



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS**

**PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS MICROBIANOS A PARTIR DE GLICEROL
BRUTO GERADO NA SÍNTESE DE BIODIESEL**

FRANCIELA SPIER

**Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert
Orientador**

**RIO GRANDE-RS
AGOSTO, 2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS**

**PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS MICROBIANOS A PARTIR DE GLICEROL
BRUTO GERADO NA SÍNTESE DE BIODIESEL**

FRANCIELA SPIER

Tese apresentada como requisito necessário
para obtenção do título de doutor em
Engenharia e Ciência de Alimentos.

Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert
Orientador

**RIO GRANDE-RS
AGOSTO, 2014**

Tese defendida por e aprovada em
....., pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:

(orientador)
(Origem)

(membro)
(Origem)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me ilumina e protege todos os dias.

Às minhas três irmãs Loiva, Lovani e Marinês por me darem suporte e serem meu alicerce em todos os momentos.

Aos meus pais, Egon e Valéria pelo amor incondicional, por todo o esforço na minha formação e principalmente pelos exemplos de amor e dignidade. Amo vocês!!!

Ao meu namorado Gabriel por todo apoio, carinho, incentivo e compreensão.

Aos meus colegas de laboratório pelos momentos compartilhados, por todas as vezes em que dividiram comigo equipamentos e reagentes para que eu pudesse dar andamento ao meu trabalho.

À Eliane e Renata, pessoas extraordinárias que tive o prazer de conhecer neste período e que seguem sendo minhas grandes amigas.

À Elisane, profissional exemplar, pessoa ímpar. Obrigada por todos os ensinamentos, toda paciência, toda amizade! Por tornar o laboratório um lugar alegre e prazeroso de se trabalhar.

Às minhas colaboradoras Carolina, Lívia e Suelen pelo trabalho que desempenharam e pela agradável companhia.

À Jesus e ao Roque pelo empréstimo de equipamentos e por estarem sempre dispostos a auxiliar.

Às professoras Eliana e Janaína pela disponibilidade e por compartilharem comigo seus conhecimentos.

À professora Jaqueline pelo auxílio nas análises cromatográficas e ao professor Carlos pela identificação das leveduras isoladas.

Ao meu orientador André, pela orientação, incentivo, contribuições e por todo ensinamento científico.

À FAPERGS, ao CNPq e a CAPES pelo apoio financeiro ao desenvolvimento deste projeto.

PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS MICROBIANOS A PARTIR DE GLICEROL BRUTO GERADO NA SÍNTESE DE BIODIESEL

RESUMO

Diante da grande quantidade de glicerol bruto gerado na síntese do biodiesel e seu baixo valor comercial, torna-se fundamental encontrar formas alternativas para converter este substrato em produtos com valor agregado. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar diferentes leveduras oleaginosas capazes de metabolizar o glicerol bruto, gerado como coproduto na síntese de biodiesel, visando produzir biomassa como fonte de lipídios. Todos os cultivos foram realizados em frascos agitados, em condições estabelecidas de acordo com cada etapa do trabalho, sendo obtidos dados relativos ao crescimento celular e à produção de lipídios, tratados estatisticamente conforme o propósito. *Lipomyces lipofer* NRRL Y-1155 apresentou diferenças significativas em relação às outras leveduras oriundas de banco de cultura, atingindo 57,64% de lipídios na biomassa. Estas leveduras apresentaram perfis de ácidos graxos diferenciados, semelhantes aos dos principais óleos vegetais utilizadas na síntese de biodiesel, com predominância de ácidos graxos poli-insaturados, especialmente ácido linoleico (68,3% na levedura *Rhodotorula glutinis* NRRL YB-252). O ácido gama-linolênico, um ácido graxo essencial ω 6, foi detectado em todas as leveduras analisadas, sendo que na biomassa de *Candida cylindracea* NRRL Y-17506 chegou a 23,1%. Através de um planejamento experimental Plackett-Burman, verificou-se que as variáveis concentração de extrato de levedura e de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ demonstraram maior influência na produção de lipídios por uma linhagem silvestre de *Rhodotorula mucilaginosa*. Para esta levedura, a partir da análise de efeitos foi possível estabelecer a seguinte condição para a produção de lipídios: 30,0 g.L⁻¹ glicerol; 5,0 g.L⁻¹ KH_2PO_4 ; 1,0 g.L⁻¹ Na_2HPO_4 ; 3,0 g.L⁻¹ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,2 g.L⁻¹ extrato de levedura; pH inicial 4,5; temperatura 25°C. Nestas condições conseguiu-se um teor de lipídios de 59,96% e lipídios totais produzidos de 5,51 g.L⁻¹. Também foi possível observar aumento no teor de lipídios da biomassa ao longo do tempo de cultivo, bem como o aumento do teor relativo do ácido linoleico, que atingiu 52%. Dentre as leveduras isoladas a partir de amostras ambientais do Extremo Sul do Brasil, a levedura identificada como *Cryptococcus humicola* se destacou das demais, apresentando proporção de 23,5% de ácidos graxos saturados, 14,8% de ácidos graxos monoinsaturados e 54,9% de ácidos graxos poli-insaturados, destacando-se o ácido linoleico. O planejamento Plackett-Burman foi também utilizado para esta levedura, sendo que as variáveis concentração de extrato de levedura e glicerol bruto demonstraram maior influência na produção de lipídios. Posteriormente, um delineamento composto central rotacional (DCCR) foi proposto visando à otimização da produção de lipídios. Os modelos empíricos preditivos obtidos para biomassa máxima e lipídios totais permitiram estabelecer para a produção de lipídios por *Cryptococcus humicola* a seguinte condição otimizada: 100,0 g.L⁻¹ glicerol; 5,0 g.L⁻¹ KH_2PO_4 ; 1,0 g.L⁻¹ Na_2HPO_4 ; 4,8 g.L⁻¹ extrato de levedura; pH inicial 4,5; temperatura 25°C. Esta condição representou um incremento de cerca de 2 vezes nos lipídios totais em relação à melhor condição estabelecida pelo planejamento Plackett-Burmann e um acréscimo de cerca de 4,8 vezes em relação às condições testadas inicialmente, atingindo 37,61% de lipídios e 8,85 g.L⁻¹ de lipídios totais. Deste modo, os propósitos de valorização de um coproduto oriundo da síntese de biodiesel, bem como a produção de um óleo com potencial para a produção de biodiesel, foram cumpridos.

Palavras-chave: glicerina residual, bioconversão, planejamento experimental.

PRODUCTION OF MICROBIAL LIPIDS FROM RAW GLYCEROL GENERATED IN BIODIESEL SYNTHESIS

ABSTRACT

Taking into consideration the huge quantities of raw glycerol produced by the synthesis of biodiesel and its low-cost, it is of urgency to find alternative ways to convert this substrate into value-added products. In this context, this work aimed to evaluate different oleaginous yeasts able to metabolize raw glycerol generated as a byproduct in the synthesis of biodiesel, in order to produce biomass as a source of lipids. All cultivations were carried out in shaken flasks under conditions established in accordance with each stage of the work, getting data on the cell growth and the production of lipids, which are statistically treated according to the purpose. *Lipomyces lipofer* NRRL Y-1155 showed differences in relation to other yeasts originating from stock culture reaching 57.64% of lipids. These yeasts presented different fatty acid profiles similar to those of the main vegetable oils used in the biodiesel synthesis, predominantly poly-unsaturated fatty acids, especially linoleic acid (68.3% in the yeast *Rhodotorula glutinis* NRRL YB-252). γ -linolenic acid, an essential fatty acid ω 6, was detected in all yeasts, and for the biomass of *Candida cylindracea* NRRL Y-17506 reached 23.1%. Through Plackett-Burman design, it was found that the variables concentration of yeast extract and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ showed greater influence on lipid production by *R. mucilaginosa* wild strain. For this yeast, from the effects analysis, it was possible to establish the following condition for the production of lipids: 30.0 g.L^{-1} glycerol; $5.0 \text{ g.L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$; $1.0 \text{ g.L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$; $3.0 \text{ g.L}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1.2 g.L^{-1} yeast extract; initial pH 4.5; temperature 25°C . Under these conditions, lipid content reached 59.96% and total lipids 5.51 g L^{-1} . It was also observed an increase in lipid content during the period of cultivation, as well an increasing the relative content of linoleic acid, which reached 52%. Among the yeasts isolated from environmental samples from the extreme south of Brazil, the yeast identified as *Cryptococcus humicola* stood out from the others, with the proportion of 23.5% saturated fatty acids, 14.8% monounsaturated fatty acids and 54.9 % of poly-unsaturated fatty acids, especially linoleic acid. The Plackett-Burman design was also used for this yeast, and the variables concentration of yeast extract and raw glycerol showed greater influence on lipid production. Subsequently, a factorial design was proposed in order to optimize the production of lipids. Predictive empirical models obtained for maximum biomass and total lipids allowed to establish for lipid production by *Cryptococcus humicola* the following optimized conditions: 100.0 g L^{-1} glycerol; $5.0 \text{ g.L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$; $1.0 \text{ g.L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$; 4.8 g.L^{-1} yeast extract; initial pH 4.5; temperature 25°C . This condition represents a 2-fold increase in total lipids in relation to the best condition established by Plackett-Burmann design and a 4.8-fold increase compared to the initial conditions tested, reaching 37.61% of lipids and 8.85 g L^{-1} of total lipids. Thus, the purpose of valuing of a byproduct of biodiesel arises from the synthesis as well as the production of a potential renewable oil for biodiesel production were accomplished.

Keywords: raw glicerol, bioconversion, experimental design.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas do glicerol a 20°C (BEATRIZ, ARAUJO; LIMA, 2011).	29
Tabela 2 - Conteúdo lipídico % (m/m) de diferentes espécies de leveduras cultivadas em condições e meios de cultivo distintos.	35
Tabela 3 - Perfil de ácidos graxos obtidos de diferentes espécies de leveduras (BEOPOULOS et al., 2009).	35
Tabela 4 - Substratos alternativos utilizados na produção de lipídios por leveduras oleaginosas.	43

CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

BIOCONVERSÃO DE GLICEROL BRUTO GERADO NA SÍNTESE DO BIODIESEL POR DIFERENTES LEVEDURAS OLEAGINOSAS: CONTEÚDO LIPÍDICO E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS

Tabela 1 - Análise qualitativa das leveduras através da técnica de coloração com Sudan Black B.	61
Tabela 2 - Médias \pm desvio padrão para velocidade específica de crescimento celular, biomassa máxima, teor de lipídios, lipídios totais, concentração de glicerol e fator de conversão de substrato em lipídios e análise estatística dos dados.	63
Tabela 3 - Perfil de ácidos graxos das leveduras pré-selecionadas e cultivadas em meio contendo glicerol.	66

INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NA BIOCONVERSÃO DE GLICEROL BRUTO EM LIPÍDIOS POR *Rhodotorula mucilaginosa*

Tabela 1 - Matriz do planejamento Plackett-Burman com valores reais e codificados.	76
Tabela 2 - Resultados do planejamento experimental Plackett-Burman para as respostas biomassa máxima, produtividade de biomassa, teor de lipídios, lipídios totais e produtividade de lipídios.	80
Tabela 3 - Efeitos estimados para a biomassa máxima (g.L^{-1}).	81
Tabela 4 - Efeitos estimados para a produtividade de biomassa ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$).	82

Tabela 5 - Efeitos estimados para o teor de lipídios (%).	82
Tabela 6 - Efeitos estimados para os lipídios totais (g.L ⁻¹).	83
Tabela 7 - Efeitos estimados para a produtividade de lipídios (g.L ⁻¹ .h ⁻¹).	84
Tabela 8 - Médias ± desvio padrão para biomassa máxima, produtividade de biomassa, teor de lipídios, lipídios totais e produtividade de lipídios e análise estatística dos dados.*	86
Tabela 9 - Perfil de ácidos graxos da levedura <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> ao longo de 240 h de cultivo.	89

ISOLAMENTO, SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS SILVESTRES COM POTENCIAL PARA BIOCONVERSÃO DE GLICEROL BRUTO EM LIPÍDIOS

Tabela 1 - Análise qualitativa de leveduras através de coloração com Sudan Black B.	104
Tabela 2 - Médias ± desvio padrão para velocidade específica máxima de crescimento celular, biomassa máxima, teor de lipídios, lipídios totais produzidos e fator de conversão de substrato em lipídios e análise estatística dos dados... ..	1099
Tabela 3 - Perfil de ácidos graxos das leveduras <i>Cryptococcus humicola</i> , <i>Schwanniomyces variijae</i> e <i>Meyerozyma guilliermondii</i> ao término dos cultivos.	111

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS POR UMA NOVA LINHAGEM DE *Cryptococcus humicola* A PARTIR DE GLICEROL BRUTO GERADO NA SÍNTESE DO BIODIESEL

Tabela 1 - Matriz do planejamento Plackett-Burman com valores reais e codificados.	125
Tabela 2 - Resultados do planejamento experimental Plackett-Burman para as respostas biomassa máxima, produtividade de biomassa, teor de lipídios, lipídios totais e produtividade de lipídios.	12929
Tabela 3 - Efeitos estimados para a biomassa máxima (g.L ⁻¹).	130
Tabela 4 - Efeitos estimados para a produtividade de biomassa (g.L ⁻¹ .h ⁻¹).	130
Tabela 5 - Efeitos estimados para o teor de lipídios da levedura (%).	131
Tabela 6 - Efeitos estimados para os lipídios totais (g.L ⁻¹).	131
Tabela 7 - Efeitos estimados para a produtividade de lipídios (g.L ⁻¹ .h ⁻¹).	132
Tabela 8 - Resultados do delineamento composto central rotacional 2 ² para as respostas biomassa máxima, teor de lipídios e lipídios totais produzidos.	135

Tabela 9 - Efeitos estimados para o teor de lipídios da levedura (%).	137
Tabela 10 - ANOVA para a biomassa máxima (g.L ⁻¹).	137
Tabela 11 - ANOVA para os lipídios totais (g.L ⁻¹).	138
Tabela 12 - Médias ± desvio padrão para biomassa máxima, teor de lipídios e lipídios totais e análise estatística dos dados.	140
Tabela 13 - Resultados esperados e resultados experimentais obtidos para biomassa máxima e lipídios totais no cultivo de <i>Cryptococcus humicola</i>	141

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 - Molécula de glicerol..... 28

CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

BIOCONVERSÃO DE GLICEROL BRUTO GERADO NA SÍNTESE DO BIODIESEL POR DIFERENTES LEVEDURAS OLEAGINOSAS: CONTEÚDO LIPÍDICO E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS

Figura 1 - Coloração das colônias de leveduras através da técnica que utiliza Sudan Black B. (a) *C. laurentii* NRRL Y-27011 (negativo); (b) *L. starkeyi* NRRL Y-11557 (positivo)..... 62

INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NA BIOCONVERSÃO DE GLICEROL BRUTO EM LIPÍDIOS POR *Rhodotorula mucilaginosa*

Figura 1 - Biomassa e pH ao longo do cultivo de *Rhodotorula mucilaginosa*. Ensaio 1 (●): correspondente à condição do Ensaio 5 do planejamento experimental; Ensaio 2 (□): corresponde à condição estabelecida pela análise de efeitos do planejamento experimental..... 85

Figura 2 - Acompanhamento da concentração de glicerol, biomassa e acúmulo de lipídios da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* ao longo do tempo de cultivo.... 87

Figura 3 - Acompanhamento do teor relativo de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* ao longo do tempo de cultivo..... 89

ISOLAMENTO, SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS SILVESTRES COM POTENCIAL PARA BIOCONVERSÃO DE GLICEROL BRUTO EM LIPÍDIOS

Figura 1 - Crescimento celular da levedura *Cryptococcus humicola* e evolução de pH ao longo do cultivo em meio contendo glicerol bruto..... 107

Figura 2 - Crescimento celular da levedura *Schwanniomyces variijae* e evolução do pH ao longo do cultivo em meio contendo glicerol bruto..... 107

Figura 3 - Crescimento celular da levedura *Meyerozyma guilliermondii*, e evolução do pH ao longo do cultivo em meio contendo glicerol bruto. 108

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS POR UMA NOVA LINHAGEM DE *Cryptococcus humicola* A PARTIR DE GLICEROL BRUTO GERADO NA SÍNTESE DO BIODIESEL

- Figura 1** - Curva de contorno para biomassa em função da concentração de glicerol e de extrato de levedura nos diferentes níveis estudados..... 138
- Figura 2** - Curva de contorno para lipídios totais em função da concentração de glicerol e de extrato de levedura nos diferentes níveis estudados..... 139
- Figura 3** - Biomassa e pH ao longo do cultivo de *Cryptococcus humicola*. Ensaio 1 (●): correspondente à condição do Ensaio 4 do planejamento experimental; Ensaio 2 (□): corresponde à condição apontada pelas curvas de contorno..... 140
- Figura 4** - Acompanhamento da concentração de glicerol, biomassa e acúmulo de lipídios da levedura *Cryptococcus humicola* ao longo do tempo de cultivo..... 142

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	16
1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. OBJETIVOS.....	20
1.1.1 Objetivo Geral.....	20
1.1.2 Objetivos Específicos.....	20
2. JUSTIFICATIVA.....	17
CAPÍTULO II.....	23
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
3.1. Biodiesel.....	24
3.2 Glicerol bruto.....	27
3.3. Cultivos microbianos.....	31
3.4. Leveduras oleaginosas.....	33
3.4.1. <i>Yarrowia lipolytica</i>	36
3.4.2. <i>Cryptococcus curvatus</i>	38
3.4.3. <i>Rhodotorula glutinis</i>	39
3.4.4. <i>Rhodospiridium toruloides</i>	40
3.4.5. <i>Lipomyces starkeyi</i>	41
3.5. Substratos alternativos utilizados na produção de lipídios por leveduras oleaginosas.....	42
3.5.1. Aproveitamento do glicerol bruto na produção de lipídios.....	43
3.6. Fatores que exercem influência no acúmulo de lipídios por leveduras.....	45
3.7. Regulação metabólica do acúmulo de lipídios em leveduras oleaginosas.....	47
3.8. Biodiversidade e leveduras silvestres.....	51
CAPÍTULO III.....	54
DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO.....	54
BIOCONVERSÃO DE GLICEROL BRUTO GERADO NA SÍNTESE DO BIODIESEL POR DIFERENTES LEVEDURAS OLEAGINOSAS: CONTEÚDO LIPÍDICO E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS.....	55
RESUMO.....	56
1. INTRODUÇÃO.....	57
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	58
2.1. Micro-organismos.....	58

2.2. Glicerol bruto.....	58
2.3. Pré-seleção de leveduras oleaginosas	59
2.4. Preparo do inóculo.....	59
2.5. Cultivos em frascos agitados	59
2.6. Métodos Analíticos.....	60
2.7. Análise Estatística	61
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
3.1. Pré-Seleção das Leveduras Oleaginosas.....	61
3.2. Cultivos em frascos agitados	62
3.3. Perfil de ácidos graxos.....	64
4. CONCLUSÃO.....	66
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NA BIOCONVERSÃO DE GLICEROL BRUTO EM LIPÍDIOS POR <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	70
RESUMO	71
1. INTRODUÇÃO.....	72
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	73
2.1. Micro-organismo	73
2.2. Glicerol bruto.....	74
2.3. Preparo do inóculo.....	74
2.4. Planejamento experimental de Plackett-Burman.....	74
2.5. Métodos analíticos.....	77
2.5.1. Biomassa.....	77
2.5.2. pH.....	77
2.5.3. Glicerol	77
2.5.4. Lipídios.....	77
2.5.5. Perfil de ácidos graxos.....	78
2.6. Análise estatística	78
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
3.1. Delineamento Plackett-Burman.....	78
3.2. Cinética do consumo de glicerol, acúmulo de lipídios e perfil de ácidos graxos	86
4. CONCLUSÃO.....	90
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

ISOLAMENTO, SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS SILVESTRES COM POTENCIAL PARA BIOCONVERSÃO DE GLICEROL BRUTO EM LIPÍDIOS	95
RESUMO	96
1. INTRODUÇÃO.....	97
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	99
2.1. Glicerol bruto.....	99
2.2. Coleta de amostras.....	99
2.3. Isolamento e manutenção das colônias isoladas.....	99
2.4. Pré-seleção de leveduras oleaginosas	100
2.5. Identificação das leveduras pré-selecionadas	100
2.6. Preparo do inóculo.....	101
2.7. Cultivos em frascos agitados	101
2.8. Métodos analíticos.....	101
2.8.1. Biomassa.....	101
2.8.2. pH	102
2.8.3. Glicerol	102
2.8.4. Lipídios.....	102
2.8.5. Perfil de ácidos graxos.....	1022
2.9. Análise estatística	103
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	103
3.1. Isolamento e pré-seleção de leveduras oleaginosas.....	103
3.2. Identificação das leveduras FS II, C1 I e S1 I	105
3.3. Cultivo em frascos agitados.....	106
4. CONCLUSÃO.....	113
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS POR UMA NOVA LINHAGEM DE <i>Cryptococcus humicola</i> A PARTIR DE GLICEROL BRUTO GERADO NA SÍNTESE DO BIODIESEL.....	119
RESUMO	120
1. INTRODUÇÃO.....	121
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	122
2.1. Micro-organismo	122
2.2. Glicerol bruto.....	123

2.3. Preparo do inóculo.....	123
2.4. Planejamento experimental Plackett-Burman	123
2.5. Planejamento experimental fatorial completo	125
2.6. Métodos analíticos.....	126
2.6.1. Biomassa.....	126
2.6.2. pH.....	126
2.6.3. Glicerol	126
2.6.4. Lipídios.....	127
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	127
3.1. Planejamento experimental Plackett-Burman	127
3.2. Delineamento composto central rotacional	134
3.3. Validação do modelo matemático para biomassa e lipídios totais	139
3.4. Cinética do crescimento celular, consumo de glicerol e acúmulo de lipídios... ..	142
4. CONCLUSÃO.....	143
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	144
CAPÍTULO IV	148
4. CONCLUSÕES GERAIS	149
CAPÍTULO V	151
5. Sugestões para Trabalhos Futuros	152
CAPÍTULO VI.....	153
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	154
APÊNDICE	170

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO

O uso generalizado de combustíveis fósseis, como petróleo, carvão e gás natural, que é resultado da alta demanda de energia do mundo industrializado, acaba gerando poluição do meio-ambiente (KARATAY; DÖNMEZ, 2010). Devido aos problemas ambientais e à reserva limitada de petróleo, a utilização de fontes renováveis de energia é essencial (PAN et al., 2009). O Brasil se destaca por ter 42,4% de sua matriz energética constituída por fontes renováveis de energia em relação aos padrões mundiais (13,2%). Uma importante parcela destas fontes renováveis de energia que compõem a matriz brasileira, 8% da oferta interna de energia total, é representada pelos biocombustíveis. Entre os biocombustíveis mais promissores destaca-se o biodiesel (BEN, 2013).

O governo brasileiro lançou em 06 de dezembro de 2004 o marco regulatório que estabeleceu as condições legais para a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira de combustíveis líquidos (ROUSSEF, 2004). A lei nº 11.097 de 13 de janeiro de 2005 estabeleceu a obrigação da adição de um percentual mínimo de biodiesel ao óleo diesel comercializado ao consumidor, em qualquer parte do território nacional. A lei tornou obrigatória a adição de 2% de biodiesel ao diesel (B2) até 2008 e a adição de 5% (B5) até 2013. Já em 2008 o diesel comercializado no Brasil passou a conter 3% de biodiesel (B3). Projeções mostravam que o excedente de glicerol bruto seria da ordem de 100 mil t.ano⁻¹ no mercado brasileiro, com a entrada do B3, muito além da produção tradicional, na faixa de 30 mil t.ano⁻¹. As previsões com a introdução do B5 eram de uma produção de 250 mil t.ano⁻¹ de glicerol bruto (MOTA, SILVA; GONÇALVES, 2009). A partir de primeiro de janeiro de 2010, a permissão legal de adicionar 5% de biodiesel no diesel de petróleo (B5) entrou em vigor, através da Resolução CNPE, nº 6/2009, sendo antecipada, portanto, em 3 anos (UBRABIO, 2009).

O uso do biodiesel, que é produzido pela transesterificação de triacilgliceróis com um álcool monovalente (metanol ou etanol, principalmente), ou pela esterificação de ácidos graxos, tem sido incentivado nos últimos anos por se tratar de um combustível renovável, biodegradável e não tóxico (MEHER, SAGAR; NAIK, 2006). Os incentivos governamentais ainda são fundamentais para manter a competitividade da produção, pois faltam investimentos em tecnologia, além de ajustes ambientais. Contudo, o principal obstáculo para a viabilidade comercial do biodiesel é seu alto custo, principalmente quando obtido através de óleo vegetal virgem. No caso do Brasil, a

produção de biodiesel a partir da soja representa, aproximadamente, 80 a 90% da totalidade da matéria-prima graxa empregada para tal finalidade. A soja, contudo, apresenta pouco teor de óleo no grão e baixa produtividade por hectare, além de ser uma *commodity* agrícola (SUAREZ et al., 2009). Embora a utilização de óleos e gorduras residuais possa reduzir os custos de produção, o processo requer outras matérias-primas de baixo custo (LIU; ZHAO, 2007). Levando em consideração a enorme quantidade de glicerol bruto gerado no processo (estequiometricamente 10%) e seu baixo valor comercial, torna-se urgente encontrar formas alternativas para converter este substrato em produtos com valor agregado a fim de produzir biodiesel de forma sustentável (MAKRI, FAKAS; AGGELIS, 2010).

O glicerol bruto resultante da síntese do biodiesel usualmente apresenta 55-90 % de pureza. O restante consiste de triacilgliceróis não convertidos, metanol ou etanol não convertido, biodiesel, sabões e outros (XU et al., 2012). A conversão deste glicerol por via biotecnológica em produtos de importância comercial constitui uma das mais promissoras alternativas para seu aproveitamento (PAPANIKOLAOU et al., 2008; SILVA, MACK; CONTIERO, 2009), podendo ser utilizado com sucesso como fonte de carbono por diferentes micro-organismos na produção de lipídios (MORITA et al., 2007). Micro-organismos capazes de acumular lipídios em nível superior a 20% de sua biomassa são descritos como oleaginosos. Menos de 30 das 600 espécies de micro-organismos investigadas em estudos foram consideradas oleaginosas (MENG et al., 2009).

Lipídios obtidos através de fontes microbianas, também chamados de *single cell oil*, são produzidos por alguns micro-organismos como leveduras, fungos filamentosos, bactérias e microalgas. Geralmente, leveduras e fungos são capazes de acumular mais lipídios do que as bactérias e microalgas, acumulando-os não somente como constituintes da membrana, mas também na forma de triacilgliceróis. As espécies de leveduras oleaginosas mais conhecidas incluem *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* e *Yarrowia* (BEOPOULOS et al., 2009). Tem sido demonstrado que os lipídios de fonte microbiana são ricos em triacilgliceróis, os quais podem ser convertidos em ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME - *fatty acids methyl esters*) por meio de catálise enzimática ou inorgânica. Constatou-se também, que a produção de lipídios por leveduras oleaginosas tem muitas vantagens devido ao seu rápido crescimento, menor susceptibilidade a alterações por estação, local e clima, maior facilidade de ampliação de escala, alto teor de óleo e a semelhança da sua fração de

triacilglicerol com as obtidas em óleos vegetais e gordura animal (THIRU, SANKH; RANGASWAMY, 2011).

Em micro-organismos, a extensão do acúmulo de lipídios é determinada por sua constituição genética, sendo que a capacidade máxima de acúmulo pode variar entre espécies e até mesmo entre linhagens individuais. De acordo com o micro-organismo utilizado e as condições de cultivo empregada, o teor de lipídios, bem como sua composição, podem variar (PAPANIKOLAOU, SARANTOU; KOMAITIS, 2004). Tem sido relatado que as condições de cultivo, como relação C/N, fontes de nitrogênio, temperatura, pH, oxigênio e sais inorgânicos, são capazes de influenciar no acúmulo de óleo pelos micro-organismos (LI, DU; LIU, 2008).

Portanto, é interessante a prospecção de leveduras capazes de converter substratos renováveis, tais como o glicerol bruto gerado na síntese do biodiesel, em lipídios, bem como investigar as condições de processo visando ampliar a bioprodução.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar diferentes leveduras oleaginosas capazes de metabolizar o glicerol bruto, gerado como coproduto na síntese de biodiesel, visando à produção de biomassa como fonte de lipídios.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a capacidade de linhagens de leveduras disponíveis em bancos de culturas de acumular lipídios, bem como caracterizá-los quanto ao perfil de ácidos graxos, tendo o glicerol bruto como fonte de carbono;

- Isolar e selecionar linhagens de leveduras silvestres a partir da biodiversidade presente em amostras ambientais, com potencial para metabolizar glicerol bruto e acumular lipídios;

- Verificar os efeitos dos constituintes do meio de cultivo, pH inicial e temperatura na produção de lipídios por *Rhodotorula mucilaginosa*, bem como avaliar a cinética do acúmulo de lipídios e caracterizar os lipídios produzidos quanto ao perfil de ácidos graxos na condição estabelecida;

- Otimizar a produção de lipídios por *Cryptococcus humicola*, estabelecendo condições de cultivo em termos de constituintes do meio de cultivo, pH inicial e temperatura, bem como avaliar a cinética do acúmulo de lipídios por esta levedura na condição otimizada.

2. JUSTIFICATIVA

A busca por fontes alternativas de energia e processos sustentáveis visando à redução da poluição ambiental e o aquecimento global do planeta tem estimulado o mercado mundial de combustíveis limpos (POLI et al., 2014). Os biocombustíveis podem ser definidos como os combustíveis produzidos, principalmente, a partir de biomassas agrícolas sendo portanto, renováveis e capazes de substituir combustíveis fósseis, reduzindo a emissão de gases de efeito estufa, em função da absorção do gás carbônico atmosférico que ocorre durante a produção dessa biomassa (YAN et al., 2014).

Para motores do tipo diesel tem sido mundialmente proposto o uso do biodiesel, cuja produção encontra-se em crescimento acelerado, o que gera, como consequência, um aumento na quantidade de coprodutos gerados, principalmente o glicerol bruto (LI, DU; LIU, 2008). Desta forma, um aspecto importante na obtenção do biodiesel de forma sustentável é o destino a ser dado ao glicerol obtido no processo. A conversão da glicerol por via biotecnológica em produtos com maior valor agregado constitui uma importante alternativa para o seu aproveitamento. O desenvolvimento de bioprocessos para converter glicerol em produtos com importância comercial viria a agregar valor ao biodiesel, seguindo-se o conceito de biorrefinaria (MAKRI, FAKAS; AGGELIS, 2010). Este termo se refere ao uso de matérias primas renováveis e seus resíduos de maneira mais diversificada e integral para a produção de uma variedade de produtos e energia, com geração mínima de resíduos e emissões (DHARMADI, MURARKA; GONZALEZ, 2006).

