELIN J. M. Presumptive involvement of methyl ricinoleate β -oxidation in the production of γ -decalactone by the yeast *Pichia guilliermondii*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 114, n. 2, p.153-160, Dec. 1993.

ENDRIZZI, A.; BELIN J. M. Bioconversion of methyl ricinoleate to 4-hydroxy-decanoic acid and to γ -decalactone by yeast of genus *Candida*. **Journal Basic of Microbiology**, New York, v. 35, n. 5, p. 285-295, June 1995.

GOMES, N.; BRAGA, A.; TEIXEIRA, J. A.; BELO, I. Impact of lipase-mediated hydrolysis of castor oil on γ -decalactone production by *Yarrowia lipolytica*. **Journal of the American Oil Chemistry Society**, Chicago, v. 90, n. 8, p. 1131-1137, Aug. 2013.

GOMES, N.; TEIXEIRA, J. A.; BELO, I. Empirical modelling as an experimental approach to optimize lactone production. **Catalysis Science & Technology**, Cambridge, v. 1, n. 1, p. 86-92, 2011.

GOMES, N.; TEIXEIRA, J. A.; BELO, I. Fed-batch versus batch cultures of *Yarrowia lipolytica* for γ -decalactone production from methyl ricinoleate. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 34, n. 4, p. 649-654, Apr. 2012.

GOMES, N.; TEIXEIRA, J. A.; BELO, I. The use of methyl ricinoleate in lactone production by *Yarrowia lipolytica*: aspects of bioprocess operation that influence the overall performance. **Biocatalysis and Biotransformation**, London, v. 28, n. 4, p. 227-234, 2010.

GOMES, N.; WACHÉ, Y.; TEIXEIRA, J. A.; BELO, I. Oil-in-water emulsions characterization by laser granulometry and impact on γ -decalactone production in *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 33, n. 8, p. 1601-1606, Aug. 2011.

LEE, S.; CHENG, H. Y.; CHEN, W. C.; CHOU, C. C. Effect of physical factors on the production of γ -decalactone by immobilized cells of *Sporidiobolus salmonicolor*. **Process Biochemistry**, London, v. 34, n. 8, p. 845-850, 1999.

LEE, S.; CHENG, H. Y.; CHEN, W. C.; CHOU, C. C. Production of γ -decalactone from ricinoleic acid by immobilized cells of *Sporidiobolus salmonicolor*. **Process Biochemistry**, London, v. 33, n. 4, p. 453-459, 1998.

LEE, S.; LIN, S.; CHOU, C. Growth of and production of γ -Decalactone by *Sporobolomyces odorus* in Jar Fermentors as affected by pH, aeration and fed-batch technique. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 80, n. 2, p. 195-199, 1995.

LEE, S. L.; CHOU, C. C. Growth and production of γ -decalactone and cis-6 dodecen-4-olide by *Sporobolomyces odorus* in the presence of fatty acids and oils. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 78, n. 1, p. 114-116, May 1994.

LONGO, M. A.; SANROMÁN, M. A. Production of food aroma compounds: microbial and enzymatic methodologies. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 44, n. 3, p. 335-353, 2006.

MORADI, H.; ASADOLLAHI, M. A.; NAHVI, I. Improved γ -decalactone production from castor oil by fed-batch cultivation of *Yarrowia lipolytica*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, London, v. 2, n. 1, p. 64-68, Jan. 2013.

OKUI, S.; UCHIYAMA, M.; MIZUGAKI, M. Metabolism of hydroxy fatty acids: II., intermediates of the oxidative breakdown of ricinoleic acid by genus *Candida*. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 54, p. 536-540, 1963.

PAGOT, Y.; ENDRIZZI, A.; NICAUD, J. M.; BELIN, J. M. Utilization of an auxotrophic strain of the yeast *Yarrowia lipolytica* to improve gamma-decalactone production yields. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 25, n. 2, p. 113-116, Aug. 1997.

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

PUTHLI, M. S.; RATHOD, V. K.; PANDIT, A. B. Enzymatic hydrolysis of castor oil: process intensification studies. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 31, n. 1, p. 31-41, 2006.

ROMERO-GUIDO, C.; BELO, I.; TA, T. M. N.; CAO-HOANG, L.; ALCHIHAB, M.; GOMES, N.; THONART, P.; TEIXEIRA, J. A.; DESTAIN, J.; WACHÉ, Y. Biochemistry of lactone formation in yeast and fungi and its utilisation for the production of flavour and fragrance compounds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 89, n. 3, p. 535-547, Feb. 2011.

SCHRADER, J.; ETSCHMANN, M. M. W.; SELL, D.; HILMER, J.M.; RABENHORST, J. Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavour compounds: current industrial processes and future prospects. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 26, n. 6, p. 463-472, Mar. 2004.

SERRA, S.; FUGANTI, C.; BRENNER, E. Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 23, n. 4, p. 193-198, Apr. 2005.

SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, New York, v. 27, n. 1, p. 30-39, 2009.

SOUZA, K. S. T.; SCHWAN, R. F.; DIAS, D. R. Lipid and citric acid production by wild yeasts grown in glycerol. **Journal Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 24, n. 4, p. 497-506, 2014.

TIPTON, K.F.; DIXON, H.B. Effects of pH on enzymes. **Methods in Enzymology**, New York, v. 63, p. 183-234, 1979.

WACHÉ, Y.; AGUEDO, M.; NICAUD, J. M.; BELIN, J. M. Catabolism of hydroxyacids and biotechnological production of lactones by *Yarrowia lipolytica*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 61, n. 5/6, p. 393-404, June 2003.