Por outro lado, há um crescente interesse por novas fontes de ácidos graxos e muita atenção tem sido voltada para os micro-organismos denominados oleaginosos (CAZETTA; CELLIGOI, 2005). Os micro-organismos oleaginosos apresentam um grande potencial industrial devido à sua capacidade em estocar lipídios com propriedades e composição muitas vezes similares a produtos de origem animal e vegetal, às altas proporções de ácidos graxos essenciais, como ácido linoleico, às altas taxas de produção de lipídios e à possibilidade de valorização de coprodutos agroindustriais (PAPANIKOLAOU et al., 2008).

Com base no acima exposto, este trabalho vem contribuir com inovações tecnológicas relacionadas ao aproveitamento do glicerol bruto gerado na produção do

biodiesel, utilizando-o como substrato no cultivo de leveduras para produção de lipídios, buscando desta forma agregar valor a este coproduto e contribuir para o desenvolvimento sustentável da cadeia produtiva do biodiesel.

CAPÍTULO II
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Biodiesel

O crescente consumo de energia vem sendo suprido basicamente por uma matriz energética baseada em combustíveis fósseis como carvão mineral, petróleo e mais recentemente o gás natural. O petróleo desempenha um papel importante como principal fonte de energia em todo o mundo, sendo alguns de seus derivados especialmente utilizados em meios de transporte. Através das informações contidas no balanço energético torna-se possível a avaliação da racionalidade da utilização dos recursos energéticos disponíveis, que são limitados e com previsão de esgotamento no futuro (SAWANGKEAW; NGAMPRASERTSITH, 2013). Alia-se a isto as diversas crises econômicas provocadas pelo aumento do preço do petróleo, bem como as fortes pressões ambientalistas que motivam a luta pela qualidade do meio ambiente, e ainda, com a introdução do conceito de desenvolvimento sustentável, o interesse pelo uso de combustíveis biodegradáveis oriundos de fontes renováveis (LI et al., 2010).

De acordo com Costa (2006), sob o aspecto da origem dos combustíveis, existem dois que podem ser citados: os renováveis e os não renováveis. Os combustíveis não renováveis são aqueles originados do petróleo, produtos de origem fóssil, a exemplo da gasolina, diesel, gás liquefeito de petróleo e querosene de aviação. Os combustíveis nucleares também são tidos como não renováveis. Já os combustíveis renováveis ou biocombustíveis tem origem na biomassa, isto é, no conjunto de produtos e resíduos agrícolas, das florestas e de indústrias correlatas.

Dentre os biocombustíveis pode-se citar a madeira, o carvão de madeira, o álcool combustível, o biodiesel de oleaginosas e, mais recentemente, de cana-de-açúcar. O óleo utilizado para produção de biodiesel pode ser obtido a partir de vegetais, gorduras animais e resíduos industriais e domésticos. Em vegetais, as principais fontes de óleo são: soja, girassol, amendoim, colza, canola, palma (dendê), algodão e mamona. O sebo de boi, a gordura de frango e de suínos são as principais fontes de origem animal para produção do biodiesel (GAO et al., 2014). O grande benefício dos combustíveis renováveis em detrimento aos combustíveis fósseis é a preservação ao meio ambiente, poluindo menos, por reduzir a emissão de gases de efeito estufa, em função da absorção do gás carbônico atmosférico que ocorre na produção da biomassa (BONOMI, POÇO;

TRIELLI, 2006), além de reduzirem as emissões de enxofre, monóxido de carbono, material particulado e aromáticos (QUINTELLA et al., 2009).

O biodiesel de qualidade deve ser produzido seguindo especificações industriais restritas. Nos Estados Unidos, o biodiesel é o único combustível alternativo a obter completa aprovação no *Clean Air Act*, de 1990, e autorizado pela Agência Ambiental Americana (*Environmental Protection Agency* - EPA) para venda e distribuição. De acordo com ela, os óleos vegetais puros não estão autorizados a ser utilizados como óleo combustível.

Existem basicamente quatro processos aplicados para a fabricação de biodiesel: diluição, micro-emulsificação, pirólise e transesterificação (RAMOS, 2006). Os processos atuais de produção de biodiesel estão concentrados fortemente na reação de transesterificação a qual, de acordo com Borschiver (2006), consiste num processo químico em que mistura-se o óleo com o álcool, metanol ou etanol e, na presença de catalisador, hidróxido de sódio ou de potássio, reagem produzindo ésteres metílicos ou etílicos, compondo o biodiesel, e o glicerol. Quimicamente, transesterificar significa tomar uma molécula de um triacilglicerol ou um ácido graxo complexo, neutralizar os ácidos graxos livres, remover o glicerol e criar um éster.

A transesterificação é uma reação, a princípio, reversível. Entretanto, o glicerol formado é praticamente imiscível no biodiesel, reduzindo fortemente a extensão da reação reversa. A imiscibilidade do glicerol no biodiesel é um fator que favorece o rendimento da reação. Entretanto, a possibilidade de formação de emulsões estáveis, em certos casos, exige um longo período de repouso para separação das fases. A mistura de ésteres graxos resultante da transesterificação é denominada biodiesel, que é biodegradável, apresentando menor emissão de poluentes, maior ponto de fulgor e maior lubricidade quando comparado ao óleo mineral ou diesel. O biodiesel é perfeitamente miscível ao óleo diesel, podendo ser utilizado puro ou em misturas sem que qualquer adaptação nos motores seja necessária (RINALDI et al., 2007). As misturas binárias de biodiesel e óleo diesel são designadas pela abreviação BX, onde X é a porcentagem de biodiesel adicionada à mistura. Por exemplo, o B2, B5, B20 e B100 são combustíveis com uma concentração de 2%, 5%, 20% e 100% de biodiesel, respectivamente. No mercado de combustíveis, a experiência de utilização do biodiesel tem se dado em quatro níveis de concentração: puro (B100); misturas (B20 – B30); aditivo (B5); e aditivo de lubricidade (B2) (RAMOS et al., 2000). Segundo a Agência Nacional de Petróleo (ANP), biodiesel é um combustível alternativo de queima limpa,

produzido de recursos renováveis. Não contém derivados de petróleo, mas pode ser adicionado a ele formando uma mistura, de modo que possa ser usado em um motor de ignição à compressão (diesel) sem necessidade de modificação.

Do ponto de vista social, o biodiesel está relacionado com a criação de novos empregos, uma vez que gera postos de trabalho, seja por firmar o homem no campo (cultura de oleaginosas) ou para incrementar o salário de certas categorias urbanas (coleta de óleo residual de fritura). A produção e a comercialização de biodiesel no Brasil possuem vantagens importantes devido à grande disponibilidade de matéria-prima para sua produção e ao crescimento contínuo da indústria de óleos vegetais e etanol. Neste contexto, o governo brasileiro criou o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB), que foi estabelecido por meio do Decreto de 23 de dezembro de 2003, o qual institui a Comissão Executiva Interministerial, encarregada da implantação das ações direcionadas à produção e ao uso de óleo vegetal – biodiesel como fonte alternativa de energia (GOVERNO FEDERAL, 2007). O PNPB tem como uma de suas metas principais oferecer alternativas rentáveis para a agricultura familiar, beneficiando milhares de famílias que plantam soja, mamona e girassol no país, culminando com a implantação de diversos projetos agroindustriais em várias regiões, incluindo o Rio Grande do Sul. Estima-se que apenas no estado sejam beneficiados 20 mil agricultores familiares.

A principal característica da matriz energética brasileira é a elevada porcentagem de energia renovável em relação aos padrões mundiais (BEN, 2013). Entretanto, incentivos governamentais ainda são fundamentais para manter a competitividade da produção, pois faltam investimentos em tecnologia, além de ajustes ambientais. O governo brasileiro lançou em 06 de dezembro de 2004 o marco regulatório que estabeleceu as condições legais para a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira de combustíveis líquidos (ROUSSEF, 2004). A lei nº 11.097 de 13 de janeiro de 2005 estabeleceu a obrigação da adição de um percentual mínimo de biodiesel ao óleo diesel comercializado ao consumidor, em qualquer parte do território nacional.

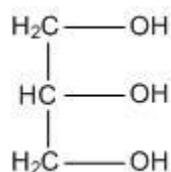
O biodiesel é mais caro que o diesel. Por isso, na implantação do PNPB foi adotado um modelo de estruturação do novo mercado que evitasse que o seu funcionamento fosse regido, estritamente, pelas regras convencionais de mercado, em que os preços do diesel e do biodiesel determinassem a viabilidade do produto. Foi estruturado um mercado regulado e específico para o biodiesel (compulsório). De acordo com Campos (2009), se fosse adotada a política de competição do biodiesel com

o diesel, não existiria espaço para o novo combustível no Brasil, uma vez que se empregando a maioria das oleaginosas disponíveis, o biodiesel ainda é mais caro que o diesel, uma vez que a aquisição da matéria-prima corresponde a mais de 70% dos custos de produção. Segundo o PNPB, o Brasil importa cerca de 10% do diesel que consome. Este, por seu uso em transportes de cargas e passageiros, é o combustível mais utilizado no país (57,7% dos combustíveis líquidos), o que representa um consumo anual de 38,2 bilhões de litros.

As primeiras rotas alternativas de produção de biodiesel, investigadas no Brasil, foram o uso de óleos residuais de frituras e a esterificação de ácidos graxos, que permitem a produção de biodiesel utilizando passivos ambientais. Embora o uso de óleos residuais reduzam os custos, o processo requer mais matérias-primas baratas (KARATAY; DÖNMEZ, 2010). Recentemente, diversos estudos têm reportado o potencial de fontes oleaginosas não usuais, consorciando oleaginosas perenes, como a macaúba e o pinhão-manso, com produção de gado e grãos, ou, ainda, o desenvolvimento de biorreatores para a produção de óleos a partir de algas. Rotas de obtenção de biocombustíveis de segunda geração, tais como a produção de hidrocarbonetos a partir de materiais graxos, também têm sido exploradas. Os processos alternativos mais discutidos atualmente no Brasil são o craqueamento, o hidrocrackeamento (H-Bio) e o eletrocraqueamento. Estas rotas têm a vantagem de permitir o uso de insumos residuais de baixa pureza e baixo custo (SUAREZ et al., 2009).

3.2 Glicerol bruto

O glicerol é um líquido viscoso, incolor, inodoro, higroscópico e com sabor adocicado. Seu nome oficial pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) é propano-1,2,3-triol (RAMOS, 2008). Sua molécula está representada na Figura 1:

Figura 1 - Molécula de glicerol.

Fonte: ABIQUIM, 2010.

Costuma-se utilizar alternadamente na literatura, termos como glicerol, glicerina e glicerol bruto para designar a mesma substância. O termo glicerol aplica-se somente ao composto puro, 1,2,3 propanotriol, enquanto o termo glicerina aplica-se a produtos comerciais que contêm normalmente grau de pureza igual ou superior a 95% (KNOTHE, 2005). Já o glicerol bruto ou glicerina residual é o nome dado ao glicerol oriundo dos processos de produção do biodiesel, onde a fase glicerinosa sofreu um tratamento ácido para neutralização do catalisador e remoção de ácidos graxos eventualmente formados no processo. Em geral, o glicerol bruto contém cerca de 80% de glicerol, além de água, metanol, sabões, contaminação e sais dissolvidos (MOTA, SILVA; GONÇALVES, 2009).

Segundo Ramos (2008) o glicerol tem três grupos hidroxila (OH-) hidrofílicos que são responsáveis por sua solubilidade em água. É higroscópico; seu ponto de fusão é 17,8°C; evapora com decomposição a 290°C; é miscível com água e etanol e pode ser queimado. Entretanto, a menos que seja queimado a altas temperaturas, libera vapores tóxicos de acroleína, que são formados principalmente entre 200 e 300°C. O glicerol foi descoberto por Scheele em 1779 durante o processo de saponificação de azeite de oliva. Pasteur, em 1858, também observou sua formação como um subproduto do cultivo alcoólico, em concentrações de 2,5-3,6% do conteúdo de etanol, podendo ser o glicerol o segundo maior produto formado durante o cultivo alcoólico (ARRUDA, RODRIGUES; FELIPE, 2007). A Tabela 1 mostra algumas propriedades físico-químicas do glicerol puro.

O glicerol é um poliálcool que está presente em diferentes espécies, incluindo protistas unicelulares e mamíferos (BRISSON et al., 2001). É produzido largamente em resposta à redução da atividade de água extracelular durante a regulação osmótica em leveduras, sendo considerado fundamental dentro do sistema metabólico de microorganismos, onde atua como precursor de vários compostos e como regulador de muitos mecanismos bioquímicos intracelulares (WANG et al., 2001). É difícil encontrar o glicerol na sua forma “livre” nesses organismos, pois geralmente se encontra combinado

com ácidos graxos, como oleico, palmítico e esteárico, na forma de triacilgliceróis. Desta forma, grandes quantidades de glicerol podem ser encontradas também em óleos ou azeites como o de coco, dendê, soja, algodão e oliva (ARRUDA, RODRIGUES; FELIPE, 2007).

Tabela 1- Propriedades físico-químicas do glicerol a 20°C.

Fórmula química	C ₃ H ₈ O ₃
Massa molecular	92,09382 g mol ⁻¹
Densidade	1,261 g cm ⁻³
Viscosidade	1,5 Pa s
Ponto de fusão	18,2°C
Ponto de ebulição	290°C
Calorias	4,32 Kcal g ⁻¹
Ponto de fulgor	160°C
Tensão superficial	64,00 mN m ⁻¹
Coefficiente de temperatura	-0,0598 mN (mK) ⁻¹

Fonte: BEATRIZ, ARAUJO; LIMA (2011).

É possível calcular que, estequiometricamente, 10% de glicerol é formado durante a reação de síntese do biodiesel (GONZALEZ-PAJUELO et al., 2005). No entanto, esse valor é de glicerol puro. O glicerol bruto que é originado na síntese do biodiesel apresenta geralmente 55-90% de pureza. O restante é constituído por impurezas compostas por sais, materiais orgânicos e álcool (MEHER, SAGAR; NAIK, 2006). O excesso de sais e álcool é devido à prática comum de adicionar mais álcool e catalisador do que é estequiometricamente necessário, a fim de aumentar a eficiência do processo e diminuir o tempo de reação. Já os materiais orgânicos são óleos vegetais que não reagiram durante o processo (DOU et al., 2009).

As características físicas, químicas e nutricionais do glicerol bruto dependem do tipo de ácido graxo (gordura animal ou óleo vegetal) e do tipo de catálise empregada na produção do biodiesel. Entretanto seu uso é condicionado ao seu grau de pureza, que deve estar usualmente acima de 95% (SBRT, 2007). Portanto, o glicerol bruto, sem tratamento, com contaminantes demais para uma aplicação útil, torna-se um composto de baixo valor de comercialização e sem aplicações industriais. Entretanto, quando purificado, devido às características de não toxicidade e ausência de cor e odor,

apresenta elevado valor comercial e possui inúmeras possibilidades de aplicações, porém os tratamentos de purificação são de custo excessivamente elevados para pequenos e médios produtores de biodiesel, o que impossibilita esta forma de aproveitamento. Este fato pode ocasionar o descarte no meio ambiente sem qualquer tratamento, gerando problemas e riscos ambientais (AMARAL et al., 2009; ALVES, 2010).

Os processos para a purificação do glicerol incluem filtração, destilação a vácuo, descoloração e troca de íons para a remoção principalmente de K^+ e Na^+ utilizados como catalisadores (YONG et al., 2001). Devido a isso, plantas de pequeno e médio porte geralmente não são capazes de purificar a baixo custo o glicerol bruto que poderia ter aplicações mais nobres, como em indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosméticas (PACHAURI; HE, 2006). Algumas empresas produtoras de biodiesel vendem o glicerol bruto a preços que variam de R\$ 0,10 a R\$ 0,50 por quilograma, outras o queimam para produzir energia, sendo que em locais com alta concentração de indústrias de síntese de biodiesel, as empresas geralmente estocam o material, sem dar destino específico ao mesmo (BATISTA, 2008). Não sabendo o que fazer com este coproduto, algumas empresas já estão diminuindo a sua produção por não ter um destino pré-estabelecido (SILVEIRA, 2011).

Em alguns países europeus, a indústria do biodiesel está inundando o mercado da glicerina, com o glicerol bruto sendo tratado, atualmente, como um novo tipo de efluente industrial, devido ao aumento na demanda da produção de biodiesel e outros óleos, gerando excesso desse coproduto (MU, XIU; ZHANG, 2008). Como consequência, os preços caíram e a maioria das empresas que produziam glicerina sinteticamente a partir de cloreto de alila via epiclorigrina fecharam. Na União Européia, algumas empresas de biodiesel têm tido problemas para descartar o excesso de glicerol bruto, e mantê-lo em depósitos torna-se muito caro (DHARMADI, MURARKA; GONZALEZ, 2006). A indústria química voltada para petroquímica nem sempre é eficaz no tratamento destes recursos biológicos. Desta forma, a busca de alternativas biotecnológicas se faz necessária. Entre estes recursos biológicos, a utilização de resíduos de glicerol tem se tornando importante, pois a quantidade de resíduos vem aumentando ano após ano através do aumento da produção de biodiesel e outros óleos químicos (MA et al., 2012).

Até 2003 a produção anual mundial de glicerol era inferior a 1 milhão de $t.an^{-1}$. Ultrapassou os 2 milhões de $t.an^{-1}$ em 2010, quando ocorreu a implantação do B5. Em

2013 estima-se que a produção nacional de glicerol bruto foi de 292 milhões de litros, aproximadamente 26 vezes superior ao consumo nacional, que é de cerca de 11 milhões de litros anuais (ANP, 2014). Cabe salientar que atualmente as indústrias de biodiesel no Brasil operam com apenas 47% da sua capacidade instalada, ou seja, há uma disponibilidade de ampliação de produção de 53%. Como consequência, o glicerol bruto tem se tornado um grande problema para indústria do biodiesel e um risco ambiental devido à sua deposição em locais inadequados.

Esse aumento significativo da oferta obriga o desenvolvimento de novas aplicações para o glicerol além daquelas já tradicionalmente conhecidas, ou ele pode vir a ser mais um grande problema econômico e ambiental, que poderá frear o crescimento da indústria nacional do biodiesel (FAIRBANKS, 2009).

3.3. Cultivos microbianos

Os bioprodutos geralmente são produzidos em escala industrial através de dois sistemas de cultivo, conforme a quantidade de água presente no meio, e são classificados como cultivo submerso ou cultivo em estado sólido. Os cultivos em estado sólido, ou em superfície, são aqueles em que tanto o crescimento do micro-organismo como a formação do produto se verificam em meio sólido, a partir de sua superfície. O meio neste caso é matéria orgânica, com umidade ajustada à atividade de água do micro-organismo. Quando o cultivo em superfície é desenvolvido sobre farelos ou outros substratos sólidos, mas umedecidos, também recebe o nome de cultivo semi-sólido ou em estado sólido. Nos cultivos submersos, ou em profundidade, o crescimento do micro-organismo e a formação do produto se desenvolvem no seio do meio nutritivo líquido, o mosto. Se este está em contato com o ar ou for aerado, o micro-organismo necessariamente é aeróbio (REGULY, 2000).

De uma forma geral, um reator biológico pode ser conduzido de maneira descontínua, semicontínua e contínua. No cultivo descontínuo ou por batelada, uma quantidade fixa de meio é colocada no biorreator, onde recebe o inóculo, sendo o produto formado separado, recuperado do meio, após um tempo de permanência ditado pela cinética do processo (REGULY, 2000). Nos cultivos em batelada para produção de lipídios, os minerais e o substrato com a fonte de carbono são adicionados com uma proporção inicial de razão C/N elevada para impulsionar o acúmulo de lipídios. Como o

nitrogênio é consumido ativamente desde o início do cultivo, a razão $C_{\text{residual}}/N_{\text{residual}}$ aumenta continuamente, tendendo ao infinito. Desta forma, o crescimento exponencial permanece enquanto o nitrogênio não é limitante (BEOPOULOS et al., 2009).

O processo de cultivo contínuo caracteriza-se por possuir uma alimentação contínua de meio de cultura a uma determinada vazão constante, sendo o volume de reação mantido constante através da retirada contínua de caldo fermentado (BORZANI et al., 2001). Ou seja, quando determinado parâmetro cinético é atingido, a alimentação do mosto passa a ser contínua, havendo concomitante e contínua retirada de mosto fermentado, igualando vazão e alimentação (REGULY, 2000). Nos cultivos contínuos, a razão C/N e a razão $C_{\text{residual}}/N_{\text{residual}}$ no meio de cultivo são constantes para uma dada taxa de diluição. Em taxas de diluição baixas, uma razão C/N intermediária ($40 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$) atua promovendo maior acúmulo de lipídios. A concentração de biomassa e de lipídios é maior que as obtidas em diluições maiores. Quando a razão $C_{\text{residual}}/N_{\text{residual}}$ ocorre em proporções semelhantes, uma velocidade específica de crescimento menor promove o acúmulo de lipídios (BEOPOULOS et al., 2009).

Em batelada alimentada, operações intermitentes, tanto no fluxo de entrada do meio quanto na saída de material fermentado, são repetidas enquanto não houver queda na produtividade do processo (BORZANI et al., 2001). A produção de lipídios por leveduras deve ser reprodutível. Se a produção de lipídios é para ser controlada, a regulação das variáveis se faz necessária para maximizar a estabilidade do estado metabólico. Essa estabilidade pode ser alcançada mediante controle preciso da taxa de fluxo de nutrientes. Nos cultivos em batelada alimentada, os fluxos de nitrogênio e carbono são monitorados para controlar a velocidade específica de crescimento e a razão C/N. A fase de acúmulo de lipídios é a mais extensa e corresponde à produção constante de lipídios sob constante limitação de nitrogênio com uma razão C/N por volta de $20 \text{ mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, prevenindo a produção do ácido cítrico (BEOPOULOS et al., 2009).

Abordagens de engenharia devem ser utilizadas tanto na genética quanto em processos para se obter maior produtividade lipídica, conteúdo lipídico mais elevado e maior produção de biomassa, todas voltadas para tornar o processo mais viável economicamente. Diferentes modos de cultivo, incluindo modo contínuo e de batelada alimentada, têm sido relatados por aumentar a densidade de células de micro-organismos oleaginosos em cultivos (THIRU, SANKH; RANGASWAMY, 2011).

3.4. Leveduras oleaginosas

Micro-organismos capazes de acumular lipídios em nível superior a 20% de sua biomassa são descritos como oleaginosos. Das mais de 1600 espécies de leveduras conhecidas não mais que 40 foram consideradas oleaginosas (SITEPU et al., 2013). Os lipídios são produzidos por todos os micro-organismos normalmente na faixa de 6 a 8%, principalmente como componentes da membrana celular. No entanto, micro-organismos oleaginosos, incluindo as leveduras, bactérias, fungos filamentosos e microalgas, são capazes de converter uma fonte de carbono, quando em excesso, em triacilgliceróis intracelulares (TAG), logo que ocorre uma limitação de nitrogênio (RATLEDGE, 2002). Estes lipídios são armazenados na forma de gotículas de lipídios no interior das células. Entre os micro-organismos, leveduras, unicelulares, desprovidas de endotoxinas, passíveis de melhoramento genético e apropriadas para cultivos em grande escala, são particularmente atraentes para o desenvolvimento de abordagens biotecnológicas (BEOPOULOS, NICAUD; GAILLARDIN, 2011).

Gêneros de leveduras identificadas como oleaginosas, porém não limitadas apenas por essa propriedade, são: *Yarrowia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodospodium*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* e *Lipomyces*. Mais especificamente, capazes de sintetizar lipídios, incluem: *Rhodospodium toruloides*, *Lipomyces starkeyi*, *Lipomyces lipofer*, *Candida revkaufi*, *Candida pulcherrima*, *Candida tropicalis*, *Candida utilis*, *Rhodotorula minuta*, *Trichosporon pullulans*, *Trichosporon cutaneum*, *Cryptococcus curvatus*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula graminis* e *Yarrowia lipolytica* (PAN et al., 2009; AGEITOS et al., 2011). Em média, essas leveduras acumulam lipídios em um nível correspondente a 40% de sua biomassa. No entanto, em condições de limitação de nutrientes, eles podem acumular lipídios em níveis superiores a 70% de sua biomassa (LI et al., 2010).

Alguns estudos incluem *Saccharomyces cerevisiae*, usada como modelo genético, e que apesar de não ser uma levedura oleaginosa, têm melhorado bastante a compreensão do metabolismo lipídico, pois as enzimas envolvidas na biossíntese de triacilgliceróis, armazenamento e degradação são muito semelhantes entre as espécies, e particularmente entre as leveduras. Entretanto, ao contrário da *Saccharomyces cerevisiae*, que produz quantidades similares de triacilgliceróis e ésteres, *Yarrowia lipolytica* armazena, principalmente triacilgliceróis (> 90%). Esta levedura também é incomum

por acumular quantidades significativas de ácidos graxos livres dentro de sua célula (CZABANY, ATHENSTAEDT; DAUM, 2007). As leveduras utilizadas na produção de cerveja ou fermento para panificação (*Saccharomyces cerevisiae*) ou em alimentos, como *Candida utilis*, são normalmente incapazes de acumular mais de 5-10% de sua biomassa em óleo, mesmo quando cultivadas da mesma maneira que as outras leveduras como *Rhodotorula spp.*, *Lipomyces starkeyi* e *Cryptococcus curvatus*, que podem acumular de 40 a 70% de sua biomassa em lipídios (RATLEDGE, 2002).

As Tabelas 2 e 3 apresentam dados relativos ao conteúdo lipídico e ao perfil de ácidos graxos de diversas leveduras oleaginosas. Pode-se observar que os valores podem ser bastante diferentes, mesmo em leveduras do mesmo gênero, podendo ser influenciados por variações nas condições de cultivo e substrato empregados.

As leveduras oleaginosas apresentam um perfil de ácidos graxos semelhante aos de óleos extraídos de plantas (Tabela 3), contendo principalmente ácidos graxos saturados ou monoinsaturados com 16 a 18 átomos de carbono (ZHAO et al., 2008; PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2011). Microalgas e fungos filamentosos produzem quantidades significativas de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) como ω -3, ω -6, ácido gama-linolênico (GLA), ácido araquidônico, ácido docosahexaenoico (DHA) e ácido eicosapentaenoico (EPA), ácidos graxos usualmente extraídos de óleos de peixes (LI, DU; LIU 2008).

Em comparação com os óleos obtidos de plantas, os óleos microbianos têm muitas vantagens, tais como ciclo de vida curto, menor mão de obra empregada, além de não ser afetado pelo local, estação ou clima, sem nenhuma exigência de extensas terras aráveis, podendo ser produzido em sistemas fechados e permitindo ampliação de escala (ZHU, CHEN; FANG, 2008; THIRU, SANKH; RANGASWAMY, 2011; LIANG; JIANG, 2013). Mais que isso, tem sido reportado que o óleo de fonte microbiana pode ser obtido utilizando substratos de baixo custo como soro de leite, glicerol bruto, gordura bruta, ou mesmo os óleos obtidos através de pirólise (ZHAO et al., 2008).

Tabela 2 - Conteúdo lipídico % (m/m) de diferentes espécies de leveduras cultivadas em condições e meios de cultivo distintos.

Levedura	Substrato	Lipídios %	Referência
<i>Candida sp. 107</i>	Glicose	42	Beopoulos et al. (2009)
<i>Candida curvata</i>	Glicose	58	Meng et al. (2009)
<i>Cryptococcus curvatus</i>	Glicerol bruto	44,6	Liang et al. (2010)
<i>Cryptococcus music</i>	Glicose	44,7	Tanimura et al. (2014)
<i>Kodamaea ohmeri</i>	Glicerol bruto	53,3	Kitcha; Cheirsilp (2011)
<i>Lipomyces starkeyi</i>	Xilose	52,6	Kong et al. (2007)
<i>Pichia segobienses</i>	Glicose	24,6	Schulze et al. (2014)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Melaço de cana	51,7	Karatay; Dönmez (2010)
<i>Rhodotorula toruloides</i>	Glicose	58	Liu; Zhao (2007)
<i>Trichosporon cutaneum</i>	Sabugo de milho	32,1	Gao et al. (2014)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Glicerol bruto	43	Papalikolaou; Aggelis (2002)

Tabela 3 - Perfil de ácidos graxos obtidos de diferentes espécies de leveduras.

Espécie	Teor relativo de ácidos graxos totais (%)					
	C 16:0	C 16:1	C 18:0	C 18:1	C 18:2	C 18:3
<i>Cryptococcus curvatus</i>	25	T ^a	10	57	7	0 ^b
<i>Cryptococcus albidus</i>	12	1	3	73	12	0
<i>Candida sp. 107</i>	44	5	8	31	9	1
<i>Lipomyces starkeyi</i>	34	6	5	51	3	0
<i>Rhodotorula glutinis</i>	37	1	3	47	8	0
<i>Rhodotorula graminis</i>	30	2	12	36	15	4
<i>Trichosporon pullulans</i>	15	0	2	57	24	1
<i>Yarrowia lipolytica</i>	11	6	1	28	51	1

* Ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoleico (C16:1), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2), ácido linolênico (C18:3). T^a: traço. 0^b: não detectado.

Fonte: BEOPOULOS et al. (2009).

Os custos da produção microbiana de lipídios incluem os custos com a matéria-prima (substrato), custos do cultivo microbiano (monitoramento, custos operacionais, controle) e os custos de recuperação do produto. Os custos com a matéria-prima podem

facilmente ser diminuídos, conforme exposto acima, utilizando-se resíduos ou substratos de baixo valor agregado. Entretanto, o maior desafio encontrado para a produção microbiana de lipídios é superar os custos elevados do rompimento celular. Diante disso, atualmente, o biodiesel derivado de micro-organismos é economicamente insustentável por apresentar custos de produção mais elevados que os obtidos a partir de culturas agrícolas (SCHNEIDER et al., 2013). O estabelecimento de um processo de produção econômico, implica em aumentar o volume de lipídios produzidos bem como produzir ácidos graxos de interesse (SCHULZE et al., 2014).

É desejável a utilização de linhagens que demandem curtos tempos de cultivo, ou seja, tenham elevada velocidade específica de crescimento, não produzam pigmentos indesejáveis, tenham exigência de aeração reduzida, exibam espumação decrescente durante o processo e que sejam capazes de metabolizar substratos de baixo custo. No caso do uso da biomassa ou seus produtos metabólicos para fins de alimentação, é também importante adotar micro-organismos seguros, certificados como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) (CRUEGER; CRUEGER 1984; POLI et al., 2013).

Para avaliar a capacidade de um micro-organismo oleaginoso de acumular lipídios, o parâmetro teor de lipídios (em % da biomassa seca) é o mais utilizado (SONG et al, 2013). Há outros que derivam deste, como, por exemplo, a concentração de lipídios ou lipídios totais produzidos ($g_{lipídios} \cdot L^{-1}$); coeficiente lipídico (rendimento lipídico por consumo de glicose, em $g_{lipídios} \cdot g_{glicose}^{-1}$); concentração de biomassa ($g_{células} \cdot L^{-1}$); e produtividade de lipídios (taxa específica de produção de lipídios, em $g_{lipídios} \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$). Contudo, a produtividade lipídica está recebendo grande atenção por ser de suma importância a seleção de linhagens de leveduras com rápido crescimento e capacidade de acumular elevado teor de lipídios (ORDOG et al., 2013).

3.4.1. *Yarrowia lipolytica*

A levedura oleaginosa *Yarrowia lipolytica* pode ser uma boa opção na produção de óleo microbiano e tem sido extensivamente usada na produção de ácidos orgânicos como ácido cítrico e ácido pirúvico, proteínas e enzimas como proteases e lipases usadas para biorremediação. É uma levedura robusta, capaz de crescer em uma variedade de substratos e sintetizar lipídios a partir de resíduos agroindustriais, glicerol bruto e gorduras industriais, acumulando, geralmente, mais de 36% de sua massa seca em lipídios (PAPANIKOLAOU et al., 2002). Mais de 80% dos lipídios de

armazenamento produzidos por esta levedura estão na forma de triacilgliceróis (TAG) (ATHENSTAED et al., 2006).

É a única levedura estritamente aeróbia com capacidade de degradar eficientemente substratos hidrofóbicos, tais como n-alcanos, ácidos graxos, gorduras e óleos, para os quais possui percursos metabólicos específicos (FICKERS et al., 2005). A capacidade de degradar substratos hidrofóbicos está ligada à alta hidrofobicidade da superfície dessa levedura. A interação entre as células e as superfícies hidrofóbicas ou moléculas é mediado por proteínas ou glicoproteínas da parede celular. O crescimento de micro-organismos em um substrato hidrofóbico requer o transporte do substrato da fase orgânica para a superfície celular e o contato entre a célula e o substrato (AMARAL et al., 2009).

Poli et al. (2013) selecionaram a levedura identificada como *Yarrowia lipolytica* QU21 dentre 86 leveduras isoladas a partir de queijos produzidos artesanalmente, como a mais promissora no acúmulo de lipídios, apresentando também perfil de ácidos graxos semelhante aos dos óleos vegetais comumente utilizados na produção de biodiesel, com o predomínio de ácidos graxos saturados e monoinsaturados.

Makri, Fakas; Aggelis (2010), estudando *Yarrowia lipolytica* utilizando glicerol como fonte de carbono num cultivo em bateladas sequenciais, encontraram composição diferente de ácidos graxos das frações lipídicas durante o crescimento. O ácido oleico (C18: 1) foi o ácido graxo predominante independentemente da fase de crescimento e da fração analisada. Os ácidos palmítico (C16: 0), palmitoleico (C16: 1), esteárico (C18: 0) e linoleico (C18: 2) também foram encontrados em quantidades significativas nas estruturas dos lipídios. A fração de fosfolipídios continha baixos percentuais de ácidos graxos saturados, entretanto esta fração estava enriquecida com ácido linoleico, especialmente na fase de produção de ácido cítrico. Igualmente nesta fase, os lipídios neutros, compostos principalmente de triacilgliceróis, também estavam enriquecidos com ácido linoleico.

Segundo Beopoulos et al. (2009), *Yarrowia lipolytica*, apesar de acumular lipídios em níveis inferiores a outras espécies de oleaginosas, é conhecida por ser capaz de acumular uma percentagem elevada de ácido linoleico (mais de 50% dos resíduos de ácidos graxos presentes).

Tai; Stephanopoulos (2013), em estudo combinando dois genes e utilizando a co-expressão simultânea de diacilglicerol aciltransferase (DGA1) e acetil-CoA carboxilase (ACC1), demonstraram a capacidade de produção de lipídios por *Yarrowia*

lipolytica, bem como os efeitos da engenharia metabólica nas 2 principais etapas do processo de síntese de lipídios, desviando o fluxo para a síntese de lipídios e criando força motriz para síntese de TAG.

3.4.2. *Cryptococcus curvatus*

A levedura *Cryptococcus curvatus* possui interesse especial como produtora de óleo. Esta levedura requer apenas os nutrientes mínimos para o crescimento e pode acumular até 60% de sua massa seca como corpos lipídicos intracelulares (HASSAN et. al., 1996). O óleo acumulado se assemelha a óleos vegetais de sementes, tais como óleo de palma, em termos de composição em ácidos graxos e, principalmente, triacilgliceróis (80-90%). Além disso, cresce em uma ampla gama de substratos, incluindo: açúcares (como glicose, xilose, galactose, manose, frutose, ribose, maltose, celobiose, sacarose e lactose), glicerol e soro de leite concentrado (LIANG et. al., 2010). Esses autores reportam que *Cryptococcus curvatus* pode crescer em glicerol bruto e que o cultivo em batelada alimentada é mais eficiente na assimilação de glicerol e consequente produção de lipídios que o cultivo em batelada e que o metanol não apresenta um efeito inibitório significativo.

Yu et al. (2011) demonstraram que, dentre as leveduras *Rhodotorula glutinis*, *Rhodospiridium toruloides*, *Lipomyces starkeyi*, *Yarrowia lipolytica* e *Cryptococcus curvatus*, esta última se mostrou mais eficiente na produção de biomassa e de lipídios utilizando, como substrato, palha de trigo pré hidrolisada com solução diluída de ácido sulfúrico. A elevada tolerância aos inibidores furfural proveniente das pentoses, e 5-hidroxiacetilfurfural das hexoses, sugere que a destoxificação do hidrolisado não é necessária para o crescimento e produção de lipídios por esta levedura, simplificando assim o cultivo microbiano, eliminando a etapa de destoxificação e viabilizando a produção de biodiesel a partir de materiais lignocelulósicos.

Ryu et al. (2013) demonstraram em estudo que resíduos orgânicos da indústria cervejeira podem servir como substrato para cultivo de micro-organismos heterotróficos, em especial a levedura *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509. Como não é necessário realizar pré-tratamento para a extração dos nutrientes, esses cultivos heterotróficos têm custos reduzidos, tornando-se viáveis economicamente segundo análise de custos, além dos ótimos resultados obtidos no perfil de ácidos graxos, que implicam na qualidade adequada desses lipídios para produção de biodiesel.

3.4.3. *Rhodotorula glutinis*

Rhodotorula glutinis é uma levedura oleaginosa capaz de ativar os ácidos graxos não-esterificados para a síntese de triacilgliceróis. Na levedura *Rhodotorula glutinis* os ácidos graxos são ativados de maneira dependente do ATP antes de serem usados. Gangar, Raychaudhuri; Rajasekhran (2002) demonstraram que uma enzima, a proteína transportadora de acila acil (ACP), desempenha um papel importante na ativação de ácidos graxos para a síntese de triacilgliceróis. Há evidências que sugerem que esse organismo tem potencial para ser uma importante fonte de ácidos graxos.

Easterling et al. (2009) compararam a capacidade de acúmulo de lipídios por *Rhodotorula glutinis* quando cultivada nos substratos glicose, xilose, glicerol e suas combinações. Este estudo demonstrou que o glicerol puro pode ser combinado com outras fontes de carbono, como glicose e xilose, para servir como fonte de carbono e energia para esta levedura oleaginosa. Os resultados demonstraram uma diferença no grau de saturação com as fontes de carbono testadas. As células cultivadas somente em glicerol apresentavam o mais alto grau de ácidos graxos insaturados, em torno de 53%, enquanto que a xilose apresentou o menor, em torno de 25%, e concluíram que a levedura *R. glutinis* pode ser cultivada em todos os açúcares testados como substratos, simples ou em misturas.

De acordo com Xue et al. (2010) a levedura oleaginosa *Rhodotorula glutinis*, conhecida por acumular elevadas concentrações de lipídios em sua célula, é capaz de utilizar águas residuárias da produção de amido de milho como substrato, para a produção dos mesmos. *Rhodotorula glutinis* apresenta elevada taxa de crescimento celular em condições aeróbicas, onde há consumo elevado de O₂ e emissão de CO₂. Segundo Yen; Zhang (2011), pequenas quantidades de O₂ dissolvido podem retardar o crescimento e aumentar o acúmulo de lipídios. Além disso, Yen; Yang (2012), em estudo subsequente, reportam que a irradiação com lâmpadas LED poderia estimular a síntese de um pigmento capaz de resistir aos danos causados pela luz e, com isso, afetar a taxa de crescimento celular e o acúmulo de lipídios na célula.

Zhang et. al. (2014) utilizaram o efeito sinérgico do cultivo da levedura *Rhodotorula glutinis* CGMCC 2258 com a microalga *Chlorella vulgaris*, que resultou em um aumento significativo na concentração de biomassa e na produtividade lipídica. A relação simbiótica e o efeito sinérgico das duas espécies para o crescimento celular e

o acúmulo de lipídios foram demonstrados pelo balanço de O₂/CO₂, troca de substâncias, oxigênio dissolvido e ajuste do pH.

3.4.4. *Rhodosporidium toruloides*

A levedura oleaginosa *Rhodosporidium toruloides*, cuja espécie é anamórfica da *Rhodotorula glutinis*, tem sido amplamente divulgada como uma potencial produtora de lipídios (LI et al., 2007). Além disso, esta espécie, muitas vezes denominada levedura vermelha, tem sido relatada como fonte de carotenoides que apresentam elevado interesse comercial uma vez que são utilizados como corante alimentar natural e aditivo alimentar em aquicultura (FRENGOVA; BESHKOVA, 2009).

Freitas et al. (2014), utilizando xarope de polpa de alfarroba e melão de cana como substratos alternativos de baixo custo para a produção de lipídios e carotenoides pela levedura *Rhodosporidium toruloides* NCYC 921, obtiveram maior produção de carotenoides e acúmulo de lipídios quando utilizaram o xarope de polpa de alfarroba como fonte de carbono nos cultivos. Quando cultivada em xarope de polpa de alfarroba, a levedura *Rhodosporidium toruloides* apresentou perfil de ácidos graxos predominantemente composto por ácidos graxos monoinsaturados com destaque para o ácido oleico, demonstrando que o xarope de polpa induziu uma composição de ácidos graxos adequada para a produção de biodiesel.

Lian, Garcia-Perez; Chen (2013), em estudo que visava identificar leveduras capazes de converter diretamente levoglucosano (produto de conversão termoquímica) em lipídios, selecionaram *Rhodosporium toruloides* ATCC10788 e *Rhodotorula glutinis* ATCC204091 como as mais promissoras, com altas taxas de conversão de levoglucosano em lipídios (semelhante às da glicose). A utilização de anidro de açúcar é fundamental para garantir o desenvolvimento e a viabilidade econômica da produção de biocombustíveis a partir da pirólise de lignocelulósicos, devido à concentração significativa de levoglucosano no óleo de pirólise.

Jin et al. (2012) demonstraram um processo eficiente e de baixo custo para a extração de lipídios da levedura *Rhodosporidium toruloides* Y4. O processo utilizando extração enzimática à temperatura ambiente utilizando acetato de etila como solvente de extração apresentou condições operacionais suaves e compatibilidade com o alto teor de umidade da matéria-prima, podendo também, provavelmente, ser aplicado em outras espécies de leveduras, reduzindo substancialmente os custos com a produção

microbiana de lipídios, visto que os processo de recuperação de lipídios que vem sendo utilizados são demasiadamente demorados e onerosos.

3.4.5. *Lipomyces starkeyi*

O habitat natural da *Lipomyces starkeyi* é o solo e a ensilagem, onde degrada carboidratos utilizando carbohidrolases extracelulares. A produção de α -amilase, dextranase e a biodegradação de herbicidas de triazina têm tornado *Lipomyces starkeyi* objeto de estudos (ANGERBAUER et al., 2008). *Lipomyces starkeyi* é uma típica levedura oleaginosa conhecida por acumular lipídios em níveis superiores a 40% de sua massa seca. Como os lipídios produzidos são concentrados em um ou dois corpos lipídicos grandes, dentro da célula, é possível observar esse acúmulo. Alguns compostos orgânicos naturais, como ácido anacárdico e glicerol-3-fosfato-desidrogenase, os quais estão presentes em plantas, mais especificamente nas sementes de Ginkgo biloba, apresentaram efeito inibitório no acúmulo de lipídios por esta levedura (KIMURA, YAMAOKA; KAMISAKA, 2006). Outro dado importante é que quando comparada com outras leveduras oleaginosas como *Candida curvata*, *Trichosporon cutaneum* e *Rhodospiridium toruloides*, *Lipomyces starkeyi* apresentou apenas reutilização mínima de seus lipídios acumulados (HOLDSWORTH, VEENHUIS; RATLEDGE, 1988).

Pirozzi et al. (2013) demonstraram que a levedura *Lipomyces starkeyi*, quando cultivada em meio de cultivo contendo águas residuárias de uma indústria produtora de queijos, foi capaz de acumular elevadas concentrações lipídicas bem como produzir matéria-prima apropriada para síntese alternativa de biodiesel de 2ª geração, visto que houve equilíbrio de ácidos graxos saturados e insaturados, proporcionando assim a síntese de um biodiesel com excelente desempenho a frio e boa estabilidade oxidativa.

Dentre as leveduras conhecidas como oleaginosas, *Lipomyces starkeyi* exhibe características de grande interesse, como alta flexibilidade em relação à fonte de carbono utilizada e condições de cultivo empregadas, além de uma composição de ácidos graxos semelhante à de óleos vegetais. Apesar de todo seu potencial, a produção de lipídios por *Lipomyces starkeyi* ainda não é economicamente viável, principalmente devido a limitações de produtividade das linhagens do tipo selvagem (AGEITOS et al., 2011). Tapia et al. (2012) deram um passo importante na otimização genética da levedura *Lipomyces starkeyi* DSM 70296, embora estudos adicionais ainda sejam necessários, demonstrando que a otimização de um gene pode ser utilizada para se obter

características desejáveis, por meio de metodologias evolutivas, a fim de acelerar a fixação e reprodução de traços genéticos com interesse industrial.

3.5. Substratos alternativos utilizados na produção de lipídios por leveduras oleaginosas

O valor do produto final está diretamente ligado ao custo dos ingredientes utilizados no meio de cultivo. Em cultivos industriais, a contribuição das matérias-primas no custo da produção final pode variar de 5 até 50%. A meta do cultivo microbiano é sempre a redução do custo total através do aumento do rendimento e da utilização de ingredientes com menor custo no processo (ROEPCKE, 2007).

Leveduras oleaginosas, por serem heterotróficas, necessitam de substratos com fonte de carbono orgânico. No entanto, muitas vezes os gastos com esse substrato são demasiados e a viabilidade econômica do processo é limitada pelos custos do meio de cultivo. Quando, por exemplo, a glicose é utilizada como substrato, resulta em mais de 60% dos custos totais da produção do biodiesel produzido a partir de óleos microbianos (FEI et al., 2011), sendo que o recomendado é que não ultrapasse os 30% (KARATAY; DÖNMEZ, 2010). Diante disso, o uso de matérias-primas alternativas de baixo custo e amplamente disponíveis tem recebido interesse especial e estudos vêm sendo realizados visando encontrar substratos que reduzam os custos, como derivados de resíduos orgânicos, incluindo palha de trigo, bagaços, sabugo de milho, inulinas, pectinas e amido de mandioca. Todos são potenciais substratos de baixo custo, no entanto exigem algum tipo de pré-tratamento que pode aumentar o custo global de produção (RYU et al., 2013). Entretanto, substratos como glicerol bruto, xilose, dextrose, xarope da polpa de alfarroba, melão de cana, levoglucosano e águas residuárias de queijarias vem sendo utilizados sem a necessidade de pré-tratamento (Tabela 4).

Tabela 4 - Substratos alternativos utilizados na produção de lipídios por leveduras oleaginosas.

Substrato	Levedura	Referência
Glicerol bruto	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Makri et.al. (2010)
Sabugo de milho hidrolisado	<i>Trichosporon cutaneum</i>	Gao et al. (2014)
Palha de trigo hidrolisada	<i>Cryptococcus curvatus</i>	Yu et al. (2011)
Resíduos orgânicos da indústria cervejeira	<i>Cryptococcus curvatus</i>	Ryu et al. (2013)
Dextrose , xilose, glicerol	<i>Rhodotorula glutinis</i>	Easterling et al. (2009)
Águas residuárias	<i>Rhodotorula glutinis</i>	Xue et al. (2010)
Xarope da polpa de alfarroba e melaço de cana	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	Freitas et al. (2014)
Levoglucosano	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	Lian et al. (2013)
Águas residuárias de queijarias	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Pirozzi et al. (2013)
Inulina hidrolisada e tubérculos de alcachofra	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Zhao et al. (2010)
Amido de mandioca	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Li et al. (2010)

3.5.1. Aproveitamento do glicerol bruto na produção de lipídios

A conversão biológica tem gerado bastante interesse nos últimos anos, principalmente na produção de bioprodutos. O glicerol bruto pode ser utilizado como fonte de carbono por diferentes micro-organismos em bioconversões microbianas para a produção de uma grande gama de químicos, os quais podem ser utilizados como produtos finais ou como precursores para produção de outros químicos. Destaca-se a produção de dihidroxiacetonas, ácidos succínico, propiônico e cítrico, pigmentos, biosurfactantes e lipídios (LEONETI, ARAGÃO-LEONETI; OLIVEIRA, 2012). Assim, a atenção está focada sobre a viabilidade da substituição de fontes de carbono convencionais por glicerol (MORITA et al., 2007).

A utilização do glicerol em processos microbianos é de grande importância, visto que é um composto considerado fundamental dentro do sistema metabólico de micro-organismos, atuando como precursor de numerosos compostos e como regulador de diversos mecanismos bioquímicos intracelulares. O transporte do glicerol através da membrana celular constitui a primeira etapa para seu metabolismo. O glicerol é um dos

poucos substratos que atravessa a membrana celular por difusão, facilitada pelas proteínas localizadas nas camadas mais internas da membrana plasmática, as permeases (RIVALDI et al., 2009).

Em eucariotos, o glicerol é transformado em intermediários da via glicolítica, quer através da fosforilação direta a glicerol-3-fosfato e subsequente desidrogenação, ou via oxidativa com desidrogenação do glicerol e posterior fosforilação do produto da reação (MAKRI, FAKAS; AGGELIS, 2010). O produto destas reações é o fosfato de dihidroxiacetona, que pode ser transformado em ácido cítrico, lipídios de armazenamento e diversos outros produtos. Estes eucariotos não só contêm lipídios na membrana, como também acumulam lipídios na forma de triacilglicerol (EASTERLING et al., 2009). Na verdade, a bioconversão de glicerol em óleo é considerada uma alternativa para diminuir os custos do processo da produção de biodiesel com reciclagem simultânea de glicerol (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2009).

O glicerol pode ser utilizado como substituto aos tradicionais carboidratos, como glicose, sacarose e amido, em cultivos microbianos (SILVA, MACK; CONTIERO, 2009). Entretanto, o principal problema para a utilização do glicerol bruto em cultivos microbianos é a grande quantidade de sais de cloreto oriundos da síntese de biodiesel via catálise básica, o qual pode inibir o crescimento microbiano e diminuir a formação de produtos (ZHU, CHEN; FANG, 2013).

O glicerol, como análogo de lipídios, pode desempenhar um papel positivo no acúmulo dos mesmos. Papanikolaou et al. (2008) relatam que o aumento da concentração de glicerol no meio de crescimento aumentou, de alguma forma, o teor de ácidos graxos insaturados dos lipídios. A utilização de glicerol e estearina como co-substratos resultou em maior síntese de lipídios e aumento da produção de ácido cítrico do que a combinação de glicose e estearina. Resumidamente, os autores sugerem que o glicerol como única fonte de carbono no meio de crescimento pode ter efeito positivo sobre o acúmulo de lipídios pelas leveduras oleaginosas.

No futuro, com o desenvolvimento em grande escala de biodiesel, o glicerol como coproduto será ainda mais produzido, e a utilização de glicerol bruto para a produção de óleo a partir de leveduras pode ser uma alternativa interessante, com grandes perspectivas. Embora existam muitos trabalhos como otimização de processos e ampliação de escala que precisam ainda ser realizados, a utilização de fontes de carbono

pouco dispendiosas para a produção de óleo por levedura abre um novo caminho para a redução de custo da produção de biodiesel (LI, DU; LIU, 2008).

A bioconversão de glicerol agrega valor significativo à cadeia produtiva do biodiesel e muitos estudos têm tido este enfoque. Apesar da utilização de glicerol bruto como fonte de carbono em meios de cultivo apresentar grande vantagem em relação ao glicerol puro, principalmente em termos de custos, na literatura relativamente poucos estudos têm sido propostos usando-o como fonte de carbono. O desenvolvimento de processos para converter glicerol bruto em produtos de alto valor é uma necessidade urgente e uma oportunidade para o desenvolvimento de biorrefinarias (SANTOS et al., 2012).

3.6. Fatores que exercem influência no acúmulo de lipídios por leveduras

Juntamente com a seleção da melhor linhagem e do melhor e mais barato substrato a ser utilizado em cultivos microbianos, o desenvolvimento de um processo produtivo robusto e eficiente se faz necessário. Monitorar o cultivo, tanto no que diz respeito ao micro-organismo quanto ao meio de cultura utilizado, procurando manter a produtividade constante desde os cultivos testes até a ampliação de escala, é primordial, uma vez que os mesmos podem ser afetados por diversas variáveis (AMI et al., 2014).

O acúmulo de lipídios em leveduras depende principalmente da fisiologia destes micro-organismos. Entretanto, tem sido relatado, extensamente, que as condições de cultivo empregadas, como relação C/N, recursos de nitrogênio, temperatura, pH, oxigênio, concentração de oligoelementos e sais inorgânicos influenciam o acúmulo e as características dos lipídios produzidos pelas leveduras (LI, DU; LIU, 2008; GRIFFITHS; HARRISON 2009).

A transição do crescimento para o acúmulo de lipídios geralmente ocorre quando o excesso de carbono no meio está associado a uma limitação de nutrientes. A limitação de nitrogênio é geralmente a mais utilizada (MENG et al., 2009). Sob estas condições, o nitrogênio presente no meio de cultivo é rapidamente consumido durante o aumento da concentração celular enquanto o carbono continua a ser assimilado para produção dos lipídios (GALAFASSI et al., 2012). De acordo com Beopoulos et al. (2009), a estratégia de cultivo envolve duas fases em função do metabolismo da levedura. A primeira é a fase de crescimento. O crescimento da levedura é então retardado por limitação de nitrogênio e a fase de acúmulo de lipídios começa. O rendimento global de conversão

da fonte de carbono em lipídios depende da duração da fase de crescimento e da transição para a fase de acumulação. A duração da fase de crescimento depende da razão C/N. Estudos têm demonstrado que quanto mais compostos nitrogenados contidos no meio, menos lipídios contidos nas células (LIU, YANG; SHI, 2000). Diante disso, à medida que se aumenta a razão C/N, aumenta-se, também, o acúmulo de lipídios em leveduras. Porém, essa relação tem um limite, pois elevadas concentrações de carbono induzem à limitação do crescimento microbiano (ANDRADE, 2010).

O uso de diferentes fontes de nitrogênio também influencia a produção de lipídios. Ambas as fontes de nitrogênio, inorgânico e orgânico, podem ser utilizadas para o cultivo de levedura, com influência variada sobre o acúmulo de lipídios (LIU, YANG; SHI, 2000). Huang et al. (1998) relatam que as fontes de nitrogênio inorgânico foram boas para o crescimento celular, mas não adequadas para a produção de lipídios, enquanto as fontes de nitrogênio orgânico, como peptona, foram eficientes na produção de lipídios, mas não adequadas para o crescimento celular. Extrato de levedura, peptona e sulfato de amônio são as fontes de nitrogênio mais comumente utilizadas para acúmulo de lipídios em leveduras, sendo que o extrato de levedura destaca-se por contribuir para uma quantidade elevada de biomassa e conteúdo lipídico (KUMAR et al., 2010).

Minerais, como magnésio, potássio, ferro e cálcio, são considerados, geralmente, como essenciais para o crescimento celular e o acúmulo de lipídios, e quando em pequenas concentrações podem afetar o acúmulo de óleo numa extensão variada (SPENCER; SPENCER, 1997). Li et al. (2006) relatam que a produção de biomassa e conteúdo lipídico poderia ser significativamente melhorada pela otimização da concentração de Mg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} e Ca^{2+} no meio.

Outros parâmetros de cultivo, tais como oxigênio dissolvido, temperatura e pH, também apresentaram influência no crescimento celular e acúmulo de óleo e, em geral, a concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultura apresenta uma correlação positiva com o acúmulo de óleos pelos micro-organismos (LIANG et al., 2006).

A aeração é um fator importante, podendo influenciar no acúmulo de lipídios e na composição de ácidos graxos, sendo que em condições de limitação de oxigênio ocorre um aumento na proporção de ácidos graxos saturados, enquanto em condições de aeração há aumento de ácidos graxos insaturados (VALERO, MILLAN; ORTEGA, 2001).

O perfil lipídico pode ser modificado pelo ajuste da temperatura. A temperatura ideal para o crescimento de cada linhagem de levedura é diferente, sendo geralmente em torno de 25°C. Temperaturas muito altas ou muito baixas afetam a taxa de crescimento celular e o acúmulo de lipídios. A composição de ácidos graxos é dependente da temperatura da cultura, pois o grau de saturação geralmente diminui com a diminuição da temperatura. No entanto, as baixas temperaturas não favorecem a produção de lipídios, pois eles também geram grandes reduções na atividade celular e no metabolismo (BEOPOULOS et al., 2009).

O pH inicial dos cultivos que utilizam leveduras também é um dado importante que pode influenciar a produção biotecnológica. O acompanhamento dessa medida é realizado frequentemente em cultivos devido à sua influência na atividade enzimática e no metabolismo microbiano (SCHIMIDELL, 2001). No caso das leveduras oleaginosas, o estudo do pH inicial faz-se necessário visando modificações no produto final. Inicialmente o pH de cultivos de leveduras oleaginosas deve ser controlado entre 5,0 e 6,0, o que leva a uma maior produção lipídica, sendo os pH ácidos desfavoráveis para o crescimento e produção (KARATAY; DÖNMEZ, 2010).

Segundo Beopoulos et al. (2008), o acúmulo de lipídios na célula começa a aumentar na fase de crescimento (fase log), pois esses lipídios são utilizados na síntese da membrana da célula para suportar seu crescimento e, quando a célula alcança seu tamanho ideal, passa a acumular lipídios em gotículas no interior da célula. O conteúdo lipídico atinge seu máximo na fase estacionária. Assim que a quantidade de nutrientes no meio começa a diminuir, os lipídios acumulados são rapidamente degradados em ácidos graxos livres. A retirada das células no início da fase estacionária impede a degradação dos lipídios. Para alcançar produção elevada de lipídios, a otimização dos parâmetros de cultivo acima são muito importantes.

3.7. Regulação metabólica do acúmulo de lipídios em leveduras oleaginosas

Nas células eucarióticas, lipídios e, na maioria das vezes, as enzimas responsáveis pela sua biogênese e remodelação, estão diferencialmente localizadas entre os compartimentos da membrana. Recentemente, a abordagem genômica para a localização de proteínas tem sido realizada em leveduras, acrescentando muito para a compreensão da localização celular de proteínas envolvidas no metabolismo lipídico (GASPAR et al., 2007). O maior número dessas proteínas parecem estar associadas com

o retículo endoplasmático, porém um número significativo foi detectado em outros compartimentos da membrana, incluindo as mitocôndrias, os peroxissomos, gotículas lipídicas e vesículas. Foram também detectadas, porém em menor quantidade, no complexo de Golgi, vacúolos e dentro do próprio núcleo, e muitas destas proteínas demonstraram um padrão complexo, indicando mais de uma localização (NATTER et al., 2005). No entanto, esses autores sugerem um papel central no metabolismo lipídico para o retículo endoplasmático, assim como para gotículas lipídicas e peroxissomos, todas organelas conhecidas por serem especializadas no metabolismo lipídico.

A biossíntese de lipídios é uma via metabólica bem regulamentada. Em aplicações industriais relevantes de lipídios microbianos, a engenharia eficaz de vias biossintéticas se faz necessária para maximização de rendimentos e produtividade (TAI e STEPHANOPOULOS, 2013).

O metabolismo lipídico é complexo, envolvendo um grande número de reações metabólicas, resultando na formação de um grupo diversificado de compostos químicos. Os lipídios podem ser divididos nas seguintes classes: (1) ácidos graxos, que servem principalmente como intermediários na biossíntese de lipídios; (2) esteróis, que servem como componentes estruturais das membranas; (3) ésteres de esteróis, que são formados a partir de ácidos graxos e esteróis e que servem como depósito de lipídios compostos, principalmente, como corpos lipídicos (4); triacilgliceróis, formados a partir de glicerol e ácidos graxos e que servem como depósito de lipídios, sobretudo armazenados em corpos de lipídios; (5) fosfolipídios, formados a partir de ácidos graxos, glicerol e uma molécula de álcool, por exemplo, colina, inositol ou etanolamina, como componentes estruturais das membranas; e (6) esfingolipídios, formados a partir do ácido palmítico e que servem como componentes estruturais na superfície celular, bem como desempenham uma função crucial na sinalização, como, por exemplo, regulação da endocitose, proteólise dependente de ubiquitina e controle do ciclo celular (NIELSEN, 2009).

Os lípidos podem ser acumulados através de duas vias diferentes: (1) síntese *de novo*, a qual envolve a produção, em condições definidas, de ácidos graxos precursores tais como acetil e malonil-CoA e a sua integração na via de biossíntese de lípidos de armazenamento e (2) via de acúmulo *ex novo*, a qual envolve a absorção de ácidos graxos, óleos e triacilgliceróis a partir do meio de cultura e seu acúmulo na forma inalterada ou modificada dentro da célula (TAI; STEPHANOPOULOS, 2013).

O acúmulo de lipídios em um micro-organismo oleaginoso começa quando se esgota um nutriente no meio e a fonte de carbono (na forma de glicose) está presente em excesso. Muitos elementos podem induzir ao acúmulo de lipídios. No entanto, a limitação de nitrogênio é geralmente utilizada em estudos por ser a condição mais fácil de controlar e geralmente é o tipo mais eficiente de prescrição para induzir o acúmulo de lipídios (MENG et al., 2009). Durante a fase de crescimento, o fluxo de carbono é distribuído entre os quatro grupos de macromoléculas (carboidratos, lipídios, ácidos nucleicos e proteínas). O nitrogênio é essencial para a síntese de ácidos nucleicos e proteínas necessárias para a proliferação celular. Este processo é, portanto, retardado por limitação de nitrogênio. No entanto, em condições de limitação de nitrogênio, a taxa de crescimento desacelera rapidamente, enquanto a taxa de assimilação de carbono diminui mais gradualmente. Isso resulta na canalização preferencial de fluxo de carbono para a síntese de lipídios, levando a um acúmulo de triacilgliceróis no interior de corpos lipídicos nas células (BEOPOULOS et al., 2009).

Quando os micro-organismos não oleaginosos são colocados no mesmo meio de crescimento com nitrogênio limitante, a proliferação da célula tende a cessar ou, se continuar a assimilar o substrato com carboidrato disponível, então este é desviado para diversos polissacarídeos, incluindo glicogênio e várias glicanas, mananas, entre outros (RATLEDGE, 2004).

Durante a transição entre a fase de crescimento e a fase de acúmulo de lipídios, algumas vias como a síntese de proteínas e ácidos nucleicos são reprimidas, enquanto outras, como a síntese de ácidos graxos e triacilgliceróis, são induzidas. Esta transição é induzida pelo estabelecimento de limitação de nitrogênio (RATLEDGE, 2002).

Duas enzimas críticas, malato e ATP: citrato liase (ACL), têm efeito sobre o acúmulo de lipídios. Há uma forte correlação entre a presença de atividade da ACL e a capacidade de acumular lipídios em leveduras, fungos e outros micro-organismos oleaginosos. No entanto, existe uma pequena quantidade de leveduras encontradas que possuem atividade de ACL. Consequentemente, a presença da ATP: citrato liase é um pré-requisito para que o acúmulo de lipídios possa ocorrer, mas sua posse não é necessariamente crucial para o acúmulo de lipídios, podendo não ser o único fator determinante (ADAMS et al., 2002). Na verdade, outras enzimas podem ser responsáveis por controlar a extensão da biossíntese de lipídios em organismos individuais.

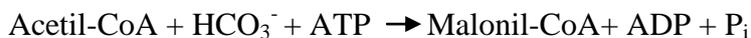
O primeiro evento bioquímico identificável após o esgotamento do nitrogênio do meio de crescimento é a ativação da enzima AMP deaminase:



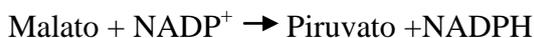
Esta atividade pode ser vista como uma medida, a curto prazo, para atenuar a deficiência de nitrogênio dentro das células. A consequência da diminuição da concentração de adenosina monofosfato (AMP) é concomitante com uma mudança brusca no consumo de oxigênio das células e na produção de CO_2 (WINN et al., 2001). Isto é atribuível à isocitrato (NAD \pm interligados) desidrogenase (ICDH), que atua dentro da mitocôndria, retardando ou cessando a sua atividade. Esta enzima, em microorganismos oleaginosos, é absolutamente dependente de AMP. O término da atividade da ICDH rapidamente leva a um acúmulo de isocitrato, que não está sendo metabolizado, que em seguida rapidamente se equilibra com citrato via aconitase. O citrato é transportado para fora da mitocôndria, via sistema malato / citrato translocase, e é clivado dentro do citoplasma por uma enzima que está ausente em células não-oleaginosas, ou seja, a ATP: citrato liase (RATLEDGE, 2004):



Esta enzima requer um íon de amônio para a ativação e é dependente de AMP e ADP. No entanto, os íons de amônio são escassos na ausência de nitrogênio, devido à indução da enzima AMP deaminase. Além de acetil-CoA, a síntese de ácidos graxos exige um fornecimento contínuo de malonil-CoA e NADPH. Malonil-CoA também pode ser gerada a partir do acetil-CoA, numa reação catalisada pela acetil-CoA carboxilase (BEOPOULOS et al., 2009):



Em leveduras, a acetil-CoA carboxilase é ativada através de ativação alostérica em função da concentração de citrato. O NADPH é exigido para a função de síntese dos ácidos graxos. A concentração de NADPH é controlada pela atividade da enzima málica que catalisa a reação:



Ratledge (2002) demonstrou que quando há a inibição da atividade da enzima málica pelo sesamol, o acúmulo de lipídios diminui de 25% para 2% da biomassa celular. Para que a síntese de ácidos graxos possa ocorrer, não é apenas essencial que haja um suprimento contínuo de acetil-CoA, que está claramente previsto em microorganismos oleaginosos por ATP: citrato liase, mas também deve haver um suprimento de NADPH (MENG et al., 2009).

As acil-CoA sintetases estão presentes na maioria dos organismos e envolvidas na utilização de ácidos graxos. Os ácidos graxos são canalizados através da acil-CoA para a via de β -oxidação para sua degradação. A ativação da molécula de CoA é catalisada pela enzima acil-CoA sintetase. Estudos têm demonstrado que esta enzima atua no tráfego reciclagem e utilização intracelular dos ácidos graxos (WANG, ZHANG; CHEN, 2011).

Na maioria das vezes, 80% dos ácidos graxos de leveduras se tornam monoinsaturados através de uma reação catalisada por uma enzima essencial do retículo endoplasmático, a Δ^9 dessaturase, Ole1. Os ácidos graxos celulares são derivados de três fontes: alimentação externa, lipídios endógenos e síntese de *novo*. Desta forma, se o meio de cultivo não tiver ácidos graxos, o ganho de ácidos graxos durante o cultivo dependerá apenas da síntese de *novo*. No entanto, ácidos graxos exógenos podem ser prontamente retomados pela levedura e incorporados como lipídios, o que pode ser relevante para uma célula em seu habitat natural (TEHLIVETS, SCHEURINGER; KOHLWEIN, 2007).

A biossíntese de ácidos graxos, em praticamente todos os organismos, culmina na formação dos ácidos graxos saturados C:16 ou C:18. Esses ácidos graxos são então modificados através de uma sequência de enzimas dessaturases e elongases para que ácidos graxos insaturados e poli-insaturados sejam formados. Os ácidos graxos produzidos em maior abundância dependem também da composição genética de cada espécie. A gama de ácidos encontrados em leveduras é um pouco limitada. Geralmente os mais frequentes são: ácido oleico, linoleico, palmítico e palmitoleico. Quando o ácido linolênico ocorre, geralmente é em concentrações pequenas, inferiores a 10% (RATLEDGE, 2004; MARTIN, OH; JIANG, 2007).

3.8. Biodiversidade e leveduras silvestres

A crescente necessidade de abordagens mais seletivas e menos imediatas do uso dos recursos naturais do planeta impulsiona o avanço dos processos biotecnológicos. Na

base de todos os processos biotecnológicos encontra-se a biodiversidade genética (ZANOTTO et al., 2007). Ambientes tropicais estão entre uma das grandes fontes de diversos tipos de organismos vivos, incluindo leveduras (fungos unicelulares), com distribuição em quase todos os ecossistemas (MAUGERI; HERNALSTEENS, 2007).

O Brasil tem uma área de 8,5 milhões km², possuindo várias zonas climáticas que incluem o trópico úmido, o semi-árido e áreas temperadas. As diferenças climáticas contribuem para as diferenças ecológicas, formando os biomas. A variedade de biomas reflete a riqueza da flora e fauna brasileira, tornando-as as mais diversas do mundo (HERNALSTEENS, 2006). Estima-se que o Brasil detenha cerca de 20% da biodiversidade mundial (ZANOTTO et al., 2007). Devido à grande biodiversidade brasileira, as espécies pertencentes à fauna e flora talvez não venham a ser conhecidas em sua totalidade, sabendo-se que o número de espécies ainda não identificadas chega a ordem de dezenas de milhões. Neste contexto é fundamental a implementação de programas na busca de um melhor aproveitamento da biodiversidade brasileira (GOLDBECK, 2008).

Segundo estimativas, menos de 5% dos micro-organismos existentes na Terra foram descritos. Isso porque os esforços dos centros de pesquisa estão focados principalmente nos macro-organismos (mamíferos, répteis, anfíbios, aves, peixes e plantas), resultando no conhecimento de 80 a 90% destes seres. No entanto os micro-organismos, mesmo exercendo funções vitais nos ecossistemas e na biosfera em geral, foram pouco estudados, tanto devido à falta de interesse quanto à dificuldade na pesquisa destes seres invisíveis a olho nu (HERNALSTEENS, 2006). Atualmente, há um grande interesse em encontrar espécies de micro-organismos ainda não catalogados que sejam produtores de insumos interessantes à indústria em geral e à de alimentos em particular, bem como otimizar processos de produção desses insumos a partir de micro-organismos já conhecidos (HERNALSTEENS; MAUGERI, 2010).

Takashima et al. (2012) relatam a riqueza taxonômica de leveduras coletadas no Japão em áreas com baixas temperaturas e áreas de clima subtropical. Ao todo, 1021 linhagens foram isoladas e classificadas em 183 espécies, sendo que, destas, 104 pertenciam a novas espécies. Considerando que as linhagens das leveduras coletadas no Japão apresentam também diversidade funcional, incluindo a capacidade de produção de lipídios, Tanimura et al. (2014) as utilizaram como fonte principal de triagem em estudo que visava selecionar leveduras com elevada produção de lipídios para síntese de biodiesel. Os resultados demonstraram que as leveduras coletadas no Japão foram

capazes de acumular elevados conteúdos lipídicos, sendo que *Cryptococcus musci* JCM 24512, com um teor de lipídios de 44,7%, se destacou como a mais promissora.

Dai et al. (2007) isolaram 250 leveduras de amostras de flores coletadas na China. Destas, 8 foram selecionadas e cultivadas em meio contendo xilose como fonte de carbono. A levedura T216, posteriormente identificada como *Rhodotorula glutinis*, acumulou lipídios em torno de 36,6%, sendo selecionada como a mais promissora. Kitcha; Cheirsilp (2011) demonstraram que as leveduras *Kodamaea ohmeri* and *Trichosporonoides*, selecionadas dentre 889 leveduras isoladas de amostras de solos e de resíduos da fábrica de óleo de palma, poderiam crescer e acumular lipídios a partir de glicerol bruto. Além disso, a condição ideal de crescimento celular e de acúmulo de lipídios foi determinada.

CAPÍTULO III

DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

ARTIGO I

**BIOCONVERSÃO DE GLICEROL BRUTO POR DIFERENTES LEVEDURAS
OLEAGINOSAS: CONTEÚDO LIPÍDICO E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS**

BIOCONVERSÃO DE GLICEROL BRUTO POR DIFERENTES LEVEDURAS OLEAGINOSAS: CONTEÚDO LIPÍDICO E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS

RESUMO

Com o aumento na escala de produção de biocombustíveis, várias pesquisas têm sido enfocadas na utilização de coprodutos, como o glicerol bruto, que é gerado na síntese do biodiesel. O uso de glicerol como substrato para produção de biomassa lipídica constitui uma alternativa interessante, uma vez que valoriza o glicerol bruto e diminui os custos de produção. As leveduras oleaginosas são conhecidas pela sua capacidade de acumular lipídios em nível superior a 20% de sua biomassa podendo ser obtidos em cultivos com substratos renováveis, tais como resíduos agroindustriais. Desta forma, buscou-se com este trabalho avaliar diferentes leveduras capazes de converter o glicerol bruto, gerado como coproduto na síntese de biodiesel, visando produzir biomassa como fonte de lipídios, com potencial utilização como matéria-prima na produção do biodiesel. A fim de selecionar a melhor linhagem de levedura, *Cryptococcus curvatus* NRRL Y-1511, *Candida cylindracea* NRRL Y-17506, *Lipomyces starkeyi* NRRL Y-11557, *Lipomyces lipofer* NRRL Y-11555, pré-selecionadas pelo método de coloração de Sudan Black B como potenciais produtoras de lipídios, bem como *Rhodotorula glutinis*, foram cultivadas em meio contendo glicerol bruto, com acompanhamento da cinética de crescimento e determinação do teor de lipídios e o perfil de ácidos graxos ao término dos cultivos. A levedura *L. lipofer* NRRL Y-11555 se destacou das demais, acumulando 57,64% de lipídios em sua biomassa. O perfil de ácidos graxos encontrado foi semelhante aos de óleos vegetais comumente utilizados na síntese de biodiesel, ocorrendo a predominância de ácidos graxos poli-insaturados, especialmente o ácido linoleico, que chegou a 68,3% na levedura *Lipomyces lipofer* NRRL Y-11555. Assim, a obtenção de biomassa de leveduras com elevado conteúdo lipídico a partir de glicerol bruto pode ser uma alternativa sustentável e renovável para a indústria do biodiesel.

Palavras-chave: biodiesel, coprodutos, lipídios microbianos.

1. INTRODUÇÃO

A expectativa de diminuição das reservas de petróleo com a possibilidade de escassez do mesmo, aliada à crescente preocupação com as mudanças climáticas decorrentes do aquecimento global devido às emissões de gás carbônico, tem incentivado iniciativas visando à substituição dos combustíveis fósseis (YANG, HANNA; SUN, 2012). A produção de biodiesel tem sido incentivada por se tratar de um combustível renovável, biodegradável e não tóxico, obtido pela reação de um óleo ou gordura com um álcool monovalente. Nesta reação, chamada de transesterificação, são formados ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos (biodiesel) e glicerol bruto, (BEATRIZ, ARAUJO; LIMA, 2011).

Entretanto, um dos grandes problemas enfrentados pelo setor diz respeito ao aumento das áreas de plantio de oleaginosas, a fim de suprir a crescente demanda do mercado, ampliando a competição por terras aráveis entre a produção de biocombustíveis e de alimentos, bem como o custo da matéria-prima, pois predomina o uso de óleos vegetais virgens, tais como o de soja, mamona, girassol, babaçu e amendoim (POLI et al., 2014; MENEZES et al., 2013). Uma alternativa que vem sendo proposta é o uso de novas fontes de lipídios, em que se tem destacado a biomassa de leveduras oleaginosas, capazes de acumular lipídios em nível superior a 20% de sua biomassa, sendo obtidas em cultivos com substratos renováveis, tais como resíduos agroindustriais. Assim, trabalhos têm sido propostos abordando o uso desta biomassa como matéria-prima na produção de biodiesel (RYU et al., 2013; ZHENG et al., 2012; THIRU, SANKH; RANGASWAMY, 2011).

Levando-se em consideração que mais de 70% dos custos da produção de biodiesel são devidos ao custo das matérias-primas utilizadas, bem como a enorme quantidade de glicerol bruto gerada no processo, estequiometricamente 10%, aliada ao seu baixo custo (LEONETI, ARAGÃO-LEONETI; OLIVEIRA, 2012), torna-se urgente encontrar formas alternativas para converter este substrato em produtos com valor agregado a fim de produzir biodiesel de forma sustentável com reciclagem simultânea do glicerol bruto (MAKRI, FAKAS; AGGELIS, 2010).

O glicerol bruto resultante da síntese do biodiesel usualmente apresenta 55-90% de pureza. O restante consiste de triacilgliceróis não convertidos, metanol ou etanol não convertido, biodiesel, sabões e outros (XU et al., 2012). A conversão do glicerol por via biotecnológica em produtos de importância comercial constitui uma das mais

promissoras alternativas para seu aproveitamento (PAPANIKOLAOU et al., 2008; SILVA, MACK; CONTIERO 2009), podendo ser utilizado com sucesso como fonte de carbono por diferentes micro-organismos na produção de lipídios (SAENGE^a et al., 2011).

Desta forma, busca-se com este trabalho avaliar diferentes leveduras capazes de converter o glicerol bruto, gerado como coproduto na síntese de biodiesel, visando produzir biomassa como fonte de lipídios, com potencial para utilização como matéria-prima na produção do biodiesel.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Micro-organismos

Foram utilizadas leveduras provenientes de banco de culturas, fornecidas pelo *National Center for Agricultural Utilization Research* (Peoria, Estados Unidos) sendo elas: *Rhodotorula glutinis* NRRL YB-252, *Lipomyces starkeyi* NRRL Y-11557, *Cryptococcus albidus* NRRL YB-219, *Lipomyces lipofer* NRRL Y-11555, *Cryptococcus curvatus* NRRL Y-1511, *Cryptococcus laurentii* NRRL Y-27011, *Candida cylindracea* NRRL Y-17506, *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-1094, *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-11853, *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423, *Candida oleophila* NRRL Y-2317 e *Candida lipolytica* NRRL Y-1095. As culturas liofilizadas foram reativadas, sendo transferidas para caldo YM (*Yeast Malt*) composto por (g.L⁻¹): 3 extrato de malte, 3 extrato de levedura, 5 peptona, 10 glicose. Estas foram incubadas em estufa bacteriológica a 25°C por 48 h, sendo posteriormente transferidas novamente para ágar YM e incubadas nas mesmas condições para manutenção das culturas. Os micro-organismos foram mantidos em tubos contendo ágar YM sob refrigeração (4°C).

2.2. Glicerol bruto

Utilizou-se glicerol bruto proveniente da obtenção de biodiesel a partir do óleo degomado de soja por via metanólica, fornecido pela empresa BS Bios Indústria e Comércio de Biodiesel Sul Brasil S/A, localizada em Passo Fundo-RS. O glicerol bruto

continha (%): 6,51 cinzas; 6,18 cloreto de sódio; 9,78 umidade; 1,22 matéria orgânica não glicerídica; 82,49 glicerol e pH 4,91.

2.3. Pré-seleção de leveduras oleaginosas

A pré-seleção das leveduras com maior potencial para assimilar o glicerol e acumular lipídios foi realizada através da técnica de coloração com Sudan Black B (EVANS, RATLEDGE; GILBERT, 1985). Com esse propósito, colônias de cada micro-organismo foram inoculadas em placas de Petri com meio de cultivo indutor do acúmulo de lipídios, proposto por Evans; Ratledge (1983), composto por (g.L^{-1}): 50,0 glicerol P.A.; 7,0 KH_2PO_4 ; 2,0 Na_2HPO_4 ; 1,5 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 CaCl_2 ; 0,008 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,0001 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,8 extrato de levedura; 20 ágar; pH ajustado em 5,5. As placas (em triplicata) foram incubadas por 96 h a 30°C até que as colônias atingissem aproximadamente 2-3 mm de diâmetro. A partir das colônias das placas de Petri, foi realizada uma réplica de impressão em papel filtro Whatman nº1 e, com a utilização da solução de Sudan Black B (Sigma Aldrich), foi possível definir através da cor formada no papel as leveduras que acumularam mais lipídios, sendo que estas apresentaram tom de cor azulado típico de leveduras oleaginosas.

2.4. Preparo do inóculo

As leveduras armazenadas foram reativadas em ágar inclinado YM até desenvolvimento das colônias. Posteriormente, dois tubos da cultura microbiana em estudo foram raspados com 10 mL de água peptonada 0,1% para cada tubo, para remoção das células do micro-organismo, sendo a suspensão resultante transferida para frasco Erlenmeyer contendo 180 mL de meio de cultivo (caldo YM), incubando-se a 30°C e 180 rpm (Tecnal TE-424), sendo a concentração celular acompanhada por contagem em câmara de Neubauer até atingir aproximadamente 10^8 células.mL⁻¹ (SANTOS et al., 2012).

2.5. Cultivos em frascos agitados

As leveduras selecionadas como potenciais produtoras de lipídios foram cultivadas em meio contendo glicerol bruto como fonte de carbono. Os cultivos foram

realizados em frascos Erlenmeyer de 500 mL com volume inicial de 200 mL, resultante da adição do meio de cultivo, suspensão de leveduras (inóculo) e água destilada estéril. O meio de cultivo foi preparado na forma concentrada a fim de resultar na seguinte composição (g.L⁻¹): 60,9 glicerol bruto; 7,0 KH₂PO₄; 2,0 Na₂HPO₄; 1,5 MgSO₄.7H₂O; 0,1 CaCl₂; 0,008 FeCl₃.6H₂O; 0,0001 ZnSO₄.7H₂O; 0,8 extrato de levedura; pH 5,5. (EVANS; RATLEDGE, 1983). Os cultivos foram inoculados com a suspensão de leveduras previamente preparada de forma a atingir 10⁷ células.mL⁻¹, sendo mantidos em incubadora rotatória a 30°C e 180 rpm .

Alíquotas foram retiradas em intervalos de tempo pré-estabelecidos, centrifugadas (Centrifio 80-2B) a 1800 x g por 15 min e as células lavadas com água destilada, sendo novamente centrifugadas e ressuspendidas para a determinação da concentração da biomassa. No sobrenadante foi determinado o pH. Os cultivos foram conduzidos até a fase estacionária, quando não foi observada variação expressiva na concentração de biomassa. Ao término dos cultivos, a biomassa foi recuperada nas mesmas condições, para a determinação do conteúdo lipídico e perfil de ácidos graxos. No sobrenadante, foi determinada a concentração de glicerol.

2.6. Métodos analíticos

A biomassa foi acompanhada por densidade óptica em espectrofotômetro a 600 nm (Apêndice A) (ZHANG et al., 2005). A determinação de glicerol no sobrenadante foi realizada através do *kit* enzimático LOD 0,4 mg.L⁻¹ (R-Biopharm), de acordo com as recomendações do fabricante. Os lipídios intracelulares foram extraídos através do método de Bligh; Dyer (1959). Para determinação de ácidos graxos, a fração lipídica foi esterificada para obtenção dos metil-ésteres dos ácidos graxos (METCALFE et al., 1966) e analisada em cromatógrafo gasoso Varian Star 3400, equipado com injetor *split/splitless*, coluna capilar ZBWAX de 30 m de comprimento e 0,32 mm de diâmetro interno e detector por ionização de chama (FID). O gás de arraste foi o hidrogênio em uma vazão de 1mL.min⁻¹, e gás *make-up*, nitrogênio a 30 mL.min⁻¹. As temperaturas do injetor e do detector foram ajustadas para 250 e 300°C, sendo o volume injetado de 1 µL. Os ácidos graxos foram identificados por comparação com os padrões Sigma-Aldrich e quantificados por normalização da área.

2.7. Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata a fim de tratar os dados por análise de variância e teste de Tukey (MONTGOMERY, 2004), para verificar a existência de diferenças significativas entre os micro-organismos estudados, a 95% de confiança ($p \leq 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Pré-seleção das leveduras oleaginosas

Entre as 11 leveduras analisadas pelo método de coloração de colônia com Sudan Black B, 7 apresentaram coloração azulada, sendo identificadas como potenciais produtoras de lipídios e caracterizadas de acordo com a intensidade da cor formada (Tabela 1). Embora essa técnica não permita uma visão precisa do conteúdo celular lipídico, por se tratar de uma análise qualitativa, é capaz de fornecer informações parciais sobre a capacidade de acúmulo de lipídios nas leveduras testadas, selecionando aquelas mais promissoras. A levedura *R. glutinis* NRRL YB-252, de coloração vermelha, não foi analisada pelo método, pois segundo Evans, Ratledge; Gilbert (1985) pode haver divergência nos resultados devido a uma diferença na estrutura dessas leveduras que dificulta a entrada do pigmento na célula.

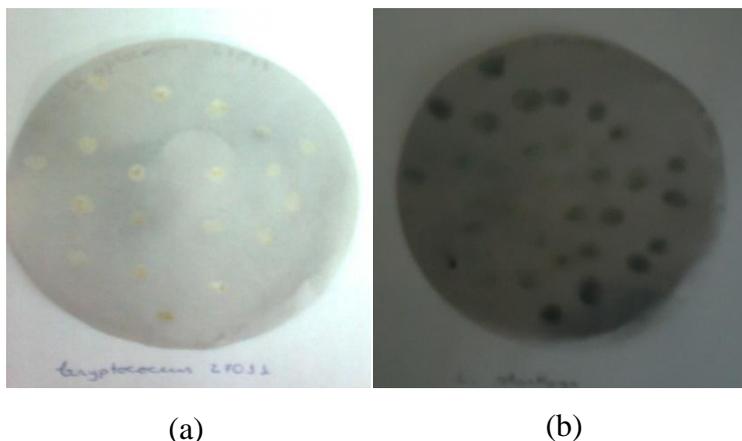
Tabela 1 - Análise qualitativa^a das leveduras através da técnica de coloração com Sudan Black B.

Micro-organismo	Intensidade da cor ^a	Micro-organismo	Intensidade da cor ^a
<i>L. starkeyi</i> NRRL Y-11557	***	<i>Y. lipolytica</i> NRRL Y-11853	*
<i>L. lipofer</i> NRRL Y-11555	**	<i>C. lipolytica</i> NRRL Y-1095	*
<i>C. curvatus</i> NRRL Y-1511	***	<i>Y. lipolytica</i> NRRL YB-423	*
<i>C. cylindracea</i> NRRL Y-17506	**		

^a As diferentes intensidades de coloração das colônias foram indicadas de maneira qualitativa por: * fraco; ** médio; *** forte.

A Figura 1 ilustra a coloração das colônias das leveduras *C. laurentii* NRRL Y-27011 (negativo) e *L. starkeyi* NRRL Y-11557 (positivo) através da técnica que utiliza Sudan Black B.

Figura 1 - Coloração das colônias de leveduras através da técnica que utiliza Sudan Black B. (a) *C. laurentii* NRRL Y-27011 (negativo); (b) *L. starkeyi* NRRL Y-11557 (positivo).



3.2. Cultivos em frascos agitados

As 4 leveduras que apresentaram coloração de médio a forte, bem como a levedura vermelha, *Rhodotorula glutinis* NRRL YB-252, foram pré-selecionadas para cultivo em meio líquido contendo glicerol bruto como fonte de carbono. As curvas de crescimento celular bem como o acompanhamento do pH ao longo dos cultivos dos referidos micro-organismos, são apresentados no Apêndice B.

A Tabela 2 apresenta as médias \pm desvio padrão para velocidade específica máxima de crescimento celular, biomassa máxima, teor de lipídios, lipídios totais e concentração de glicerol ao término dos cultivos.

Ao observar a concentração de biomassa obtida para as diferentes leveduras (Tabela 2), verifica-se que *C. cylindracea* NRRL Y-17506, *R. glutinis* NRRL YB-252 e *L. lipofer* NRRL Y-11555 não diferiram entre si, atingindo, respectivamente, 9,92; 9,80 e 9,48 g.L⁻¹, obtendo-se com estas leveduras os melhores resultados em relação a este parâmetro de crescimento. Portanto, o glicerol bruto constituiu uma boa fonte de carbono para o cultivo destas leveduras, mesmo com a presença de impurezas, tais como sabões, glicerídeos, gorduras, metais pesados, sais inorgânicos e metanol. De acordo com Xu et al. (2012), algumas dessas impurezas poderiam atuar como elementos nutricionais que podem ser assimilados pelos micro-organismos durante o cultivo e aumentar a concentração de biomassa e acúmulo de lipídios. Saenge^a et al. (2011) relatam a influência positiva dos sais inorgânicos, tais como sódio, cálcio, potássio e

magnésio, na produção de lipídios. Além desses macroatmentos pode haver também a presença de vitaminas e oligoelementos que difundem para o glicerol durante as reações de formação do biodiesel, enriquecendo, assim, o glicerol bruto (CUELIK et al., 2008).

Tabela 2 - Médias \pm desvio padrão para velocidade específica de crescimento celular, biomassa máxima, teor de lipídios, lipídios totais, concentração de glicerol e fator de conversão de substrato em lipídios e análise estatística dos dados.*

Levedura	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)**	X _{máx} (g.L ⁻¹)	Lip (%)	Lip _T (g.L ⁻¹)	Glic _F (g.L ⁻¹)	Y _{L/S} (g.g ⁻¹)**
<i>C. curvatus</i> (120h)	0,14 ^a	4,49 \pm 0,20 ^c	27,90 \pm 1,28 ^d	1,25 \pm 0,09 ^d	40,2 \pm 0,1 ^a	0,13 ^{bc}
<i>C. cylindracea</i> (96h)	0,11 ^b	9,92 \pm 0,13 ^a	14,11 \pm 0,47 ^e	1,40 \pm 0,06 ^d	39,8 \pm 0,5 ^a	0,14 ^b
<i>R. glutinis</i> (144h)	0,09 ^c	9,80 \pm 0,17 ^a	40,85 \pm 1,88 ^c	4,00 \pm 0,12 ^b	28,5 \pm 0,9 ^b	0,19 ^a
<i>L. starkeyi</i> (120h)	0,04 ^d	5,74 \pm 0,32 ^b	50,49 \pm 0,99 ^b	2,89 \pm 0,17 ^c	28,0 \pm 0,5 ^b	0,13 ^{bc}
<i>L. lipofer</i> (264h)	0,03 ^e	9,48 \pm 0,27 ^a	57,64 \pm 2,81 ^a	5,46 \pm 0,34 ^a	2,9 \pm 0,1 ^c	0,12 ^c

$\mu_{\text{máx}}$: velocidade específica; X_{máx}: biomassa máxima; P_X: produtividade em biomassa; Lip: teor de lipídios em base seca; Lip_T: lipídios totais produzidos; Glic_F: concentração de glicerol ao término do cultivo; Y_{L/S}: fator de conversão de substrato em lipídios. O tempo de cultivo variou de 96 h a 264 h (fase estacionária); *Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa (p < 0,05). ** para $\mu_{\text{máx}}$ e Y_{L/S} desvio padrão menor que 10⁻².

Quanto à velocidade específica máxima de crescimento (Tabela 2), *C. curvatus* NRRL Y-1511 e *C. cylindracea* NRRL Y-17506 apresentaram os maiores valores (0,14 e 0,11 h⁻¹, respectivamente), enquanto *L. starkeyi* NRRL Y-11557 e *L. lipofer* NRRL Y-11555 foram as leveduras com crescimento mais lento (0,04 e 0,03 h⁻¹, respectivamente), o que implicou em maiores tempos de cultivo (120 h e 264 h, respectivamente).

É possível observar que as leveduras *C. curvatus* NRRL Y-1511 e *C. cylindracea* NRRL Y-17506, com tempos de cultivo muito próximos, 120 h e 96 h respectivamente, consumiram praticamente a mesma quantidade de glicerol, não havendo diferenças significativas entre elas. O mesmo foi observado para *R. glutinis* NRRL YB-252 e *L. starkeyi* NRRL Y-11557, com 144 h e 120 h, respectivamente. Entretanto, ao comparar-se as duas leveduras com o mesmo tempo de cultivo, constata-se que *L. starkeyi* consumiu quantidades maiores de glicerol que a levedura *C. curvatus* NRRL Y-1511 ao longo de 120 h de cultivo. Enquanto que *L. lipofer* NRRL Y-11555

praticamente esgotou o glicerol do meio, apresentando um fator de conversão de substrato em lipídios totais de $0,12 \text{ g.g}^{-1}$.

Os dados relativos aos teores de lipídios (Tabela 2) demonstram diferenças significativas no acúmulo de lipídios entre as leveduras, destacando-se *L. lipofer* NRRL Y-11555, com 57,64%, e *L. starkeyi* NRRL Y-11557, com 50,49%. Contudo, *L. lipofer* NRRL Y-11555 apresentou a maior produção de lipídios, $5,49 \text{ g.L}^{-1}$, pois além de apresentar o maior conteúdo de lipídios dentre as estudadas, obteve elevada concentração de biomassa, apesar do maior tempo de cultivo (264 h), evidenciado pelo crescimento lento ($0,03 \text{ h}^{-1}$) da mesma.

É importante destacar que o processo de acúmulo de lipídios requer o esgotamento de um nutriente, geralmente nitrogênio, para permitir que o excesso de carbono seja utilizado na síntese de lipídios (MENG et al., 2009). Angerbauer et al. (2008), cultivando a levedura *L. starkeyi* DSM 70295 em meio à base de lodo de esgoto suplementado com glicose, obtiveram um teor de lipídios de 68% com relação C/N de 150 g.g^{-1} e um teor de lipídios de 40% com relação C/N de 60 g.g^{-1} . Saenge^a et al. (2011), investigando a influência da relação C/N no acúmulo de lipídios pela levedura *R. glutinis* TISTR 5159, verificaram que o maior conteúdo de lipídios foi alcançado com uma relação C/N de 85 g.g^{-1} e concentração de glicerol de 95 g.L^{-1} , atingido $5,49 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa e 41,28% de lipídios. No presente estudo foi utilizada uma relação C/N elevada (162 g.g^{-1}), visando o acúmulo de lipídios (dados apresentados no Anexo). De acordo com Saenge^a et al. (2011), uma relação C/N baixa favorece a produção de biomassa enquanto que o acúmulo de lipídios é favorecido por relação C/N alta. A enzima AMP deaminase é ativada pela exaustão de nitrogênio no meio, o que promove o decréscimo de adenosina monofosfato (AMP) mitocondrial e aumenta a concentração celular de amônia. Este decréscimo de AMP inibe a enzima isocitrato desidrogenase, bloqueando o ciclo do ácido cítrico e promovendo um acúmulo de acetil-CoA, requerida para a síntese de ácidos graxos (BEOPOULOS, NICAUD; GAILLARDIN, 2011; SAENGE^a et al., 2011).

3.3. Perfil de ácidos graxos

De acordo com a literatura, ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2) e ácido linolênico (C18:3) são os principais constituintes dos ácidos graxos de triacilgliceróis microbianos (DAVOLI,

MIERAU; WEBER, 2004). A Tabela 3 apresenta a composição dos ácidos graxos da fração lipídica das leveduras cultivadas em glicerol bruto (Apêndices C e D).

Diversos autores afirmam que a composição dos ácidos graxos dos lipídios influencia nas propriedades do biodiesel e, conseqüentemente, em sua qualidade, sendo que algumas das propriedades mais importantes são determinadas através de sua estrutura química. Entre os parâmetros mais significativos estão o comprimento de cadeia e o grau de insaturação, capazes de prever as propriedades do biodiesel (PINZI et al., 2009). Os dados demonstram que os principais ácidos graxos encontrados foram os ácidos graxos de cadeia longa com 16 a 18 átomos de carbono, incluindo ácido palmítico, ácido oleico, ácido linoleico e ácido linolênico. O ácido esteárico foi detectado apenas em quantidades traço.

Comparando com perfis de ácidos graxos reportados em estudos anteriores para *R. glutinis* (EASTERLING et al., 2009), *R. mucilaginosa* (ZHAO et al., 2010), *L. starkeyi* (LIN et al., 2011) e *Cryptococcus* sp (CHANG et al., 2013) cultivadas com distintas fontes de carbono, observa-se que no presente estudo a fração lipídica foi particularmente rica em ácidos graxos poli-insaturados, destacando-se o ácido linoleico, que alcançou uma proporção de 68,3% na levedura *R. glutinis* NRRL YB-252. Segundo Fakas et al. (2009), essa diferença pode ocorrer de acordo com a idade da célula, substrato utilizado e condições de cultivo empregadas.

Os lipídios produzidos por cultivo em glicerol bruto se mostraram positivos na produção de ácidos graxos poli-insaturados, apresentando semelhança com a composição de óleos vegetais normalmente utilizados para a produção de biodiesel, tal como óleo de soja, que contem principalmente ácido linoleico (56,02%, de acordo com Zambiasi et al., 2007). Destacou-se também, a ocorrência de ácido palmítico (39,3% para *L. starkeyi* NRRL Y-11557), um ácido saturado, encontrado em grandes quantidades no óleo de palma (42,70%, segundo Zambiasi et al., 2007), óleo vegetal muito utilizado na produção de biodiesel. Tais semelhanças indicam que os lipídios produzidos através de leveduras possuem grande potencial como matéria-prima na síntese de biodiesel. Enquanto calor de combustão, índice de cetano e estabilidade à oxidação aumentam com o comprimento da cadeia e diminuem com o grau de insaturação, com cadeias mais curtas e maior grau de insaturação as propriedades de ponto de entupimento de filtro e viscosidade melhoram (LEIVA-CANDIA et al., 2014), sendo excelentes a baixas temperaturas com vantagem de operação no inverno (SAENGE^b et al., 2011). Cabe ressaltar que o óleo microbiano apresenta vantagem,

quando comparado ao óleo vegetal, pois sua composição em ácidos graxos pode ser modificada, dependendo da fonte de nutrientes utilizadas (EASTERLING et al., 2009).

Tabela 3 - Perfil de ácidos graxos das leveduras pré-selecionadas e cultivadas em meio contendo glicerol bruto.

Levedura	Teor relativo de ácidos graxos totais (%) ^a								
	C16:0	C16:1	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	C20:2	C 22:6
<i>C. curvatus</i>	17,3	-	18,0	49,5	10,6	1,7	-	-	1,7
<i>C. cylindracea</i>	30,0	3,6	7,3	29,3	23,1	3,3	-	-	1,9
<i>R. glutinis</i>	20,4	1,8	1,1	68,3	4,0	-	-	-	0,8
<i>L. starkeyi</i>	39,3	4,3	7,8	42,5	4,2	-	-	-	-
<i>L. lipofer</i>	35,1	5,3	8,2	43,1	3,7	-	-	-	1,7

^a Alguns ácidos graxos foram detectados em quantidades traço e não foram incluídos na tabela.

4. CONCLUSÃO

As leveduras pré-selecionadas pela técnica de coloração com Sudan Black B se mostraram aptas a crescer e acumular elevados conteúdos lipídicos quando cultivadas em meio contendo glicerol bruto como fonte de carbono, além de apresentarem perfil de ácidos graxos diferenciado, semelhante ao dos principais óleos vegetais utilizados na síntese de biodiesel. Deste modo, os propósitos de valorização de um resíduo agroindustrial e de produção de uma biomassa lipídica renovável como matéria-prima alternativa para obtenção de biodiesel foram alcançados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGERBAUER, C.; SIEBENHOFER, M.; MITTELBACH M.; GUEBITZ G. M. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3051–3056, 2008.

BEATRIZ, A.; ARAUJO, Y. J. K.; LIMA, D. P. **Glicerol: um breve histórico e aplicação em sínteses estereosseletivas**. **Química Nova**, v. 34, p. 306-319, 2011.

BEOPOULOS, A.; NICAUD, J. M.; GAILLARDIN, C. An overview of lipid metabolism in yeast and its impact on biotechnological processes. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.10, p.1193-1203, 2011.

BLIGH, E.G.; DYER, J. W. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911–917, 1959.

CHANG, Y.; CHANG, K.; HSU, C.; CHUANG, L.; CHEN, C.; HUANG, F.; JANG, H. A comparative study on batch and fed-batch cultures of oleaginous yeast *Cryptococcus sp.* in glucose-based media and corncob hydrolysate for microbial oil production. **Fuel**, v. 105, p. 711–717, 2013.

CUELIK, E.; OZBAY, N.; OKTAR, N.; CUALIK, P. Use of biodiesel byproduct crude glycerol as the carbon source for fermentation processes by recombinant *Pichia pastoris*. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 47, p. 2985–2990, 2008.

DAVOLI, P.; MIERAU, V.; WEBER, R. S. W. Carotenoids and fatty acids in ard yeasts *Sporobolomyces rosus* and *Rhodotorula glutinis*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 40, p. 392–397, 2004.

EASTERLING, E. R.; FRENCH, W. T.; HERNANDEZ, R.; LICHA, M. The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 356-361, 2009.

EVANS, C. T.; RATLEDGE, C. Biochemical activities during lipid accumulation in *Candida curvata*. **Lipids**, v. 18, p. 9 -16, 1983.

EVANS, C. T.; RATLEDGE, C.; GILBERT, S. C. A rapid screening method for lipid-accumulating yeast using a replica-printing technique. **Journal of Microbiological Methods**, v. 4, p. 203-210, 1985.

FAKAS, S.; PAPANIKOLAOU, S.; BASTOS, A.; GALIOTOUPANAYOTOU, M.; MALLOUCHOS, A.; AGGELIS, G. Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, p. 573–580, 2009.

LEIVA-CANDIA, D. E.; PINZI, S.; REDEL-MACÍAS, M. D.; KOUTINAS, A.; WEBB, C.; DORADO, M. P. The potential for agro-industrial waste utilization using oleaginous yeast for the production of biodiesel. **Fuel**, v. 123, p. 33-42, 2014

LEONETI, A. B.; ARAGÃO-LEONETI, V.; OLIVEIRA, S. V. W. B. Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: alternatives for the use of unrefined glycerol. **Renewable Energy**, v. 45, p. 138-145, 2012.

LIN, J.; SHEN, H.; TAN, H.; ZHAO, X.; WU, S.; HU, C.; ZHAO, Z. K. Lipid production by *Lipomyces starkeyi* cells in glucose solution without auxiliary nutrients. **Journal of Biotechnology**, v. 152, p. 184–188, 2011.

MAKRI, A.; FAKAS, S.; AGGELIS, G. Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeated batch cultures. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2351–2358, 2010.

MENEZES, R. S.; LELES, M. I. G.; SOARES, A. T.; BRANDÃO, P. I.; FRANCO, M.; ANTONIOSI FILHO, N. R. Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 36, p. 10-15, 2013.

MENG, X.; YANG, J.; XU, X.; ZHANG, L.; NIE, Q.; XIAN, Q. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable Energy**, v. 34, p. 1-5, 2009.

METCALFE, L. D.; SCHIMTZ, A. A.; PELKE, J. R. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 38, p. 514-515, 1966.

MONTGOMERY, D.C. **Introdução ao controle estatístico de qualidade**. 4ª Edição. Rio de Janeiro: Editora LTC, 2004.

PAPANIKOLAOU, S.; FAKAS, S.; FICK, M.; CHEVALOT, I.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; KOMAITIS, M.; MARC, I.; AGGELIS, G. 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 and Bioenergy**, v. 32, p. 60–71, 2008.

PINZI, S.; GARCIA, I. L.; LOPEZ-GIMENEZ, F. J.; LUQUE DE CASTRO, M. D., DORADO, G.; DORADO, M. P. The ideal vegetable oil-based biodiesel composition: a review of social, economical and technical implications. **Energy Fuel**, v. 23, p. 2325–2341, 2009.

POLI, J. S.; LÜTZHOFT, H. H.; KARAKASHEV, D. B.; VALENTE, P.; ANGELIDAKI, I. An environmentally-friendly fluorescent method for quantification of lipid contents in yeast. **Bioresource Technology**, v. 151, p. 388–391, 2014.

RYU, B.; KIM, J.; KIM, K.; CHOI, Y.; HAN, J.; YANG, J. High-cell-density cultivation of oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* for biodiesel production using organic waste from the brewery industry. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 357–364, 2013.

SAENGE^a, C.; CHEIRSILPB, B.; SUKSAROGEA, T. T.; BOURTOOMC, T. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 210–218, 2011.

SAENGE^b, C.; CHEIRSILPB, B.; SUKSAROGEA, T. T.; BOURTOOMC, T. Efficient concomitant production of lipids and carotenoids by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultured in palm oil mill effluent and application of lipids for biodiesel production. **Biotechnology and Bioprocess Engineering** v. 16, p. 23-33, 2011.

SANTOS, E. O.; MICHELON, M.; FURLONG, E. B.; BURKERT, J. F. M.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V. Evaluation of the composition of culture medium for yeast biomass production using raw glycerol from biodiesel synthesis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 432-440, 2012.

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

THIRU, M.; SANKH, S.; RANGASWAMY, V. Process for biodiesel production from *Cryptococcus curvatus*. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10436–10440, 2011.

XU, J.; ZHAO, X.; WANG, W.; DU, W.; LIU, D. Microbial conversion of biodiesel byproduct glycerol to triacylglycerols by oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* and the individual effect of some impurities on lipid production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 65, p. 30-36, 2012.

YANG, F.; HANNA, M. A.; SUN, R. Value-added uses for crude glycerol—a byproduct of biodiesel production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, p. 1-10, 2012.

ZAMBIAZI, R. C.; PRZYBYLSKI, R.; ZAMBIAZI, M. W.; MENDONCA, C. B. Fatty acid composition of vegetable oils and fats. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 111-120, 2007.

ZHANG, Y.; RITTMANN, B. E.; WANG, J.; SHENG, Y.; YU, J.; SHI, H.; QIAN, Y. High-carbohydrate wastewater treatment by IAL-CHS with immobilized *Candida tropicalis*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 857–863, 2005.

ZHAO, C.; ZHANG, T.; LI, M.; CHI, Z. Single cell oil production from hydrolysates of inulin and extract of tubers of Jerusalem artichoke by *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1121–1126, 2010.

ZHENG, Y.; CHI, Z.; AHRING, B. K.; CHEN, S. Oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* for biofuel production: ammonia's effect. **Biomass and Bioenergy**, v.37 . p. 114-121, 2012.

ARTIGO II

**INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NA BIOCONVERSÃO DE
GLICEROL BRUTO EM LIPÍDIOS POR *Rhodotorula mucilaginosa***

INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NA BIOCONVERSÃO DE GLICEROL BRUTO EM LIPÍDIOS POR *Rhodotorula mucilaginosa*

RESUMO

O consumo mundial de energia, até o momento, depende principalmente de combustíveis fósseis não renováveis. Durante as duas últimas décadas, tem aumentado o interesse no biodiesel como um biocombustível alternativo. Durante a síntese do biodiesel, o glicerol bruto é gerado como coproduto e vem se tornando um potencial poluente ambiental. A conversão do glicerol bruto por via biotecnológica em produtos de importância comercial constitui uma das mais promissoras alternativas para seu aproveitamento, podendo ser utilizado como fonte de carbono em cultivos microbianos. As leveduras da espécie *Rhodotorula mucilaginosa* são conhecidas por sua capacidade de assimilar uma grande variedade de substratos. Por outro lado, o rendimento e a composição dos lipídios microbianos dependem de fatores como micro-organismo utilizado, condições de cultivo e substrato empregado. O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos dos constituintes do meio de cultivo, pH inicial e temperatura, no acúmulo de lipídios pela levedura silvestre *Rhodotorula mucilaginosa*. O glicerol bruto foi utilizado como principal fonte de carbono e energia. Utilizou-se o delineamento experimental de Plackett-Burman com 16 ensaios mais 4 pontos centrais, sendo avaliadas 10 variáveis. As respostas avaliadas no planejamento experimental foram biomassa máxima, produtividade em biomassa, teor de lipídios, lipídios totais e produtividade em lipídios. De acordo com os resultados, os maiores efeitos positivos foram encontrados para extrato de levedura e $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, sendo estas fixadas em 1,2 e 3 $g \cdot L^{-1}$, respectivamente. Com relação à temperatura, que apresentou efeito significativo negativo sobre a biomassa, esta foi fixada em 25°C. As demais variáveis, por não apresentarem efeitos significativos, foram fixadas em valores correspondentes ao nível -1 do planejamento Plackett-Burman (pH 4,5; 30 $g \cdot L^{-1}$ glicerol; 5,0 $g \cdot L^{-1}$ KH_2PO_4 ; 1,0 $g \cdot L^{-1}$ Na_2HPO_4), excluindo-se, desta forma, os sais de cálcio, ferro e zinco do meio de cultivo. Nestas condições atingiu-se uma biomassa máxima de 9,20 $g \cdot L^{-1}$, teor de lipídios de 59,96% e lipídios totais de 5,51 $g \cdot L^{-1}$. Por fim, realizou-se um acompanhamento do acúmulo de lipídios, perfil de ácidos graxos e consumo de glicerol na condição estabelecida pelo Plackett-Burman, observando-se que o ácido linoleico foi aumentando o seu teor relativo com o tempo, sendo os ácidos palmítico, oleico linoleico e linolênico encontrados como majoritários. O estudo demonstrou que a bioconversão de glicerol bruto em óleos microbianos pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* constitui uma alternativa promissora, com potencial para minimizar a geração de resíduos, diminuir custos e ser utilizada na produção de biodiesel de segunda geração.

Palavras-chave: Plackett-Burmann, planejamento experimental, lipídios microbianos.

1. INTRODUÇÃO

O consumo mundial de energia, até o momento, depende principalmente de combustíveis fósseis não renováveis, que são uma fonte finita de energia associada à poluição e ao aquecimento global (KODAMA et al., 2013). Como a população mundial continua a crescer, há uma crescente demanda de energia e de recursos materiais. Portanto, para garantir a sustentabilidade ao longo prazo, uma alternativa adequada para produção de combustíveis precisa ser desenvolvida (SCHULZE et al., 2014). Durante as duas últimas décadas, tem aumentado o interesse no biodiesel como um biocombustível alternativo, contando com um número considerável de projetos de pesquisa (AMI et al., 2014).

O biodiesel é um combustível renovável, biodegradável e não tóxico (PIROZZI et al., 2013), produzido pela transesterificação de triacilgliceróis com um álcool monovalente (metanol, etanol, etc.), ou pela esterificação de ácidos graxos (MEHER, SAGAR; NAIK, 2006). Esta reação produz glicerol bruto como coproduto, sendo que, teoricamente, para cada 3 moles de ésteres metílicos (ou etílicos) é gerado 1 mol de glicerol (BEATRIZ, ARAÚJO; LIMA, 2011). Como a maioria das indústrias utilizam apenas glicerol purificado como matéria-prima, o glicerol bruto vem se tornando um potencial poluente ambiental (LEONETI, ARAGÃO-LEONETI; OLIVEIRA, 2012). Por outro lado, o alto custo das matérias-primas utilizadas na produção de biodiesel é o principal obstáculo para sua viabilidade comercial. Além disso, quando matérias-primas agrícolas são utilizadas, pode haver um aumento nos preços dos alimentos. Por esta razão, pesquisas estão focadas na seleção de matérias-primas alternativas, que não competem com a cadeia de abastecimento alimentar (LEIVA-CANDIA et al., 2014).

A conversão do glicerol bruto por via biotecnológica em produtos de importância comercial constitui uma das mais promissoras alternativas para seu aproveitamento (SILVA, MACK; CONTIERO, 2009), podendo ser utilizado como fonte de carbono em cultivos microbianos produzindo lipídios, pigmentos, ácido cítrico, proteínas, entre outros (LEONETI, ARAGÃO-LEONETI; OLIVEIRA, 2012). As leveduras oleaginosas são conhecidas pela sua capacidade de acumular lipídios em nível superior a 20% de sua biomassa (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2011), sendo capazes de crescer e acumular lipídios quando cultivadas em glicerol bruto, com tempos de geração curtos e exigências nutricionais mínimas (KITCHA; CHEIRSILP, 2011).

As leveduras da espécie *Rhodotorula mucilaginosa* são consideradas onipresentes, devido à sua distribuição mundial em ambientes terrestres, de águas doces e marinhas, e por sua capacidade de colonizar uma grande variedade de substratos (LIBKIND et al., 2008). As leveduras do gênero *Rhodotorula* são conhecidas pela sua capacidade de sintetizar pigmentos diferentes com alto valor econômico, tais como torularrodina, β -caroteno e toruleno em diversas proporções e, portanto, representam um grupo biotecnologicamente interessante de leveduras. *Rhodotorula mucilaginosa* é também uma levedura produtora de carotenoides, sintetizando o β -caroteno como carotenoide principal (MOLINÉ, LIBKIND; BROOCK, 2012). Li et al. (2010) mencionam pela primeira vez, segundo os autores, a capacidade de uma levedura da espécie *Rhodotorula mucilaginosa* de acumular elevado conteúdo lipídico no interior de sua célula.

Em micro-organismos, a extensão de acúmulo de lipídios é determinada por sua constituição genética, sendo que a capacidade máxima de acúmulo pode variar entre espécies e até mesmo entre linhagens (PAPANIKOLAOU, SARANTOU; KOMAITIS, 2004). O rendimento e a composição dos lipídios produzidos dependem de fatores como micro-organismo utilizado, condições de cultivo e substrato empregado (GRIFFITHS; HARRISON, 2009). Tem sido relatado que as condições de cultivo, como relação C/N, fontes de nitrogênio, temperatura, pH, oxigênio e sais inorgânicos, são capazes de influenciar no acúmulo de óleo pelos micro-organismos (LI, DU; LIU, 2008; SAWANGKEAW; NGAMPRASERTSITH, 2013).

Neste trabalho buscou-se avaliar a influência dos constituintes do meio de cultivo, pH inicial e temperatura no acúmulo de lipídios pela levedura silvestre *Rhodotorula mucilaginosa*, utilizando o glicerol bruto como principal fonte de carbono.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Micro-organismo

A levedura silvestre *Rhodotorula mucilaginosa*, isolada pela equipe do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da FURG em estudo anterior (OTERO, 2011), foi utilizada nos cultivos. Para a manutenção, as colônias foram transferidas para tubos de ensaio com meio ágar inclinado YM (*Yeast Malt*) composto por (g.L⁻¹): 3 extrato de malte, 3 extrato de levedura, 5 peptona, 10 glicose, 20 ágar. Os tubos foram

incubados em estufa bacteriológica a 25°C até crescimento satisfatório. A levedura foi mantida nos tubos, sob refrigeração (4°C), imersa em óleo mineral.

2.2. Glicerol bruto

Utilizou-se glicerol bruto proveniente da obtenção de biodiesel a partir do óleo degomado de soja por via metanólica, fornecido pela empresa BS Bios Indústria e Comércio de Biodiesel Sul Brasil S/A, localizada em Passo Fundo-RS. O glicerol bruto continha (%): 6,51 cinzas; 6,18 cloreto de sódio; 9,78 umidade; 1,22 matéria orgânica não glicerídica; 82,49 glicerol; e pH 4,91.

2.3. Preparo do inóculo

A levedura armazenada foi reativada em ágar inclinado YM até desenvolvimento das colônias. Posteriormente dois tubos da cultura microbiana reativada foram raspados com 10 mL de água peptonada 0,1%, cada, para remoção das células do micro-organismo, transferindo-se para frascos Erlenmeyer contendo 180 mL de meio de cultivo, sendo utilizado o caldo YM. O inóculo foi mantido em incubadora rotatória (Tecnal TE-424) a 30°C e 180 rpm, e a concentração celular foi acompanhada por contagem em câmara de Neubauer até atingir aproximadamente 1×10^8 células.mL⁻¹ (SANTOS et al., 2012).

2.4. Planejamento experimental de Plackett-Burman

A fim de avaliar os efeitos das variáveis na produção de lipídios utilizando glicerol bruto gerado na síntese de biodiesel como substrato, foi proposto um delineamento experimental Plackett-Burman (RODRIGUES; IEMMA, 2009). A matriz do planejamento com os valores reais e codificados das variáveis independentes estudadas está apresentada na Tabela 1. Os pontos centrais do planejamento central corresponderam à composição de meio e condições de cultivo propostas por Evans; Ratledge (1983).

Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 500 mL com volume inicial de 200 mL, resultante da adição do meio de cultivo, suspensão de leveduras (inóculo) e água destilada estéril, e cuja composição foi definida de acordo com o

planejamento experimental (Tabela 1). Os frascos foram inoculados com o volume de inóculo necessário, calculado a partir de contagem realizada em câmara de Neubauer, para que se atingisse uma concentração inicial de 10^7 células.mL⁻¹, sendo mantidos em agitador orbital (Tecnal TE-424) na temperatura determinada pelo planejamento experimental (Tabela 1) e com agitação de 180 rpm, com retiradas de alíquotas em intervalos de tempo pré-definidos.

Estimaram-se os efeitos principais de cada variável nas respostas avaliadas. As variáveis dependentes avaliadas foram biomassa máxima (g.L⁻¹), produtividade em biomassa (g.L⁻¹.h⁻¹), teor de lipídios em base seca (%), lipídios totais produzidos (g.L⁻¹) e produtividade em lipídios (g.L⁻¹.h⁻¹). Os dados foram tratados a 90% de confiança através do *software* Statistica 5.0 (StatSoft Inc., EUA).

Tabela 1 - Matriz do planejamento Plackett-Burman com valores reais e codificados.

Ensaio	KH ₂ PO ₄ (g.L ⁻¹)	MgSO ₄ (g.L ⁻¹)	Na ₂ HPO ₄ (g.L ⁻¹)	EL (g.L ⁻¹)	CaCl ₂ .2H ₂ O (g.L ⁻¹)	Glicerol* (g.L ⁻¹)	pH inicial	Temperatura (°C)	ZnSO ₄ .7H ₂ O (g.L ⁻¹)	FeCl ₃ .6H ₂ O (g.L ⁻¹)
1	+1 (9,0)	-1 (0)	-1 (1,0)	-1 (0,4)	+1 (0,134)	-1 (30,0)	-1 (4,5)	+1 (35)	+1 (0,0002)	-1 (0)
2	+1 (9,0)	+1 (3,0)	-1 (1,0)	-1 (0,4)	-1 (0)	+1 (70,0)	-1 (4,5)	-1 (25)	+1 (0,0002)	+1 (0,016)
3	+1 (9,0)	+1 (3,0)	+1(3,0)	-1 (0,4)	-1 (0)	-1 (30,0)	+1 (6,5)	-1 (25)	-1 (0)	+1 (0,016)
4	+1 (9,0)	+1 (3,0)	+1(3,0)	+1 (1,2)	-1 (0)	-1 (30,0)	-1 (4,5)	+1 (35)	-1 (0)	-1 (0)
5	-1 (5,0)	+1 (3,0)	+1(3,0)	+1 (1,2)	+1 (0,134)	-1 (30,0)	-1 (4,5)	-1 (25)	+1 (0,0002)	-1 (0)
6	+1 (9,0)	-1 (0)	+1(3,0)	+1 (1,2)	+1 (0,134)	+1 (70,0)	-1 (4,5)	-1 (25)	-1 (0)	+1 (0,016)
7	-1 (5,0)	+1 (3,0)	-1 (1,0)	+1 (1,2)	+1 (0,134)	+1 (70,0)	+1 (6,5)	-1 (25)	-1 (0)	-1 (0)
8	+1 (9,0)	-1 (0)	+1(3,0)	-1 (0,4)	+1 (0,134)	+1 (70,0)	+1 (6,5)	+1 (35)	-1 (0)	-1 (0)
9	+1 (9,0)	+1 (3,0)	-1 (1,0)	+1 (1,2)	-1 (0)	+1 (70,0)	+1 (6,5)	+1 (35)	+1 (0,0002)	-1 (0)
10	-1 (5,0)	+1 (3,0)	+1(3,0)	-1 (0,4)	+1 (0,134)	-1 (30,0)	+1 (6,5)	+1 (35)	+1 (0,0002)	+1 (0,016)
11	-1 (5,0)	-1 (0)	+1(3,0)	+1 (1,2)	-1 (0)	+1 (70,0)	-1 (4,5)	+1 (35)	+1 (0,0002)	+1 (0,016)
12	+1 (9,0)	-1 (0)	-1 (1,0)	+1 (1,2)	+1 (0,134)	-1 (30,0)	+1 (6,5)	-1 (25)	+1 (0,0002)	+1 (0,016)
13	-1 (5,0)	+1 (3,0)	-1 (1,0)	-1 (0,4)	+1 (0,134)	+1 (70,0)	-1 (4,5)	+1 (35)	-1 (0)	+1 (0,016)
14	-1 (5,0)	-1 (0)	+1(3,0)	-1 (0,4)	-1 (0)	+1 (70,0)	+1 (6,5)	-1 (25)	+1 (0,0002)	-1 (0)
15	-1 (5,0)	-1 (0)	-1 (1,0)	+1 (1,2)	-1 (0)	-1 (30,0)	+1 (6,5)	+1 (35)	-1 (0)	+1 (0,016)
16	-1 (5,0)	-1 (0)	-1 (1,0)	-1 (0,4)	-1 (0)	-1 (30,0)	-1 (4,5)	-1 (25)	-1 (0)	-1 (0)
17	0 (7,0)	0 (1,5)	0 (2,0)	0 (0,8)	0 (0,067)	0 (50,0)	0 (5,5)	0 (30)	0 (0,0001)	0 (0,008)
18	0 (7,0)	0 (1,5)	0 (2,0)	0 (0,8)	0 (0,067)	0 (50,0)	0 (5,5)	0 (30)	0 (0,0001)	0 (0,008)
19	0 (7,0)	0 (1,5)	0 (2,0)	0 (0,8)	0 (0,067)	0 (50,0)	0 (5,5)	0 (30)	0 (0,0001)	0 (0,008)
20	0 (7,0)	0 (1,5)	0 (2,0)	0 (0,8)	0 (0,067)	0 (50,0)	0 (5,5)	0 (30)	0 (0,0001)	0 (0,008)

EL = extrato de levedura; * Concentração de glicerol a 100% de pureza.

2.5. Métodos analíticos

2.5.1. Biomassa

Alíquotas foram retiradas em intervalos de tempo pré-estabelecidos, centrifugadas (Centribio 80 - 2B) a 1800 x g por 15min e as células lavadas com água destilada, sendo novamente centrifugadas e ressuspensas. Posteriormente as células foram suspensas em volume de água que resultasse na leitura de absorvância dentro da faixa de leitura recomendada (0,2-0,8), utilizando-se comprimento de onda de 600 nm (Bioespectro SP 220). Converteu-se o valor de absorvância em concentração (g.L^{-1}) através de uma curva padrão de biomassa (Apêndice A) previamente determinada para o micro-organismo, baseado no método descrito por Choi; Park (2003).

2.5.2. pH

A determinação do pH foi realizada no sobrenadante, através da leitura em medidor de pH, segundo AOAC (2000).

2.5.3. Glicerol

A determinação de glicerol no sobrenadante foi realizada através do *kit* enzimático LOD 0,4 mg.L^{-1} (R-Biopharm), de acordo com as recomendações do fabricante.

2.5.4. Lipídios

A concentração de lipídios foi determinada através do método Bligh; Dyer (1959), adaptado por Manirakiza, Covaci; Schepens (2001), através da extração dos lipídios polares e não polares da biomassa utilizando uma mistura de metanol e clorofórmio. A biomassa seca foi primeiramente tratada com solução de HCl 2 mol.L^{-1} para rompimento da parede celular, posteriormente centrifugada a 1785 x g e o sobrenadante descartado. A biomassa foi misturada com metanol, clorofórmio e água para a extração dos lipídios, seguidos de centrifugação a 1785 x g por 10 min. Este procedimento foi repetido para a extração dos lipídios remanescentes na amostra. Com a

mistura formaram-se três fases, onde os lipídios encontravam-se na fase inferior, dissolvidos em clorofórmio, que foi evaporado, e os lipídios quantificados por gravimetria, em massa seca.

2.5.5. Perfil de ácidos graxos

Inicialmente, a fração lipídica foi esterificada para obtenção dos metil-ésteres dos ácidos graxos, utilizando trifluoreto de boro 1:10 como derivatizante, segundo metodologia proposta por Metcalfe, Schimtz; Pelke (1966). Os metil ésteres de ácidos graxos foram identificados e quantificados por cromatografia gasosa (GC/FID). A análise cromatográfica foi realizada em um cromatógrafo gasoso Varian Star 3400, equipado com injetor *split/splitless*, coluna capilar ZBWAX de 30 m de comprimento e 0,32 mm de diâmetro interno, detector por ionização de chama (FID) e *workstation* com *software* STAR. O gás de arraste foi o hidrogênio em uma vazão de 1 mL.min⁻¹, e gás *make-up*, nitrogênio a 30 mL.min⁻¹. As temperaturas do injetor e do detector foram ajustadas para 250 e 300°C, sendo o volume injetado de 1 µL. As condições cromatográficas de separação foram temperatura inicial da coluna 40°C, elevando-se para 100°C a uma taxa de 6°C.min⁻¹, permanecendo nesta temperatura por 1 min. Na segunda rampa de temperatura a taxa de aumento foi de 6°C.min⁻¹ até 160°C, permanecendo por 5 min. Finalmente a temperatura foi elevada a 230°C, 6°C.min⁻¹, mantendo-se por 10 min. Os ácidos graxos foram identificados por comparação com os padrões Sigma-Aldrich e quantificados por normalização da área.

2.6. Análise estatística

Os experimentos foram tratados através *software* Statistica 5.0 (StatSoft Inc., EUA). A fim de verificar a existência de diferenças significativas entre as condições de cultivo selecionadas, a 95% de confiança ($p \leq 0,05$), o teste *t* de *Student* foi empregado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Delineamento Plackett-Burman

Os delineamentos de Plackett-Burman são extremamente úteis quando se quer escolher um ou dois fatores mais importantes dentre vários fatores utilizados. Na fase

inicial da solução do problema, a metodologia assume que a importância dos efeitos principais é maior que a interação de dois fatores. Com isso, o delineamento Plackett-Burmann requer menor número de ensaios em comparação a um delineamento fracionário. É recomendado ainda escolher um número de ensaios maior que o número de variáveis estudadas, deixando assim graus de liberdade para o cálculo do erro padrão (HAALAND, 1989).

A Tabela 2 apresenta as respostas para o planejamento Plackett-Burman em biomassa máxima, produtividade de biomassa, teor de lipídios, lipídios totais e produtividade de lipídios ao final do tempo de cultivo.

As curvas de crescimento celular bem como o acompanhamento do pH ao longo dos cultivos do planejamento Plackett-Burman são apresentados no Apêndice E.

De acordo com a Tabela 2, os Ensaios 2 e 5, bem como os pontos centrais (Ensaios 17, 18, 19 e 20), foram os que apresentaram maior conteúdo de lipídios, chegando a mais de 59% (m/m da biomassa) em lipídios. Cabe salientar que as condições do ponto central correspondem às utilizadas por Evans; Ratledge (1983). Dentre esses ensaios, destaca-se o Ensaio 5, por apresentar elevado conteúdo lipídico, 59,27%, além de elevada biomassa ($9,29 \text{ g.L}^{-1}$), elevada produtividade de biomassa e de lipídios ($0,038 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e $0,023 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente) e a maior concentração de lipídios totais ($5,50 \text{ g.L}^{-1}$). Neste ensaio os parâmetros concentração de $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$, Na_2HPO_4 , extrato de levedura, $\text{CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$ e $\text{ZnSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ encontravam-se nos maiores níveis, enquanto que KH_2PO_4 , glicerol, pH, temperatura e $\text{FeCl}_3.6\text{H}_2\text{O}$ encontravam-se nos menores níveis. Os Ensaios 6, 12 e 15 foram os que apresentaram os menores teores de lipídios, em torno de 30%. Nestes ensaios, a concentração de $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ encontrava-se no nível -1. Cabe ainda salientar que a ampla variação observada quanto ao teor de lipídios (de 28,00% a 59,72%) é um indicativo de que as condições de cultivo tem forte influência sobre a produção de lipídios.

Tabela 2 - Resultados do planejamento experimental Plackett-Burman para as respostas biomassa máxima, produtividade de biomassa, teor de lipídios, lipídios totais e produtividade de lipídios.

Ensaio	$X_{\text{máx}}$ (g.L ⁻¹)	P_X (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Lip (%)	Lip_T (g.L ⁻¹)	P_L (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
1	2,08	0,009	54,12	1,12	0,005
2	4,08	0,021	59,88	2,44	0,012
3	3,76	0,019	57,25	2,15	0,011
4	5,32	0,024	48,42	2,58	0,012
5	9,29	0,038	59,27	5,50	0,023
6	4,97	0,018	32,40	1,61	0,006
7	9,50	0,039	55,89	5,31	0,022
8	1,10	0,007	44,98	0,49	0,003
9	5,07	0,023	45,08	2,29	0,010
10	1,70	0,010	40,02	0,68	0,004
11	3,80	0,015	43,22	1,64	0,006
12	2,48	0,010	28,00	0,69	0,002
13	4,59	0,019	48,06	2,21	0,009
14	2,76	0,010	49,94	1,38	0,005
15	2,50	0,017	30,29	0,76	0,005
16	2,17	0,008	43,37	0,94	0,003
17	6,22	0,032	59,08	3,67	0,019
18	6,31	0,032	59,72	3,77	0,019
19	6,35	0,033	59,62	3,78	0,019
20	6,25	0,032	59,55	3,72	0,019

$X_{\text{máx}}$: biomassa máxima; P_X : produtividade de biomassa; Lip: teor de lipídios em base seca; Lip_T : lipídios totais produzidos; P_L : produtividade de lipídios.

A Tabela 3 apresenta os efeitos estimados, obtidos no planejamento Plackett-Burman, para a resposta biomassa máxima.

Tabela 3 - Efeitos estimados para a biomassa máxima (g.L⁻¹).

Fator	Efeito (g.L ⁻¹)	Erro padrão	t (9)	p-valor
KH ₂ PO ₄	-0,93	0,76	-1,22	0,2537
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,68	0,76	3,51	0,0066
Na ₂ HPO ₄	0,03	0,76	0,04	0,9704
EL*	2,59	0,76	3,39	0,0080
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,78	0,76	1,02	0,3344
Glicerol	0,82	0,76	1,08	0,3093
pH inicial	-0,93	0,76	-1,22	0,2545
T**	-1,60	0,76	-2,10	0,0652
ZnSO ₄ .7H ₂ O	-0,33	0,76	-0,44	0,6731
FeCl ₃ .6H ₂ O	-1,17	0,76	-1,54	0,1584

*EL: extrato de levedura; **T: temperatura.

De acordo com a Tabela 3, o aumento das concentrações de MgSO₄.7H₂O e de extrato de levedura do nível -1 (0 e 0,4 g.L⁻¹, respectivamente) para o nível +1 (3 e 1,2 g.L⁻¹, respectivamente) representou um efeito significativo positivo (p<0,1) na biomassa máxima (2,68 g.L⁻¹ e 2,59 g.L⁻¹, respectivamente), enquanto que a variável temperatura apresentou efeito significativo negativo (p<0,1), ou seja, o aumento de temperatura de 25°C para 35°C diminuiu a produção de biomassa em 1,60 g.L⁻¹.

O extrato de levedura pode ser um excelente substrato para muitos micro-organismos, visto que contém aminoácidos e peptídeos, vitaminas solúveis em água e carboidratos (CRUEGER; CRUEGER, 1993). Como seu emprego em processos industriais é considerado um tanto oneroso, sua utilização pode se tornar viável quando adicionado em pequenas quantidades como as utilizadas no presente trabalho.

Duarte, Ghiselli; Maugeri (2013) também reportaram um efeito negativo da temperatura sobre os lipídios da levedura *Candida sp.* LEB-M3 quando cultivada em glicerol bruto. A 23°C, correspondente ao nível -1 de um delineamento Plackett-Burmann, ocorreu maior acúmulo (50,2%) e maior concentração de lipídios (9,9 g.L⁻¹). Outro fato importante observado pelos autores foi que, quando cultivada a 23°C a levedura atingiu a fase estacionária em 192 h de cultivo, enquanto que a 25°C a fase estacionária não foi atingida antes de 240 h de cultivo.

A Tabela 4 apresenta os efeitos estimados, obtidos no planejamento Plackett-Burman para a resposta produtividade de biomassa.

Tabela 4 - Efeitos estimados para a produtividade de biomassa ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

Fator	Efeito ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	Erro padrão	<i>t</i> (9)	<i>p</i> -valor
KH_2PO_4	-0,003	0,005	-0,635	0,5415
$\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$	0,012	0,005	2,590	0,0292
Na_2HPO_4	>-0,001	0,005	-0,084	0,9349
EL*	0,010	0,005	2,184	0,0567
$\text{CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$	0,002	0,005	0,345	0,7383
Glicerol	0,002	0,005	0,465	0,6527
pH inicial	-0,002	0,005	-0,466	0,6520
T**	-0,005	0,005	-1,030	0,3300
$\text{ZnSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$	-0,002	0,005	-0,402	0,6970
$\text{FeCl}_3.6\text{H}_2\text{O}$	-0,004	0,005	-0,787	0,4513

*EL: extrato de levedura; **T: temperatura.

Conforme observado na Tabela 4, somente as variáveis $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ e extrato de levedura apresentaram efeito significativo ($p < 0,1$) sobre a produtividade de biomassa, incrementando esta resposta em $0,012 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e $0,010 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente, ao passar do nível -1 para o nível + 1.

A Tabela 5 apresenta os efeitos estimados, obtidos no planejamento Plackett-Burman, para a resposta teor de lipídios.

Tabela 5 - Efeitos estimados para o teor de lipídios (%).

Fator	Efeito (%)	Erro padrão	<i>t</i> (9)	<i>p</i> -valor
KH_2PO_4	0,01	5,08	<0,01	0,9987
$\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$	10,94	5,08	2,15	0,0596
Na_2HPO_4	1,35	5,08	0,27	0,7962
EL*	-6,88	5,08	-1,35	0,2085
$\text{CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$	-1,84	5,08	-0,36	0,7257
Glicerol	2,34	5,08	0,46	0,6561
pH inicial	-4,66	5,08	-0,92	0,3827
T**	-3,98	5,08	-0,78	0,4538
$\text{ZnSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$	2,36	5,08	0,46	0,6534
$\text{FeCl}_3.6\text{H}_2\text{O}$	-7,74	5,08	-1,52	0,1617

*EL: extrato de levedura; **T: temperatura.

Conforme observado na Tabela 5, a concentração de $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ foi a única variável que apresentou efeito significativo positivo ($p < 0,1$) sobre o teor de lipídios, sendo que o incremento desta variável de 0 g.L^{-1} (sem adição) para 3 g.L^{-1} resultou num aumento significativo de 10,94% no teor de lipídios.

A Tabela 6 apresenta os efeitos estimados obtidos no planejamento Plackett-Burman para a resposta lipídios totais.

Tabela 6 - Efeitos estimados para os lipídios totais (g.L⁻¹).

Fator	Efeito (g.L ⁻¹)	Erro padrão	<i>t</i> (9)	<i>p</i> -valor
KH ₂ PO ₄	-0,63	0,61	-1,02	0,3321
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,81	0,61	2,95	0,0161
Na ₂ HPO ₄	0,03	0,61	0,06	0,9559
EL*	1,12	0,61	1,82	0,1014
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,43	0,61	0,70	0,5014
Glicerol	0,37	0,61	0,60	0,5639
pH inicial	-0,54	0,61	-0,87	0,4042
T**	-1,03	0,61	-1,68	0,1271
ZnSO ₄ .7H ₂ O	-0,04	0,61	-0,06	0,9532
FeCl ₃ .6H ₂ O	-0,93	0,61	-1,51	0,1650

*EL: extrato de levedura. **T: temperatura.

De acordo com a Tabela 6, novamente, apenas a variável concentração de MgSO₄.7H₂O apresentou efeito significativo positivo ($p < 0,1$) para a resposta lipídios totais, sendo que a sua passagem do nível -1 para o nível +1 incrementou a resposta em 1,81 g.L⁻¹.

A Tabela 7 apresenta os efeitos estimados, obtidos no planejamento Plackett-Burman, para a resposta produtividade de lipídios.

De acordo com a Tabela 7 apenas a variável MgSO₄.7H₂O apresentou efeito significativo positivo ($p < 0,1$), para a resposta produtividade de lipídios, assim como ocorreu para a resposta lipídios totais.

Segundo Li et al. (2006), a otimização das concentrações de Zn²⁺ e de outros metais podem aumentar a biomassa e o conteúdo lipídico em micro-organismos. Entretanto, altas concentrações de metais pesados podem causar a inibição do crescimento microbiano, alteração do pH e inativação de enzimas associadas à biossíntese das moléculas de interesse.

Castanha et al. (2013), em estudo que visava a utilização de soro de leite para produção de lipídios por leveduras oleaginosas, obtiveram, mediante a análise dos efeitos da suplementação do meio de cultivo com sais inorgânicos, a partir de um delineamento Plackett-Burman, resultados distintos aos observados neste trabalho. Segundo os autores, a concentração de MgSO₄.7H₂O não apresentou efeito significativo

nas respostas biomassa e lipídios totais em cultivos com a levedura oleaginosa *Cryptococcus laurentii* 11. Contudo, a produção de lipídios totais foi diretamente influenciada pela concentração de $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

Tabela 7 - Efeitos estimados para a produtividade de lipídios ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

Fator	Efeito ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	Erro padrão	<i>t</i> (9)	<i>p</i> -valor
KH_2PO_4	-0,002	0,003	-0,538	0,6035
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,008	0,003	2,359	0,0426
Na_2HPO_4	<0,001	0,003	0,006	0,9950
EL*	0,004	0,003	1,214	0,2556
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,001	0,003	0,305	0,7670
Glicerol	0,001	0,003	0,327	0,7509
pH inicial	-0,002	0,003	-0,489	0,6363
T*	-0,004	0,003	-1,077	0,3095
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	>-0,001	0,003	-0,084	0,9346
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-0,003	0,003	-0,951	0,3662

*EL: extrato de levedura; **T: temperatura

Observando-se os dados obtidos na análise de efeitos segundo o delineamento Plackett-Burman, os maiores efeitos significativos positivos ($p < 0,1$), entre as variáveis independentes estudadas, foram para as concentrações de extrato de levedura (sobre a biomassa máxima e produtividade em biomassa) e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (sobre a biomassa máxima, produtividade em biomassa, teor de lipídios, lipídios totais produzidos e produtividade em lipídios), sendo portanto ambas fixadas no nível +1 (1,2 e 3 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente).

Com relação à temperatura, que apresentou efeito significativo negativo sobre a biomassa, esta foi fixada no nível -1 (25°C). Como as demais variáveis não apresentaram efeitos significativos em nenhuma das respostas, foram todas fixadas no nível -1, visando à redução dos custos de produção. Cabe salientar, diante disso, a exclusão dos sais de cálcio, ferro e zinco do meio.

Desta forma chegou-se a seguinte condição experimental: 30,0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ glicerol; 5,0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 ; 1,0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Na_2HPO_4 ; 3,0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,2 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ extrato de levedura; pH inicial 4,5; temperatura 25°C.

Como esta condição não constava na matriz do planejamento experimental, foram realizados ensaios em triplicata utilizando esta condição estabelecida pela análise de efeitos, comparando-a com o ensaio do planejamento Plackett-Burman que resultou

nas melhores respostas (Ensaio 5). As duas condições se diferenciam pelas concentrações de Na_2HPO_4 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, fixadas no nível +1 no Ensaio 5 (3 g.L^{-1} , $0,134 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,2 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente), e no nível -1 (1 g.L^{-1} , 0 g.L^{-1} , 0 g.L^{-1} , respectivamente) de acordo com o planejamento experimental. Ambos os ensaios foram realizados em triplicata.

A Figura 1 mostra a produção de biomassa e a variação de pH para a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* nas diferentes condições de cultivo indicadas, evidenciando que o comportamento relativo ao crescimento celular e à variação de pH foi similar em ambas condições.

A Tabela 8 apresenta médias \pm desvio padrão para biomassa máxima, produtividade de biomassa, teor de lipídios, lipídios totais e produtividade de lipídios ao término dos cultivos para a condição correspondente ao Ensaio 5 do planejamento e a condição estabelecida pela análise de efeitos.

Figura 1 - Biomassa e pH ao longo do cultivo de *Rhodotorula mucilaginosa*. Ensaio 1 (●): correspondente à condição do Ensaio 5 do planejamento experimental; Ensaio 2 (□): corresponde à condição estabelecida pela análise de efeitos do planejamento experimental.

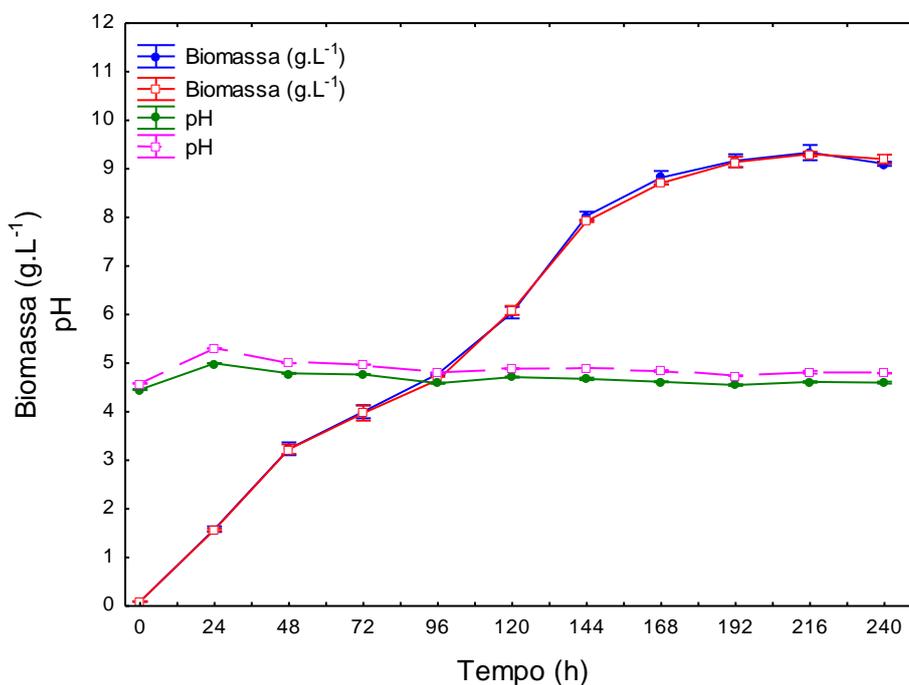


Tabela 8 - Médias \pm desvio padrão para biomassa máxima, produtividade de biomassa, teor de lipídios, lipídios totais e produtividade de lipídios e análise estatística dos dados.*

Ensaio	$X_{\text{máx}}$ (g.L ⁻¹)	P_X (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)****	Lip (%)	Lip_T (g.L ⁻¹)	P_L (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)****
1**	9,10 \pm 0,04 ^a	0,038 ^a	59,39 \pm 0,39 ^a	5,40 \pm 0,06 ^a	0,022 ^a
2***	9,20 \pm 0,09 ^a	0,038 ^a	59,96 \pm 0,65 ^a	5,51 \pm 0,11 ^a	0,023 ^a

$X_{\text{máx}}$: biomassa máxima; P_X : produtividade de biomassa; Lip: teor de lipídios em base seca; Lip_T : lipídios totais produzidos; P_L : produtividade de lipídios.

*Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

**Condição correspondente ao Ensaio 5 do planejamento experimental.

***Condição estabelecida pela análise de efeitos do planejamento experimental.

**** para P_X e P_L desvio padrão menor que 10^{-3} .

Conforme a Tabela 8, não foram observadas diferenças significativas entre os parâmetros obtidos nas condições experimentais testadas. Este fato corrobora os resultados obtidos no planejamento experimental no que diz respeito aos efeitos das variáveis, pois justamente o que diferencia os dois meios, concentrações de Na_2HPO_4 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, não demonstraram qualquer efeito significativo sobre os parâmetros de cultivo estudados.

Cabe salientar, diante disso, que a condição de cultivo estabelecida pela análise de efeitos do planejamento experimental representa uma redução de custos, com um meio de cultivo economicamente mais viável, além de um acréscimo de cerca de 50% nos lipídios totais produzidos em relação às condições inicialmente testadas (meio proposto por Evans; Ratledge, 1983), correspondente ao ponto central do planejamento Plackett e Burman, decorrentes do aumento da biomassa produzida com a manutenção do teor de lipídios.

3.2. Cinética do consumo de glicerol, acúmulo de lipídios e perfil de ácidos graxos

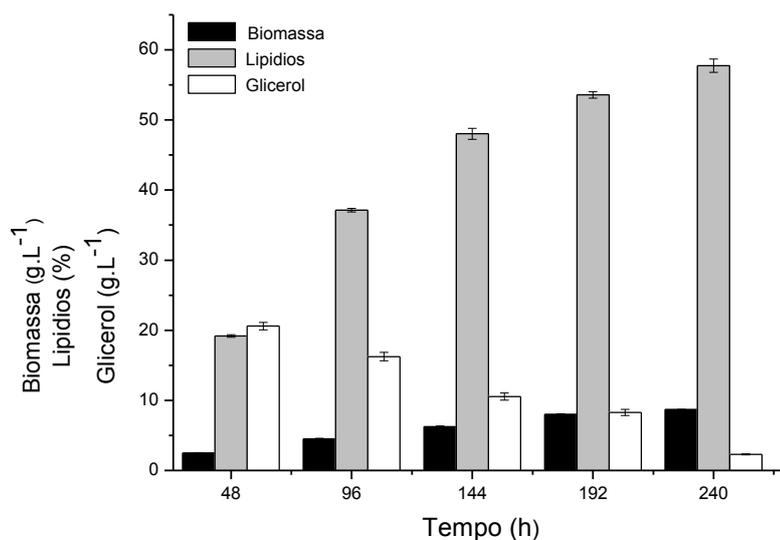
A fim de avaliar o comportamento da levedura silvestre *Rhodotorula mucilaginosa* ao longo do cultivo, a mesma foi cultivada nas condições estabelecidas pelo planejamento experimental: 30,0 g.L⁻¹ glicerol; 5,0 g.L⁻¹ KH_2PO_4 ; 1,0 g.L⁻¹ Na_2HPO_4 ; 3,0 g.L⁻¹ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,2 g.L⁻¹ extrato de levedura; pH inicial 4,5; temperatura 25°C.

A Figura 2 apresenta o acompanhamento da concentração de glicerol, biomassa e acúmulo de lipídios pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* ao longo do cultivo em frascos agitados.

É possível observar (Figura 2) que o acúmulo de lipídios ocorre gradativamente, ao longo do cultivo, acompanhando o crescimento celular da levedura, passando de $19,19 \pm 0,18\%$ em 48 h de cultivo para $57,74 \pm 0,93\%$ em 240 h de cultivo. O cultivo foi interrompido em 240 h, sendo a fase estacionária atingida por volta de 192 h, pois embora o acúmulo lipídico continue durante a fase estacionária, períodos prolongados podem levar a degradação dos lipídios formados.

De acordo com Beopoulos, Nicaud; Gaillardin, (2011), leveduras sob limitação de nutrientes passam por três fases de crescimento. No início ocorre a proliferação celular (fase exponencial de crescimento), o crescimento é reduzido quando nutrientes tornam-se limitantes e as células começam a acumular lipídios e entram na fase estacionária onde o acúmulo de lipídios continua. Entretanto, nessa fase, a β -oxidação também se inicia em um esforço para remobilizar o carbono armazenado, até que as células não possam mais produzir metabólitos essenciais e interrompam a atividade metabólica.

Figura 2 - Acompanhamento da concentração de glicerol, biomassa e acúmulo de lipídios da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* ao longo do tempo de cultivo.



Neste cultivo, realizado conforme condição apontada pela análise de efeitos, utilizou-se uma relação C/N de 93 g.g^{-1} visando o acúmulo intracelular de lipídios. É possível constatar (Figura 2) que a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* se adaptou bem ao substrato utilizado, visto que o glicerol bruto proveniente da síntese do biodiesel foi perfeitamente assimilado pela levedura, que consumiu em torno de 92% do glicerol presente no meio, apresentando um fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) de $0,37 \text{ g.g}^{-1}$ e um fator de conversão de substrato em lipídios $Y_{L/S}$ de $0,20 \text{ g.g}^{-1}$. Segundo Taccari et al. (2012) a maioria das leveduras e fungos filamentosos que crescem aerobicamente em meio contendo glicose apresentam um fator de conversão de substrato em células entre 0,4 a $0,8 \text{ g.g}^{-1}$. Estes autores relataram um $Y_{X/S}$ de 0,67 para a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* DiSVA 6094 cultivada em meio contendo glicose como principal fonte de carbono.

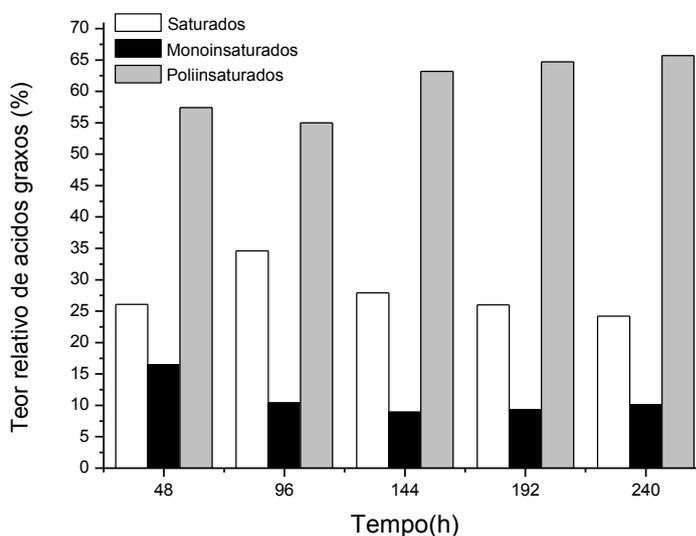
O consumo de glicerol apresentou-se proporcional à produção de biomassa, sendo mais pronunciado nas primeiras 48 h de cultivo (Figura 2), devido ao mesmo ser utilizado, inicialmente, para o crescimento celular, que é mais acelerado no início do cultivo (fase logarítmica do crescimento celular). Já ao final do cultivo o crescimento celular desacelera, devido ao esgotamento de nutrientes no meio.

A Figura 3 apresenta o acompanhamento do teor relativo de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados dos lipídios extraídos da biomassa da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* ao longo do tempo de cultivo.

Observa-se na Figura 3 que no perfil de ácidos graxos encontrados há o predomínio de ácidos graxos insaturados. A temperatura, que neste estudo apresentou efeito negativo significativo, é uma variável importante a ser considerada. Estudos relatam que a temperatura pode ter influência sobre a formação de ácidos graxos, perfil e grau de saturação dos mesmos (RUANGUDOM; PUNPENG, 2011). Segundo Beopoulos et al. (2009), a composição de ácidos graxos é dependente da temperatura de cultivo, pois o grau de saturação geralmente diminui com o decréscimo da temperatura.

Outro parâmetro importante a ser considerado é o tempo de cultivo, pois segundo Ratledge (2004) a biossíntese de ácidos graxos, em praticamente todos os organismos, culmina na formação dos ácidos graxos saturados C:16 ou C:18. Esses ácidos graxos são então modificados através de uma sequência de enzimas dessaturases e elongases para que ácidos graxos insaturados e poli-insaturados sejam formados. Os ácidos graxos produzidos em maior abundância dependem também da composição genética de cada espécie.

Figura 3 - Acompanhamento do teor relativo de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* ao longo do tempo de cultivo.



A Tabela 9 apresenta o perfil de ácidos graxos da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* ao longo das 240 h de cultivo (Apêndice F).

Tabela 9 - Perfil de ácidos graxos da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* ao longo de 240 h de cultivo.

Teor relativo de ácidos graxos totais (%) ^a					
Ácido Graxo	48 h	96 h	144 h	192 h	240 h
C14:0	1,6	1,2	0,9	0,9	0,9
C16:0	22,8	26,0	24,9	24,6	23,7
C16:1	0,7	1,4	1,6	1,5	1,6
C 18:1n-9	8,7	5,1	3,9	4,7	4,4
C18:2n-6	39,0	43,3	46,7	49,0	52,0
C 18:3n-3	6,2	5,7	5,8	6,3	5,6
C 18:3n-6	6,6	6,9	6,4	6,7	6,0
C 20:1n-9	5,7	3,2	3,3	2,8	3,8
C 22:0	1,0	0,6	0,7	0,5	1,0
C 22:6n-3	1,7	1,3	0,7	0,5	0,4

^a Alguns ácidos graxos foram detectados em quantidades traço e não foram incluídos na tabela.

Analisando-se o perfil de ácidos graxos ao longo das 240 h de cultivo (Tabela 9), verifica-se que as concentrações tanto dos ácidos saturados, quanto dos insaturados e poli-insaturados oscilaram entre concentrações maiores e menores no decorrer de todo o tempo de cultivo com algumas exceções, como a do ácido oleico, cuja concentração reduziu quase pela metade ao término do cultivo; a do ácido docosahexaenoico, um ácido essencial $\omega 3$, cuja concentração foi diminuindo gradativamente ao longo do cultivo; e a do ácido linoleico, a qual foi aumentando também de forma gradativa. Resultados semelhantes foram encontrados por Sitepu et al. (2013). Segundo os autores, a variação da composição do meio e do tempo de cultivo afetou a quantidade relativa de determinados ácidos graxos como, por exemplo, a síntese do ácido linoleico, que aumentou com a limitação de nitrogênio e com um maior tempo de cultivo.

Liang et al. (2010), utilizando glicerol bruto como substrato, no cultivo de *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 em batelada alimentada, com análise do perfil de ácidos graxos em 3, 6, 9 e 11 dias de cultivo, encontraram, como majoritários, os ácidos C16:0, C18:0, C18:1 e C18:2. Demonstraram que a concentração do ácido palmítico aumentou de 16% (dias 3 e 6) para 23% (dias 9 e 11), a concentração do ácido esteárico variou ao longo do cultivo e a do ácido oleico se manteve praticamente estável, enquanto a concentração de ácido linoleico diminuiu de 23% (dia 3) para 13% (dias 6, 9 e 11).

No presente trabalho, o ácido linoleico, um ácido graxo poli-insaturado de cadeia longa, se destacou dentre os demais, chegando a 52%, apresentando, assim, semelhança com a composição dos óleos de soja, girassol e algodão, ricos em ácido linoleico (acima de 50%) e normalmente utilizados para a produção de biodiesel (YAN et al., 2014). É importante destacar, ainda, que a produção microbiana de óleos é mais vantajosa, por não depender das mudanças climáticas e pela possibilidade em utilizar resíduos e coprodutos industriais como substrato (CHEIRSILP; LOUHASAKUL, 2013).

4. CONCLUSÃO

Através de um planejamento Plackett-Burman foi possível estabelecer as variáveis com maior influência na produção de lipídios por *Rhodotorula mucilaginosa*, sendo elas as concentrações de extrato de levedura (biomassa máxima e produtividade em biomassa) e $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (biomassa máxima, produtividade em biomassa, teor de

lipídios, lipídios totais produzidos e produtividade em lipídios). Também foi possível a exclusão dos sais de cálcio, ferro e zinco do meio.

O acompanhamento do cultivo ao longo do tempo mostrou a excelente adaptação da levedura ao meio que continha glicerol bruto como principal fonte de carbono, evidenciado pelo consumo quase total do mesmo, bem como o aumento no teor de lipídios da biomassa e no teor relativo do ácido linoleico, que em tempos maiores de cultivo se tornaram mais elevados.

Desta forma, a bioconversão de glicerol bruto em óleos microbianos pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* pode constituir uma alternativa promissora, com potencial para minimizar resíduos, diminuir custos e ser utilizada na produção de biodiesel de segunda geração.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMI, D.; POSTERI, R.; MEREGHETTI, P.; PORRO, D.; DOGLIA, S. M.; BRANDUARDI, P. Fourier transform infrared spectroscopy as a method to study lipid accumulation in oleaginous yeasts. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, p.1-14, 2014.

AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis. 17. ed. Washington, D.C., 2000. CD-ROM.

BEATRIZ, A.; ARAUJO, Y. J. K.; LIMA, D. P. **Glicerol: um breve histórico e aplicação em sínteses estereosseletivas. Química Nova**, v. 34, p. 306-319, 2011.

BEOPOULOS, A.; CESCUT, J.; HADDOUCHE, R.; URIBELARREA, J.; MOLINA-JOUVE, C.; NICAUD, J. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. **Progress in Lipid Research**, v. 91, p. 692–696, 2009.

BEOPOULOS, A.; NICAUD, J. M.; GAILLARDIN, C. An overview of lipid metabolism in yeast and its impact on biotechnological processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 10, p. 1193-1203, 2011.

BLIGH, E. G.; DYER, J. W. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911–917, 1959.

CASTANHA, R. F.; MORAIS, L. A. S.; MARIANO, A. P.; MONTEIRO, R. T. R. Comparison of two lipid extraction methods produced by yeast in cheese whey. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, p. 629-636, 2013.

CHEIRSILP, B.; LOUHASAKUL, Y. Industrial wastes as a promising renewable source for production of microbial lipid and direct transesterification of the lipid into biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 329–337, 2013.

- CHOI, M. H.; PARK, Y. H. Production of yeast biomass using waste Chinese cabbage. **Biomass and Bioenergy**, v. 25, p. 221-226, 2003.
- CRUGER, W.; CRUEGER, A. Substratos para la fermentación industrial. In: **Biotecnología: manual de microbiología industrial**. Madrid: Acribia, 1993. p. 61-65.
- DUARTE, S.H.; GHISELLI, G.; MAUGERI, F. Influence of culture conditions on lipid production by *Candida sp.* LEB-M3 using glycerol from biodiesel synthesis. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, p. 339–343, 2013.
- EVANS, C. T.; RATLEDGE, C. Biochemical activities during lipid accumulation in *Candida curvata*. **Lipids**, v. 18, p. 9 -16, 1983.
- GRIFFITHS, M. J.; HARRISON, S. T. L. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. **Journal of Applied Phycology**, v. 21, p. 493–507, 2009.
- HAALAND, P D. **Experimental design in biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1989, 284 p.
- KITCHA, S.; CHEIRSIL, B.; Screening of oleaginous yeasts and optimization for lipid production using crude glycerol as a carbon source. **Energy Procedia**, v. 9, p. 274–282, 2011.
- KODAMA, S.; NAKANISHI, H.; THALAGALA, T. A. T. P.; ISONO, N.; HISAMATSU, M. A wild and tolerant yeast suitable for ethanol fermentation from lignocellulose. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 115, p. 557-561, 2013.
- LEIVA-CANDIA, D. E.; PINZI, S.; REDEL-MACÍAS, M. D.; KOUTINAS, A.; WEBB, C., DORADO, M. P. The potential for agro-industrial waste utilization using oleaginous yeast for the production of biodiesel. **Fuel**, v. 123, p. 33-42, 2014.
- LEONETI, A. B.; ARAGÃO-LEONETI, V.; OLIVEIRA, S.V.W.B. Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: alternatives for the use of unrefined glycerol. **Renewable Energy**, v. 45, p. 138-145, 2012.
- LI, Y. H.; LIU, B.; ZHAO, Z. B.; BAI, F. W. Optimized culture medium and fermentation conditions for lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 650–656, 2006.
- LI, Q.; DU, W.; LIU, D. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, p. 749–756, 2008.
- LI, M.; LIU, G. L.; CHI, Z.; CHI, Z. M. Single cell oil production from hydrolysate of cassava starch by marine-derived yeast *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, p. 101-107, 2010.
- LIANG, Y.; CUI, Y.; TRUSHENSKI, J.; BLACKBURN, J. W. Converting crude glycerol derived from yellow grease to lipids through. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7581-7586, 2010.

LIBKIND, D.; GADANHO, M.; BROOCK, M., SAMPAIO, J. P. Studies on the heterogeneity of the carotenogenic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* from Patagonia, Argentina. **Journal of Basic Microbiology**, v. 48, p. 93-98, 2008.

MANIRAKIZA, P.; COVACI, A.; SCHEPENS, P. Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and modified Bligh & Dyer extraction methods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, p. 93-100, 2001.

MEHER, L. C.; SAGAR, D. V.; NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification — a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 10, p. 248–268, 2006.

METCALFE, L. D.; SCHIMTZ, A. A.; PELKE, J. R. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 38, p. 514-515, 1966.

MOLINÉ, M.; LIBKIND, D.; BROOCK, M. Production of torularhodin, torulene, and β -carotene by *Rhodotorula* yeasts. **Methods in Molecular Biology**, v. 898, p. 275-283, 2012.

OTERO, D.M. **Bioprospecção de leveduras silvestres produtoras de carotenoides**. Rio Grande, 2011. 93 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

PAPANIKOLAOU, S.; SARANTOU, S.; KOMAITIS, M. Repression of reserve lipid turnover in *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina* cultivated in multiple limited media. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 867–875, 2004.

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 113, p. 1031–1051, 2011.

PIROZZI, D.; AUSIELLO, A.; ZUCCARO, G.; SANNINO, F.; YOUSUF, A. Culture of oleaginous yeasts in dairy industry wastewaters to obtain lipids suitable for the production of II-generation biodiesel. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v. 7, p. 4-26, 2013.

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

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de Processos**. 2 ed. Campinas: Casa de Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009, p.358.

RUANGUDOM, C.; PUNPENGB. Effect of C/N ratio and temperature on lipid accumulation of *Rhodospiridium toruloides* TISTR 5123 using sugar cane juice. In: **Proceedings of the 12th ASEAN Food Conference**, BITEC Bangna, Bangkok, Thailand, 2011.

SANTOS, E. O.; MICHELON, M.; FURLONG, E. B.; BURKERT, J. F. M; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V. Evaluation of the composition of culture medium for yeast

biomass production using raw glycerol from biodiesel synthesis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 432-440, 2012.

SAWANGKEAWA, R.; NGAMPRASERTSITH, S. A review of lipid-based biomasses as feedstocks for biofuels production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 25, p. 97–108, 2013.

SCHULZE, I.; HANSEN, S.; GROBHANS, S.; RUDSZUCK, T.; OCHSENREITHER, K.; SYLDATK, C.; NEUMANN, A. Characterization of newly isolated oleaginous yeasts - *Cryptococcus podzolicus*, *Trichosporon porosum* and *Pichia segobiensis*. **AMB Express**, v. 4, p. 1-11, 2014.

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

SITEPU, I. R.; SESTRIC, R.; IGNATIA, L.; LEVIN, D.; GERMAN, J. B.; GILLIES, L. A.; ALMADA, L. A. G.; BOUNDY-MILLS, K. L. Manipulation of culture conditions alters lipid content and fatty acid profiles of a wide variety of known and new oleaginous yeast species. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 360–369, 2013.

TACCARI, M.; CANONICO, L.; COMITINI, F.; MANNAZZU, I.; CIANI, M. Screening of yeasts for growth on crude glycerol and optimization of biomass production. **Bioresource Technology**, v.110, p. 488–495, 2012.

YAN, Y.; LI, X.; WANG, G.; GUI, X.; LI, G.; SU, F.; WANG, X.; LIU, T. Biotechnological preparation of biodiesel and its high-valued derivatives: A review. **Applied Energy**, v. 113, p. 1614–1631, 2014.

ARTIGO III**ISOLAMENTO, SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS
SILVESTRES COM POTENCIAL PARA BIOCONVERSÃO DE GLICEROL
BRUTO EM LIPÍDIOS**

ISOLAMENTO, SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS SILVESTRES COM POTENCIAL PARA BIOCONVERSÃO DE GLICEROL BRUTO EM LIPÍDIOS

RESUMO

Com o esgotamento dos combustíveis fósseis e a poluição do meio ambiente, energias renováveis e limpas vêm se tornando muito importantes para o desenvolvimento sustentável da humanidade. Neste contexto, o biodiesel vem sendo empregado, substituindo parcialmente o diesel de petróleo. Contudo, o custo da produção do biodiesel é elevado, sendo que o uso de matérias-primas mais baratas e o aproveitamento dos coprodutos gerados certamente reduziriam os custos totais do processo. Diante disso, lipídios microbianos têm recebido interesse como matéria-prima potencial para produção de biodiesel. Devido à grande biodiversidade brasileira e ao crescente interesse em micro-organismos ainda não catalogados, o presente trabalho teve como objetivo isolar, selecionar e identificar linhagens de leveduras silvestres a partir da biodiversidade presente em amostras ambientais com potencial para metabolizar glicerol bruto e acumular lipídios. No presente estudo, 36 colônias com morfologia típica de levedura e capacidade de utilizar glicerol bruto como principal fonte de carbono foram isoladas a partir de amostras ambientais. O método de coloração de colônia com Sudan Black B pré-selecionou 10 das 36 leveduras isoladas como potenciais produtoras de lipídios. As leveduras que apresentaram maior intensidade de cor, entre média e forte, identificadas como *Cryptococcus humicola*, *Meyerozyma guilliermondii* e *Schwanniomyces variijiae*, foram cultivadas em meio contendo glicerol bruto, acompanhando-se a cinética de crescimento celular ao longo dos cultivos, bem como o teor de lipídios e o perfil de ácidos graxos ao término dos mesmos. A levedura *Cryptococcus humicola* se destacou no acúmulo de lipídios, com um conteúdo de 29,97%, assim como nos lipídios totais produzidos, atingindo 1,86 g.L⁻¹, resultados significativamente superiores aos encontrados para *Meyerozyma guilliermondii* e *Schwanniomyces variijia*. O perfil de ácidos graxos encontrado foi semelhante aos de óleos vegetais utilizados na síntese de biodiesel, além de apresentar uma quantidade apreciável de ácidos graxos essenciais. Os resultados deste estudo indicam o potencial dessas leveduras para produção de lipídios microbianos e ácidos graxos de interesse a partir de um coproduto gerado na síntese do biodiesel.

Palavras-chave: screening de micro-organismos, Sudan Black B, lipídios microbianos.

1. INTRODUÇÃO

Com o esgotamento dos combustíveis fósseis e a poluição do meio ambiente, energias renováveis e limpas vêm se tornando muito importantes para o desenvolvimento sustentável da humanidade. Os problemas ambientais causados pela emissão dos gases de combustão dos combustíveis fósseis têm incentivado a produção de biodiesel, que é considerado um combustível de carbono neutro, pois seu teor de carbono é fixado inicialmente a partir da atmosfera. Sabe-se que o biodiesel é um dos mais promissores dentre as energias renováveis e limpas (YAN et al. 2014). O biodiesel é uma mistura de ésteres monoalquílicos produzida a partir de fontes biológicas, tais como óleos vegetais, gorduras animais e resíduos de óleo de cozinha (TALEBIAN-KIAKALAEH, AMIN; MAZAHERI, 2013). Contudo, o custo da produção do biodiesel é elevado, devido às matérias-primas que vêm sendo utilizadas (70-75% do custo total). O uso de matérias-primas mais baratas na síntese do biodiesel certamente reduziria os custos totais de produção (CHEIRSILP; LOUHASAKUL, 2013).

Os lipídios microbianos, produzidos por micro-organismos oleaginosos, incluindo bactérias, fungos, algas e leveduras, têm recebido interesse como matéria-prima potencial para produção de biodiesel, devido à sua composição de ácidos graxos semelhante à de óleos vegetais comumente utilizados na produção de biodiesel (YEN; YANG, 2012). As leveduras possuem vantagens sobre os demais micro-organismos, pois são mais robustas, fáceis de manusear e de ser aplicadas na produção em larga escala (PAPANIKOLAOU, 2011; LIANG; JIANG, 2013). Apresentam tempo de duplicação mais rápido que os demais, alto teor lipídico e não estão sujeitas a variações sazonais, ou limitações de espaço (SITEPU et al., 2013).

Além disso, as leveduras oleaginosas têm a capacidade de utilizar uma grande variedade de substratos alternativos que constituem uma fonte de carbono de baixo custo. Enquanto as primeiras investigações utilizavam geralmente glicose como fonte principal de carbono, atualmente resíduos, coprodutos e excedentes de produção são cada vez mais utilizados, levando à redução de custos e de resíduos (AMI et al., 2014). Em particular, amido de milho (GEN, WANG; CHI, 2014), melão de cana (FREITAS et al., 2014), xilose e dextrose (EASTERLING et al., 2009) e glicerol bruto (MAKRI, FAKAS; AGGELIS, 2010; THIRU, SANKH; RANGASWAMY, 2011; CHATZIFRAGKOU et al., 2011; TACCARI et al., 2012) têm sido relatados como possíveis substratos.

No entanto, até o momento, o biodiesel obtido a partir de lipídios microbianos é economicamente insustentável, já que seus custos de produção ainda são mais elevados do que o biodiesel obtido a partir de culturas agrícolas (SCHNEIDER et al., 2013). Portanto, novas estratégias devem ser apresentadas a fim de reduzir os custos globais. Considerando toda a biomassa microbiana, tem-se frações que podem ser convertidas em biocombustíveis e frações que podem dar origem a produtos de alto valor agregado, tornando possível a produção de biocombustíveis de forma sustentável. Se a biomassa de levedura, além de seu elevado teor lipídico, que pode ser convertido em biodiesel, fosse também rica em carotenoides, ácidos graxos essenciais e outros produtos de alto valor agregado, com aplicações na indústria farmacêutica, nutracêutica e de alimentos, sua comercialização contribuiria, substancialmente, na redução dos custos gerais do processo (SILVA, GOUVEIA; REIS, 2013).

Das mais de 1600 espécies de leveduras conhecidas, não mais que 40 foram consideradas oleaginosas. Dentre elas estão as leveduras do gênero *Candida*, *Lipomyces*, *Yarrowia*, *Cyberlindnera*, *Geotrichum*, *Kodamaea*, *Magnusiomyces*, *Metschnikowia*, *Trigonopsis* e *Wickerhamomyces*, pertencentes ao grupo dos ascomicetos, bem como as leveduras do gênero *Cryptococcus*, *Guehomyces*, *Leucosporidiella*, *Pseudozyma*, *Rhodospidium*, *Rhodotorula* e *Trichosporon*, que pertencem ao grupo dos basidiomicetos (SITEPU et al., 2013).

Ambientes tropicais são uma das maiores fontes de todos os tipos de organismos vivos, incluindo fungos unicelulares e leveduras com ampla distribuição ao longo dos ecossistemas (MAUGERI; HERNALSTEENS, 2007). O Brasil apresenta uma mistura extremamente diversificada e única de vegetação, sendo o país com a maior biodiversidade do planeta. Devido à grande biodiversidade brasileira, espécies de micro-organismos não são conhecidas em sua totalidade, sendo importante seu melhor aproveitamento. Atualmente, há um grande interesse em micro-organismos não catalogados que sejam produtores de insumos interessantes à indústria em geral (HERNALSTEENS; MAUGERI, 2010).

Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo isolar, selecionar e identificar linhagens de leveduras silvestres a partir da biodiversidade presente em amostras ambientais com potencial para metabolizar glicerol bruto e acumular lipídios.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Glicerol bruto

Utilizou-se glicerol bruto proveniente da obtenção de biodiesel a partir do óleo degomado de soja por via metanólica, fornecido pela empresa BS Bios Indústria e Comércio de Biodiesel Sul Brasil S/A, localizada em Passo Fundo-RS. O glicerol bruto continha (%): 6,51 cinzas; 6,18 cloreto de sódio; 9,78 umidade; 1,22 matéria orgânica não glicerídica; 82,49 glicerol; e pH 4,91.

2.2. Coleta de amostras

Foram coletadas amostras de solos, flores, raízes, cascas de árvores, folhas e frutos presentes na Planície Costeira do Rio Grande do Sul, região de clima subtropical úmido, situada nas coordenadas 31°59' de latitude Sul e 52°15' de longitude Oeste. As amostras foram coletadas em dias diferentes com o auxílio de luvas, álcool 70% e espátulas previamente esterilizadas. As mesmas foram armazenadas em sacos plásticos estéreis e transportadas em caixas de isopor com gelo até o laboratório.

2.3. Isolamento e manutenção das colônias isoladas

As amostras coletadas no meio ambiente foram quantificadas (1 g) e transferidas para frascos Erlenmeyer de 250 mL que continham 50 mL de meio de enriquecimento proposto por Pan et al. (2009) composto por (g.L⁻¹): 100 glicerol, 1 (NH₄)₂SO₄, 1 KH₂PO₄, 0,5 MgSO₄.7H₂O e 0,2 extrato de levedura. As amostras foram incubadas a 28°C por 24 h. Após este período foi retirado 1 mL do meio de enriquecimento, adicionado a 9 mL de água destilada (diluição 10⁻¹), sendo 0,1 mL inoculado em placas de Petri com auxílio de alça de Drigalski em meio ágar YM (*Yeast Malt*), com a seguinte composição (g.L⁻¹): 3 extrato de malte, 3 extrato de levedura, 5 peptona, 10 glicose, 20 ágar. A seguir incubou-se a 30°C por 120 h. Estas leveduras foram reisoladas pelo método de esgotamento em estrias em placas de Petri contendo meio ágar YM (30°C por 72 h). As colônias isoladas, com morfologia típica de levedura, foram transferidas para tubos de ensaio com meio ágar inclinado YM, sendo armazenadas sob refrigeração (4°C) imersas em óleo mineral.

2.4. Pré-seleção de leveduras oleaginosas

A pré-seleção das cepas de leveduras com maior potencial para assimilar o glicerol e acumular lipídios foi realizada através da técnica de coloração com Sudan Black B (EVANS, RATLEDGE; GILBERT, 1985). Com esse propósito, colônias de cada micro-organismo foram inoculadas em placas de Petri com meio de cultivo indutor do acúmulo de lipídios, proposto por Evans; Ratledge (1983), que continha (g.L^{-1}): 50,0 glicerol P.A.; 7,0 KH_2PO_4 ; 2,0 Na_2HPO_4 ; 1,5 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 CaCl_2 ; 0,008 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,0001 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,8 extrato de levedura, 20 ágar ; pH ajustado a 5,5. As placas foram incubadas por 96 h a 30°C até que as colônias atingissem aproximadamente 2-3 mm de diâmetro. A partir das colônias presentes nas placas de Petri, foi realizada uma réplica de impressão em papel filtro Whatman nº1 e, com a utilização da solução Sudan Black B, foi possível definir através da cor formada no papel as leveduras que acumularam lipídios, sendo que estas apresentaram tom de cor azulado típico de leveduras oleaginosas. A técnica foi aplicada em triplicata.

2.5. Identificação das leveduras pré-selecionadas

A identificação das leveduras foi realizada pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa no Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Para a identificação das leveduras pré-selecionadas, um isolado de cada perfil molecular e fisiológico obtido foi selecionado e submetido ao sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA, e posteriormente amplificado por PCR, conforme descrito por Lachance et al. (1999). O DNA amplificado foi concentrado, limpo e sequenciado num sistema de sequenciamento automático MegaBACETM 1000 (Amersham Biosciences, EUA). As seqüências foram montadas, editadas e alinhadas com o programa MEGA 5 (TAMURA et al., 2011) e comparadas com as seqüências já depositadas no GenBank.

2.6. Preparo do inóculo

As leveduras armazenadas foram reativadas em ágar inclinado YM até desenvolvimento das colônias. Posteriormente, dois tubos da cultura microbiana reativada foram raspados com 10 mL de água peptonada 0,1%, cada, para remoção das células do micro-organismo e transferidos para frascos Erlenmeyer contendo 180 mL de meio de cultivo, sendo utilizado o caldo YM. O inóculo foi incubado em frascos agitados a 30°C e 180 rpm, e a concentração celular foi acompanhada por contagem em câmara de Neubauer até atingir aproximadamente 1×10^8 células.mL⁻¹ (SANTOS et al., 2012).

2.7. Cultivos em frascos agitados

As leveduras selecionadas como potenciais produtoras de lipídios foram cultivadas em meio contendo glicerol bruto, acompanhando-se o crescimento celular ao longo dos cultivos. Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 500 mL com volume inicial de 200 mL, resultante da adição do meio de cultivo, suspensão de leveduras e água destilada estéril. O meio de cultivo foi preparado na forma concentrada a fim de resultar na seguinte composição (g.L⁻¹): 60,9 glicerol bruto; 7,0 KH₂PO₄; 2,0 Na₂HPO₄; 1,5 MgSO₄.7H₂O; 0,1 CaCl₂; 0,008 FeCl₃.6H₂O; 0,0001 ZnSO₄.7H₂O; 0,8 extrato de levedura; pH 5,5 (EVANS; RATLEDGE, 1983). Os frascos foram inoculados com suspensão de leveduras previamente preparada de forma a atingir 1×10^7 células.mL⁻¹, sendo mantidos em incubadora rotatória (Tecnal TE-424) a 30°C e 180 rpm .

2.8. Métodos analíticos

2.8.1. Biomassa

Alíquotas foram retiradas em intervalos de tempo pré-estabelecidos, centrifugadas a 1800 x g por 15min (Centribio 80-2B) e as células lavadas com água destilada, sendo novamente centrifugadas e ressuspensas. Posteriormente, as células foram suspensas em volume de água que resultasse na leitura de absorvância dentro da faixa de leitura do espectrofotômetro (0,2-0,8) utilizando-se comprimento de onda de

600 nm (Biospectro SP 220). Converteu-se o valor de absorvância em concentração (g.L^{-1}) através de uma curva padrão de biomassa previamente determinada para cada micro-organismo (Apêndice A), baseado no método descrito por Choi; Park (2003).

2.8.2. pH

A determinação do pH foi realizada no sobrenadante, através da leitura em medidor de pH segundo AOAC (2000).

2.8.3. Glicerol

A determinação de glicerol no sobrenadante foi realizada através do *kit* enzimático LOD $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ (R-Biopharm), de acordo com as recomendações do fabricante.

2.8.4. Lipídios

A concentração de lipídios foi determinada através do método de Bligh; Dyer (1959), adaptado por Manirakiza, Covaci; Schepens (2001), através da extração dos lipídios polares e não polares da biomassa utilizando uma mistura de metanol e clorofórmio. A biomassa seca foi primeiramente tratada com solução de HCl 2 mol.L^{-1} para rompimento da parede celular, posteriormente centrifugada a $1785 \times g$ e o sobrenadante descartado. A biomassa foi misturada com metanol, clorofórmio e água para a extração dos lipídios, seguidos de centrifugação a $1785 \times g$ por 10 min. Este procedimento foi repetido para a extração dos lipídios remanescentes na amostra. Com a mistura formaram-se três fases onde os lipídios encontravam-se na fase inferior, dissolvidos em clorofórmio, que foi evaporado, e os lipídios quantificados por gravimetria, em massa seca.

2.8.5. Perfil de ácidos graxos

Inicialmente, a fração lipídica foi esterificada para obtenção dos metil-ésteres dos ácidos graxos, utilizando trifluoreto de boro 1:10 como derivatizante, segundo

metodologia proposta por Metcalfe, Schimtz; Pelke (1966). Os metil ésteres de ácidos graxos foram identificados e quantificados por cromatografia gasosa (GC/FID). A análise cromatográfica foi realizada em um cromatógrafo gasoso Varian Star 3400, equipado com injetor *split/splitless*, coluna capilar ZBWAX de 30 m de comprimento e 0,32 mm de diâmetro interno, detector por ionização de chama (FID) e *workstation* com *software* STAR. O gás de arraste foi o hidrogênio em uma vazão de $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, e gás *make-up*, o nitrogênio a $30\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. As temperaturas do injetor e do detector foram ajustadas para 250 e 300°C, sendo o volume injetado de 1 μL . As condições cromatográficas de separação foram temperatura inicial da coluna 40°C, elevando-se para 100°C em uma taxa de $6^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, permanecendo nesta temperatura por 1 min. Na segunda rampa de temperatura a taxa de aumento foi de $6^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até 160°C, permanecendo por 5 min. Finalmente a temperatura foi elevada a 230°C, $6^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, mantendo-se por 10 min. Os ácidos graxos foram identificados por comparação com os padrões Sigma-Aldrich e quantificados por normalização da área.

2.9. Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata a fim de tratar os dados por análise de variância e teste de Tukey (MONTGOMERY, 2004), para verificar a existência de diferenças significativas entre os micro-organismos estudados, a 95% de confiança ($p \leq 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Isolamento e pré-seleção de leveduras oleaginosas

As amostras de solos, flores, raízes, cascas de árvores e folhas foram coletadas conforme descrito por PAN et al. (2009), após períodos de estiagem, para que os micro-organismos não fossem levados pelas chuvas, reduzindo as populações microbianas, uma vez que os mesmos se encontram na superfície de flores, raízes, cascas e folhas, sendo as amostras de solo coletadas na camada superior dos mesmos.

No presente estudo, 36 colônias com morfologia típica de levedura e capacidade de utilizar glicerol bruto como principal fonte de carbono foram isoladas e codificadas. As leveduras silvestres isoladas a partir das amostras ambientais foram codificadas

conforme procedência: S (solo); C (casca); R (raiz); FL (flor); e FS (folha). Foram isoladas 12 leveduras de solo, 12 de cascas, 8 de folhas, 2 de raízes e 2 de flores.

A Tabela 1 apresenta a análise qualitativa de leveduras através de coloração com Sudan Black B, mostrando somente as com resultado positivo, bem como a intensidade de coloração observada.

Tabela 1 - Análise qualitativa* de leveduras através de coloração com Sudan Black B.

Micro-organismo	Intensidade da cor
C1 I	**
C2 I	*
FS II	***
C4 II	*
S1 I	*
S1 II	***
S4 II	*
C1 II	*
FL II	*
S2 II	*

*As diferentes intensidades de coloração azulada das colônias foram indicadas de maneira qualitativa por: * fraca; ** média; *** forte.

Com uma quantidade limitante de nitrogênio no meio, o método de coloração de colônia com Sudan Black B apontou 10 das 36 leveduras isoladas como potenciais produtoras de lipídios, por apresentaram coloração azulada (Tabela 1). Essa técnica embora não permita uma visão precisa do conteúdo celular lipídico, por se tratar de uma análise qualitativa, é capaz de fornecer informações parciais sobre a capacidade de acúmulo de lipídios nas leveduras testadas, reduzindo, assim, o número de micro-organismos estudados.

A fim de selecionar a melhor linhagem, as 3 leveduras que apresentaram intensidade de cor mais intensa, entre média e forte, codificadas como FS II, C1I e S1II, foram pré-selecionadas pelo teste de coloração, sendo identificadas e cultivadas em meio contendo glicerol bruto como principal fonte de carbono para avaliar a produção de lipídios.

3.2. Identificação das leveduras FS II, C1 I e S1 II

Os iniciadores (*primers*) utilizados para a amplificação do fragmento de D1/D2 obtiveram um fragmento de 579bp para FS II, 569bp para S1 II e 570bp para C1 I. As sequências obtidas (AF189836.1), (DQ655689.1) e (DVU45842.1) foram comparadas com aquelas disponíveis no GenBank utilizando a ferramenta BLASTn, e os resultados mostraram alta similaridade de sequência D1/D2 (95,0%, 99,0% e 100,0%) com as leveduras *Cryptococcus humicola*, *Meyerozyma guilliermondii* e *Schwanniomyces variijiae*, respectivamente.

Devido à semelhança filogenética, a levedura FS II foi classificada como *Cryptococcus humicola*, a S1 II como *Meyerozyma guilliermondii*, e C1 I como *Schwanniomyces variijiae* (dados apresentados no Apêndice G).

Coda et al. (2013) avaliaram a atividade antifúngica de mais de 146 linhagens de leveduras e selecionaram a levedura *Meyerozyma guilliermondii* LCF1353 como a mais promissora, sendo que os compostos antifúngicos sintetizados por ela foram identificados e aplicados durante a fermentação de pães, comprovando sua eficiência antifúngica, prolongando a vida de prateleira e mantendo estrutura e sabor ideal dos pães. Pelliccia et al. (2011) também reportaram a atividade antifúngica da levedura *Meyerozyma guilliermondii* e demonstraram que elas permanecem na superfície das frutas como peras e maçãs mesmo após lavagem industrial, podendo ser utilizadas no combate aos fungos que se desenvolvem durante o armazenamento.

Lange et al. (1998) selecionaram a levedura *Debaryomyces vanrijiae* SBUG 770 (nome antigo da atual *Schwanniomyces variijiae*) dentre 60 analisadas, pela sua capacidade de biodegradação do bifenil, amplamente difundido no ambiente por ser utilizado na conservação de frutas cítricas e que pode causar, mediante exposição prolongada, lesões no fígado e sistema nervoso central e periférico. Uchida et al. (2007), também trabalhando com biorremediação, demonstraram que a levedura *Debaryomyces vanrijiae* MH201, isolada a partir de amostras de solo, se mostrou mais eficaz que os fungos filamentosos na remoção do formato, produto da oxidação dos formaldeídos presentes no meio ambiente, devido à produção da enzima formato oxidase.

A levedura *Cryptococcus humicola*, anteriormente conhecida como *Cryptococcus humicolus*, se encontra amplamente distribuída pelo meio ambiente, sendo isolada a partir de solos e plantas. Diversas linhagens apresentaram características

atrativas para a produção de compostos úteis ou enzimas com aplicação práticas (TAKAHASHI et al., 2011). A linhagem WU-2 se mostrou capaz de degradar o dimetilsulfóxido, um contaminante ambiental das fábricas que produzem visores de cristal líquido e semicondutores usados em eletrônica (MURAKAMI-NITTA, KIRIMURA; KINO, 2003). A linhagem Y-6 demonstrou ser tolerante à presença de alumínio e ácidos, uma propriedade importante para biorremediação de solos contaminados com ácido ou alumínio (KAWAI et al., 2000). Kulakovskaya, Golubev; Kulaev (2006) reportam a ação antifúngica dos glicolipídios produzidos por diversas linhagens da levedura *Cryptococcus humicola*.

Portanto, estas leveduras vêm sendo investigadas, principalmente em biorremediação, como produtoras de enzimas ou por sua atividade antifúngica. Foi encontrado apenas um relato de uma dessas leveduras como produtora de óleo microbiano. Sitepu et al. (2013), cultivando a levedura *Cryptococcus humicola* 10-1004, isolada na Indonésia, em meio contendo glicose como substrato, reportam valores de 2 g.L⁻¹ para biomassa, 26,31% para conteúdo lipídico e 0,53 g.L⁻¹ para lipídios totais em 72 h de cultivo.

3.3. Cultivo em frascos agitados

As Figuras 1, 2 e 3 apresentam o crescimento celular e a variação de pH ao longo do cultivo das leveduras *Cryptococcus humicola*, *Schwanniomyces variijiae* e *Meyerozyma guilliermondii*, respectivamente.

Figura 1 - Crescimento celular da levedura *Cryptococcus humicola* e evolução de pH ao longo do cultivo em meio contendo glicerol bruto.

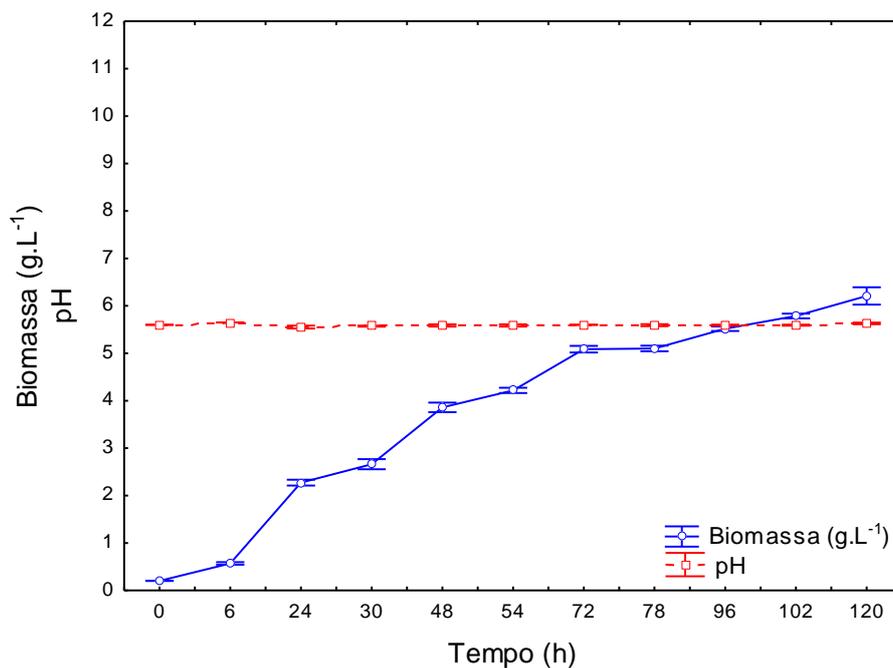


Figura 2 - Crescimento celular da levedura *Schwanniomyces variijae* e evolução do pH ao longo do cultivo em meio contendo glicerol bruto.

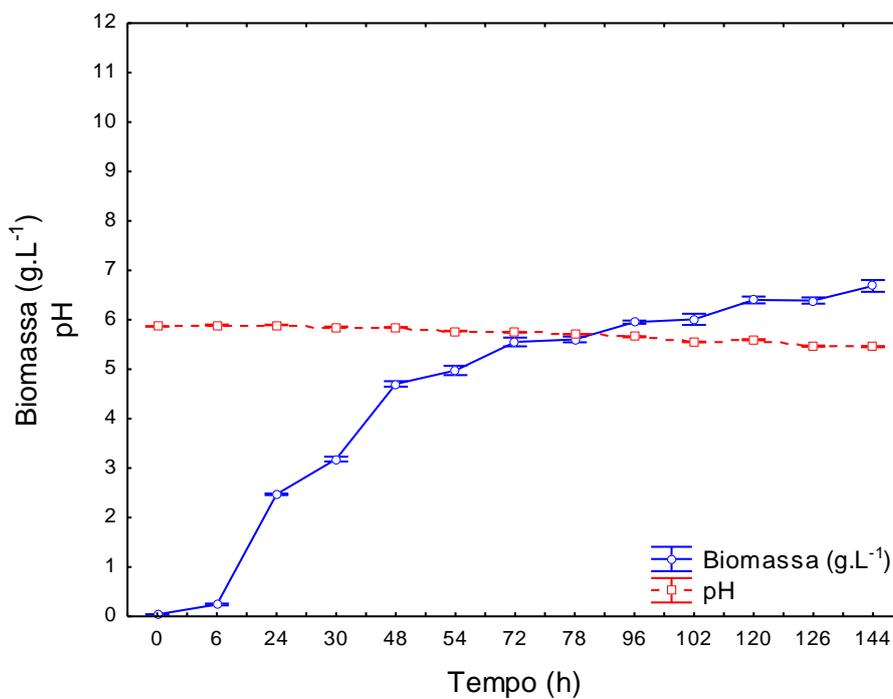
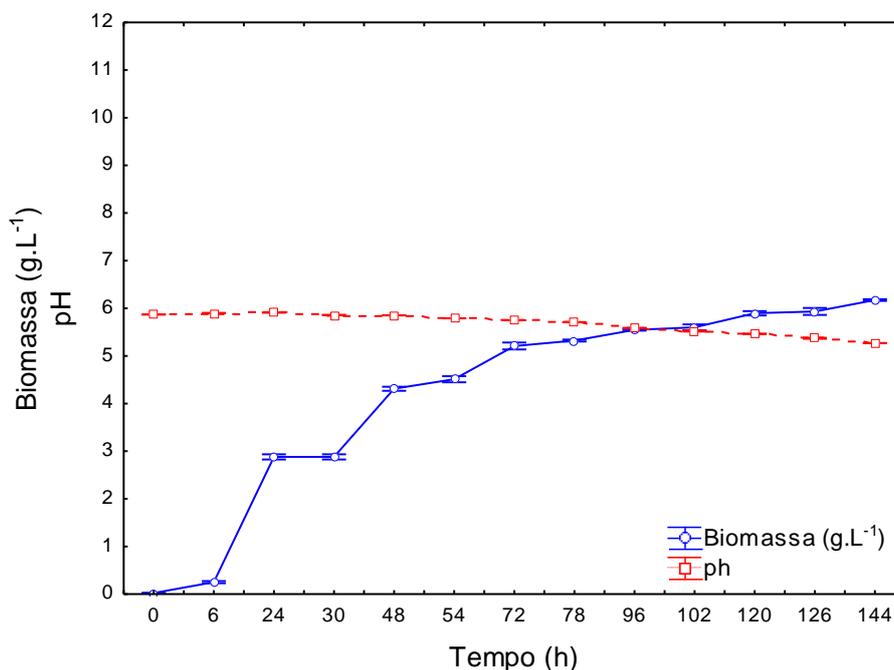


Figura 3 - Crescimento celular da levedura *Meyerozyma guilliermondii*, e evolução do pH ao longo do cultivo em meio contendo glicerol bruto.



Mediante análise das Figuras 1, 2 e 3, verifica-se que uso do glicerol bruto como principal fonte de carbono possibilitou o crescimento celular das leveduras ao longo dos cultivos, que variaram de 120 (*Cryptococcus humicola*) a 144 h (*Schwanniomyces variijiae* e *Meyerozyma guilliermondii*), atingindo o estado estacionário por volta de 96 (*Cryptococcus humicola*) e 120 h (*Schwanniomyces variijiae* e *Meyerozyma guilliermondii*). De acordo com Thompson; He (2006), as impurezas presentes no glicerol bruto, que é um coproduto da síntese de biodiesel, tais como fósforo, enxofre, magnésio, cálcio, nitrogênio, sódio e ácidos graxos livres, são elementos nutricionais que podem ser utilizados por micro-organismos durante o cultivo microbiano.

Conforme a Figura 1, o pH do meio de cultivo da levedura *Cryptococcus humicola* se manteve constante, em torno de 5,6, ao longo das 120 h de cultivo. Na Figura 2 verifica-se que o pH para a levedura *Schwanniomyces variijiae* variou de 5,86 no início do cultivo a 5,47 ao término. A maior variação de pH foi encontrada para a levedura *Meyerozyma guilliermondii* (Figura 3), cujo pH variou de 5,87 (início) a 5,27 (término). Observa-se nas Figuras 2 e 3 que o aumento da biomassa coincidiu com a diminuição do pH ao longo do cultivo, provavelmente ocasionado pela produção,

embora pequena devido à baixa redução do pH, de ácidos orgânicos tais como ácido cítrico, acético e pirúvico pelas levedura (PAPANIKOLAOU et al., 2008).

A Tabela 2 apresenta as médias \pm desvio padrão para velocidade específica máxima de crescimento celular, biomassa máxima, teor de lipídios, lipídios totais e fator de conversão de substrato em lipídios.

Tabela 2 - Médias \pm desvio padrão para velocidade específica máxima de crescimento celular, biomassa máxima, teor de lipídios, lipídios totais produzidos e fator de conversão de substrato em lipídios e análise estatística dos dados.*

Levedura	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)**	$X_{\text{máx}}$ (g.L ⁻¹)	Lip (%)	Lip _T (g.L ⁻¹)	Y _{L/S} (g.g ⁻¹)
<i>C. humicola</i> (120h)	0,09 ^c	6,21 \pm 0,18 ^b	29,97 \pm 0,20 ^a	1,86 \pm 0,06 ^a	0,34 \pm 0,02 ^a
<i>S. varijiae</i> (144h)	0,16 ^b	6,68 \pm 0,11 ^a	17,46 \pm 1,20 ^b	1,17 \pm 0,10 ^b	0,16 \pm 0,02 ^b
<i>M. guilliermondii</i> (144h)	0,18 ^a	6,17 \pm 0,01 ^b	17,94 \pm 1,08 ^b	1,11 \pm 0,06 ^b	0,12 \pm 0,01 ^c

$\mu_{\text{máx}}$: velocidade específica; $X_{\text{máx}}$: biomassa máxima; Lip: teor de lipídios em base seca; Lip_T: lipídios totais produzidos; Y_{L/S}: fator de conversão de substrato em lipídios. O tempo de cultivo variou de 120 h a 144 h (fase estacionária); *Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa (p < 0,05). ** para $\mu_{\text{máx}}$ desvio padrão menor que 10⁻².

Sabe-se que o acúmulo de lipídios em leveduras oleaginosas é maior quando cultivadas em meio com relação C/N elevada, visto que, em condições limitantes de nitrogênio, o carbono presente em excesso é canalizado para ser armazenado na forma de triacilgliceróis no interior das células (SAENGE et al., 2011). Desta forma, um elevado teor de carbono, relação C/N em torno de 100 g.g⁻¹, é um requisito básico para o acúmulo de lipídios (ANGEBAUER et al., 2008). Neste estudo, visando induzir o acúmulo de lipídios no interior das células, utilizou-se uma relação C/N de 162 g.g⁻¹.

Os resultados encontrados para biomassa máxima, cerca de 6 g.L⁻¹ (Tabela 2), estão de acordo com os esperados para cultivos em frascos agitados, geralmente em torno de 5 a 10 g.L⁻¹, segundo Ageitos et al. (2011). A levedura *Schwanniomyces varijiae* apresentou a maior biomassa máxima dentre as analisadas, chegando a 6,68 g.L⁻¹, enquanto *Meyerozyma guilliermondii* atingiu uma velocidade específica máxima de crescimento celular de 0,18 h⁻¹. A levedura *Cryptococcus humicola* se destacou no acúmulo de lipídios com um conteúdo de 29,97%, assim como nos lipídios totais produzidos, com 1,86 g.L⁻¹, resultados significativamente superiores aos encontrados para *Schwanniomyces varijiae* e *Meyerozyma guilliermondii*, que apresentaram um teor de lipídios de 17,46% e 17,94% respectivamente, e lipídios totais produzidos de 1,16 g.L⁻¹ e 1,10 g.L⁻¹ respectivamente.

Estudos de isolamento e seleção de micro-organismos, presentes nos mais diversos ecossistemas, com potencial para produção de lipídios, vêm sendo realizados. Dai et al. (2007) isolaram leveduras a partir de amostras de flores coletadas na China e, utilizando Sudan Black B, selecionaram 8 que apresentaram potencial para produzir lipídios em meio contendo xilose como substrato. Uma linhagem, T216, com 36,6% de lipídios em sua biomassa, se destacou das demais, sendo identificada como *Rhodotorula glutinis*.

Kitcha; Cheirsilp (2011) utilizaram o glicerol proveniente da síntese do biodiesel como substrato na seleção de leveduras silvestres isoladas a partir de amostras de solos da Tailândia e através do teste de coloração com Sudan Black B identificaram 23 linhagens como potenciais produtoras de lipídios. As leveduras identificadas como *Kodamaea ohmeri* e *Trichosporonoides spathulata* foram capazes de crescer e acumular lipídios em meio contendo glicerol bruto suplementado com sulfato de amônio, destacando-se das demais na produção de lipídios.

Schulze et al. (2014) isolaram 4 leveduras a partir de amostras de solo da Floresta Negra, situada na Alemanha, e selecionaram 3 como potenciais produtoras de lipídios através da técnica de coloração com Sudan Black B. Os autores reportam que as leveduras isoladas e identificadas como *Cryptococcus podzolicus*, *Trichosporon porosum* e *Pichia segobiensis* acumularam 31,8%; 34,1% e 24,6% de lipídios, respectivamente, quando cultivadas em meio contendo glicose como substrato. Segundo os mesmos, apesar das leveduras dos gêneros *Cryptococcus sp.* e *Trichosporon sp.* serem em geral conhecidas como oleaginosas, *Cryptococcus podzolicus* e *Trichosporon porosum* não haviam sido anteriormente mencionadas como produtoras de óleo microbiano.

A Tabela 3 apresenta a composição de ácidos graxos da fração lipídica que foi extraída da biomassa das leveduras silvestres *Cryptococcus humicola*, *Schwanniomyces variijiae* e *Meyerozyma guilliermondii* (Apêndices C e D).

Tabela 3 - Perfil de ácidos graxos das leveduras *Cryptococcus humicola*, *Schwanniomyces variijiae* e *Meyerozyma guilliermondii* ao término dos cultivos.

Teor relativo de ácidos graxos totais (%) ^a			
Ácido graxo	Micro-organismo		
	<i>C. humicola</i>	<i>S. variijiae</i>	<i>M. guilliermondii</i>
C16:0	21,2	21,4	19,0
C16:1	-	3,2	4,2
C 18:1 n-9	12,6	9,8	9,3
C18:2 n-6	52,3	45,1	56,1
C 18:3 n-6	-	13,6	-
C 20:0	2,3	-	0,6
C 20:1 n-9	2,2	-	-
C 20:2	1,0	-	0,5
C 22:6 n-3	1,6	-	1,2

^a Alguns ácidos graxos foram detectados em quantidades traço e não foram incluídos na tabela.

De acordo com Knothe et al. (2009), os óleos que apresentam composição adequada de ácidos graxos para a produção do biodiesel contêm, principalmente, ácido palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) e linolênico (C18:3). Os lipídios microbianos apresentam composição de ácidos graxos muito semelhante a dos óleos vegetais utilizados na síntese do biodiesel como óleo de canola, óleo de girassol, óleo de palma e óleo de soja, em que 84%, 13%, 1% e 2% da produção total, respectivamente, é utilizada na produção de biodiesel (SAENGE et al., 2011; ATABANI et al., 2012). As leveduras se destacam dos demais micro-organismos por sua capacidade de utilizar substratos alternativos como coprodutos e resíduos agrícolas e industriais. Esta característica viabiliza a produção de lipídios a baixos custos (CHEIRSILP; LOUHASAKUL, 2013).

Analisando a Tabela 3 constata-se que os principais ácidos graxos encontrados para as leveduras silvestres foram os ácidos graxos de cadeia longa com 16 a 18 átomos de carbono. Para a levedura *Cryptococcus humicola*, a proporção de ácidos graxos saturados foi de 23,5%, ácidos monoinsaturados 14,8% e poli-insaturados 54,9%. Na levedura *Schwanniomyces variijiae* os ácidos graxos saturados chegaram a 21,4%,

monoinsaturados a 13%, e poli-insaturados a 58,7%. A levedura *Meyerozyma guilliermondii* apresentou uma proporção de 19,6% de ácidos saturados, 13,5% de monoinsaturados e 57,8% de poli-insaturados. Os perfis de ácidos graxos encontrados diferiram dos reportados por outros autores (LIANG et al., 2010; YU et al., 2011; CHEIRSILP; LOUHASAKUL, 2013) por apresentarem maior ocorrência de ácidos graxos poli-insaturados (acima de 50%) para as três leveduras analisadas, com destaque para o ácido linoleico (C18:2 n-6), que chegou a 56,1% na levedura *Meyerozyma guilliermondii*. Na levedura *Schwanniomyces variijiae*, 45,1% dos ácidos graxos encontrados corresponderam ao ácido linoleico, sendo encontrada também uma quantidade apreciável (13,6%) do ácido γ -linolênico (C18:3 n-6), que é considerado nutricionalmente como um ácido graxo essencial ω 6.

Schulze et al. (2014), cultivando *Trichosporon porosum* em meio contendo xilose como substrato, reportam um perfil de ácidos graxos com predomínio dos ácidos palmítico (21,1%), oleico (39,9) e linoleico (18,7%). Papanikolaou et al. (2008) obtiveram resultados semelhantes cultivando a levedura *Yarrowia lipolytica* ACA-DC 50109 em meio contendo glicerol bruto como substrato (164,0 g.L⁻¹), relatando um perfil de ácidos graxos com uma proporção de 16,9% de ácido palmítico, 42,9% de ácido oleico e 19,4% de ácido linoleico. Entretanto, segundo Beopoulos et al. (2009), a levedura oleaginosa *Yarrowia lipolytica* é conhecida por ser capaz de acumular uma porcentagem elevada de ácido linoleico (mais de 50% dos ácidos graxos presentes). Por outro lado, geralmente, leveduras produzem principalmente ácidos saturados e monoinsaturados enquanto microalgas e fungos filamentosos produzem quantidades significativas de ácidos graxos poli-insaturados, usualmente extraídos de óleos de peixes (LI, DU; LIU, 2008).

Diante das diferenças nas condições de cultivo empregadas bem como na linhagem das leveduras utilizadas, a comparação entre resultados se torna um tanto complicada. É importante destacar que as fontes de carbono, nitrogênio, os íons metálicos, a temperatura e o pH utilizados no cultivo são fatores que podem afetar o perfil dos ácidos graxos (DYAL; NARINE, 2005). Segundo Leiva-Candia et al. (2014), a combinação de ambos, substrato e micro-organismo, tem efeito importante sobre a composição dos ácidos graxos dos lipídios microbianos. Para Fakas et al. (2009), a diferença na composição pode ocorrer de acordo com a idade da célula, substrato utilizado e condições de cultivo empregadas.

Houve ainda a ocorrência, embora em pequenas quantidades, do ácido docosaenoico (C22:6 n-3), um ácido graxo essencial ω 3 de cadeia longa, e dos ácidos eicosenoico ω 9 (C20:1 n-9) e eicosadienoico (C20:2) (Tabela 3). De acordo com Subramaniam et al. (2010), quando cultivadas em condições devidamente otimizadas, as leveduras são capazes de produzir ácidos graxos com elevado teor nutracêutico, que podem ser extraídos e comercializados. As leveduras são reconhecidas mundialmente como excelentes fontes de proteínas, vitaminas do complexo B, minerais essenciais e fibras dietéticas. A levedura inativada, pela ação do calor, é usada como fonte de nutrientes em alimentação animal e humana, tanto na forma de levedura íntegra ou de derivados de levedura. Entretanto, somente as leveduras certificadas como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) podem ser usadas na alimentação humana e animal, sob diversas formas e para diversas finalidades (VILELA, SGARBIERI; ALVIM, 2000).

4. CONCLUSÃO

As leveduras isoladas a partir da biodiversidade presente em amostras ambientais se mostraram capazes de crescer e acumular elevados conteúdos lipídicos quando cultivadas em meio contendo glicerol proveniente da síntese de biodiesel como principal fonte de carbono. A levedura identificada como *Cryptococcus humicola* se destacou das demais, sendo a mais promissora na produção de lipídios. As três leveduras apresentaram um perfil de ácidos graxos diferenciado, semelhante ao dos principais óleos vegetais utilizados na síntese do biodiesel, além de apresentar uma quantidade apreciável de ácidos graxos essenciais. Os resultados deste estudo apontam para o potencial dessas leveduras na produção de lipídios microbianos e ácidos graxos de interesse a partir de um coproduto gerado na síntese do biodiesel.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGEITOS, J. M.; VALLEJO, J. A.; VEIGA-CRESPO, P.; VILLA, T. G. Oily yeasts as oleaginous cell factories. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, p. 1219-1227, 2011.

AMI, D.; POSTERI, R.; MEREGHETTI, P.; PORRO, D.; DOGLIA, S. M.; BRANDUARDI, P. Fourier transform infrared spectroscopy as a method to study lipid accumulation in oleaginous yeasts. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, p. 1-14, 2014.

ANGERBAUER, C.; SIEBENHOFER, M.; MITTELBACH, M.; GUEBITZ, G.M. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3051–3056, 2008.

AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 17 th edition. Washington, D.C., CD-ROM, 2000.

ATABANI, A.; SILITONGA, A.; BADRUDDIN, I.; MAHLIA, T.; MASJUKI, H.; MEKHILEF, S. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**. v. 16, p. 2070–2093, 2012.

BEOPOULOS, A.; CESCUT, J.; HADDOUCHE, R.; URIBELARREA, J.; MOLINA-JOUVE, C.; NICAUD, J. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. **Progress in Lipid Research**, v. 91, p. 692–696, 2009.

BLIGH, E. G.; DYER, J. W. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911–917, 1959.

CHATZIFRAGKOU, A.; MAKRI, A.; BELKA, A.; BELLOU, S.; MAVROU, M.; MASTORIDOU, M. Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. **Energy**, v. 36, p. 1097–108, 2011.

CHEIRSILP, B.; LOUHASAKUL, Y. Industrial wastes as a promising renewable source for production of microbial lipid and direct transesterification of the lipid into biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 329–337, 2013.

CHOI, M. H.; PARK, Y. H. Production of yeast biomass using waste Chinese cabbage. **Biomass and Bioenergy**, v. 25, p. 221–226, 2003.

CODA, R.; RIZZELLO, C. G.; CAGNO, R.; TRANI, A.; CARDINALI, G.; GOBBETTI, M. Antifungal activity of *Meyerozyma guilliermondii*: identification of active compounds synthesized during dough fermentation and their effect on long-term storage of wheat bread. **Food Microbiology**, v. 33, p. 243–251, 2013.

DAI, C. C.; TAO, J.; XIE, F.; DAI, Y. J.; ZHAO, M. Biodiesel generation from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 2130–2134, 2007.

DYAL, S. D.; NARINE, S. S. Implications for the use of *Mortierella* fungi in the industrial production of essential fatty acids. **Food Research International**, v. 38, p. 445–467, 2005.

EASTERLING, E. R.; FRENCH, W. T.; HERNANDEZ, R.; LICHA, M. The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 356–361, 2009.

EVANS, C. T.; RATLEDGE, C. Biochemical activities during lipid accumulation in *Candida curvata*. **Lipids**, v. 18, n. 9, p. 630–635, 1983.

- EVANS, C. T.; RATLEDGE, C.; GILBERT, S. C. A rapid screening method for lipid-accumulating yeast using a replica-printing technique. **Journal of Microbiological Methods**, v. 4, p. 203-210, 1985.
- FAKAS, S.; PAPANIKOLAOU, S.; BASTOS, A.; GALIOTOUPANAYOTOU, M.; MALLOUCHOS, A.; AGGELIS, G. Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, p. 573–580, 2009.
- FREITAS, C.; PARREIRA, T. M.; ROSEIRO, J.; REIS, A.; SILVA, T. L. Selecting low-cost carbon sources for carotenoid and lipid production by the pink yeast *Rhodospidium toruloides* NCYC 921 using flow cytometry. **Bioresource Technology**, v. 158, p. 355-359, 2014.
- GEN, Q.; WANG, Q.; CHI, Z. Direct conversion of cassava starch into single cell oil by co-cultures of the oleaginous yeast *Rhodospidium toruloides* and immobilized amylases-producing yeast *Saccharomycopsis fibuligera*. **Renewable Energy**, v. 62, p. 522-526, 2014.
- HERNALSTEENS, S.; MAUGERI, F. Synthesis of fructooligosaccharides using extracellular enzymes from *Rhodotorula* sp. **Journal of Food Biochemistry**, v. 34, p. 520-534, 2010.
- KAWAI, F.; ZHANG, D.; SUGIMOTO, M. Isolation and characterization of acid- and Al-tolerant microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v.189, p.143–147, 2000.
- KITCHA, S.; CHEIRSILP, B.; Screening of oleaginous yeasts and optimization for lipid production using crude glycerol as a carbon source. **Energy Procedia**, v. 9, p. 274–282, 2011.
- KNOTHE, G. Improving biodiesel fuel properties by modifying fatty ester composition. **Energy & Environmental Science**, v. 2, p. 759–766, 2009.
- KULAKOVSKAYA, E. V.; GOLUBEV, V. I.; KULAEV, S. Extracellular antifungal glycolipids of *Cryptococcus humicola* yeasts. **Doklady Biological Sciences**, v. 410, p. 393–395, 2006.
- LACHANCE, M. A.; BOWLES, J. M.; STARMER, W. T.; BARKER, J. S. F. *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new yeast species from Australian *Hibiscus* flowers. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 172-177, 1999.
- LANGE, J.; HAMMER, E.; SPECHT, M.; FRANCKE, W.; SCHAUER, F. Biodegradation of biphenyl by the ascomycetous yeast *Debaryomyces vanrijae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, p. 364-368, 1998.
- LEIVA-CANDIA, D. E.; PINZI, S.; REDEL-MACÍAS, M. D.; KOUTINAS, A.; WEBB, C.; DORADO, M. P. The potential for agro-industrial waste utilization using oleaginous yeast for the production of biodiesel. **Fuel**, v. 123, p. 33-42, 2014.
- LI, Q.; DU, W.; LIU, D. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, p. 749–756, 2008.

LIANG, Y.; CUI, Y.; TRUSHENSKI, J.; BLACKBURN, J. W. Converting crude glycerol derived from yellow grease to lipids through. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7581-7586, 2010.

LIANG, M. H.; JIANG, J. G. Advancing oleaginous microorganisms to produce lipid via metabolic engineering technology. **Progress in Lipid Research**, v. 52, p. 395–408, 2013.

MAKRI, A.; FAKAS, S.; AGGELIS, G. Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeated batch cultures. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2351–2358, 2010.

MANIRAKIZA, P.; COVACI, A.; SCHEPENS, P. Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and modified Bligh & Dyer extraction methods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, p. 93-100, 2001.

MAUGERI, F.; HERNALSTEENS, S. Screening of yeast strains for transfructosylating activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 49, p. 43-49, 2007.

METCALFE, L. D.; SCHIMTZ, A. A.; PELKE, J. R. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 38, p. 514-515, 1966.

MURAKAMI-NITTA, T.; KIRIMURA, K.; KINO, K. Oxidative degradation of dimethyl sulfoxide by *Cryptococcus humicolus* WU-2, a newly isolated yeast. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 95, p. 109–111, 2003.

PAN, L. X.; YANG, D. F.; SHAO, L.; LI, W.; CHEN, G. G.; LIANG, Z. Q. Isolation of the oleaginous yeasts from the soil and studies of their lipid-producing capacities. **Food Technology and Biotechnology**, v. 47, n. 2, p. 215–220, 2009.

PAPANIKOLAOU, S.; FAKAS, S.; FICK, M.; CHEVALOT, I.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; KOMAITIS, M.; MARC, I.; AGGELIS, G. 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 and Bioenergy**, v. 32, p. 60–71, 2008.

PAPANIKOLAOU, S. Oleaginous yeasts: biochemical events related with lipid synthesis and potential biotechnological applications. **Fermentation Technology**, v. 1, p. 1–3, 2012.

PELLICCIA, C.; ANTONIELLI, L.; CORTE, L.; BAGNETTI, A.; FATICHENTI, F.; CARDINALI, G. Preliminary prospection of the yeast biodiversity on apple and pear surfaces from Northern Italy orchards. **Annals of Microbiology**, v. 61, p. 965–972, 2011.

SANTOS, E. O.; MICHELON, M.; FURLONG, E. B.; BURKERT, J. F. M; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V. Evaluation of the composition of culture medium for yeast biomass production using raw glycerol from biodiesel synthesis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 432-440, 2012.

SAENGE, C.; CHEIRSILPB, B.; SUKSAROGEA, T. T.; BOURTOOMC, T. Efficient concomitant production of lipids and carotenoids by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultured in palm oil mill effluent and application of lipids for biodiesel production. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 16, p. 23-33, 2011.

SCHNEIDER, T.; GRAEFF-HÖNNINGER, S.; FRENCH, W. T.; HERNANDEZ, R.; MERKT, N.; CLAUPEIN, W.; HETRICK, M.; PHAM, P. Lipid and carotenoid production by the oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultivated on brewery effluents. **Energy**, v. 61, p. 34-43, 2013.

SCHULZE, I.; HANSEN, S.; GROBHANS, S.; RUDSZUCK, T.; OCHSENREITHER, K.; SYLDATK, C.; NEUMANN, A. Characterization of newly isolated oleaginous yeasts - *Cryptococcus podzolicus*, *Trichosporon porosum* and *Pichia segobiensis*. **AMB Express**, v. 4, p. 1-11, 2014.

SILVA, T. L.; GOUVEIA, L.; REIS, A. Integrated microbial processes for biofuels and high added value products: the way to improve the cost effectiveness of biofuel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 21, p. 1043-1053, 2013.

SITEPU, I. R.; SESTRIC, R.; IGNATIA, L.; LEVIN, D.; GERMAN, J. B.; GILLIES, L. A.; ALMADA, L. A. G.; BOUNDY-MILLS, K. L. Manipulation of culture conditions alters lipid content and fatty acid profiles of a wide variety of known and new oleaginous yeast species. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 360-369, 2013.

SUBRAMANIAM, R.; DUFRECHE, S.; ZAPPI, M.; BAJPAI, R. Microbial lipids from renewable resources: production and characterization. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 1271-1287, 2010.

TACCARI, M.; CANONICO, L.; COMITINI, F.; MANNAZZU, I.; CIANI, M. Screening of yeasts for growth on crude glycerol and optimization of biomass production. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 488-495, 2012.

TAKAHASHI, S.; NAKAJIMA, Y.; IMAIZUMI, T.; FURUTA, Y.; OHSHIRO, Y.; ABE, K.; YAMADA, R.; KERA, Y. Development of an autonomously replicating linear vector of the yeast *Cryptococcus humicola* by using telomere-like sequence repeats. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, p. 1213-1221, 2011.

TALEBIAN-KIAKALAEH, A.; AMIN, N. A. S.; MAZAHERI, H. A review on novel processes of biodiesel production from waste cooking oil. **Applied Energy**, v. 104, p. 683-710, 2013.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

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

THIRU, M.; SANKH, S.; RANGASWAMY, V. Process for biodiesel production from *Cryptococcus curvatus*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 22, p. 10436-10440, 2011.

UCHIDA, H.; HOJYO, M.; FUJII, Y.; MAEDA, Y.; KAJIMURA, R.; YAMANAKA, H.; SAKURAI, A.; SAKAKIBARA, M.; AISAKA, K. Purification, characterization, and potential applications of formate oxidase from *Debaryomyces vanriijiae* MH201. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 74, p. 805–812, 2007.

VILELA, E. S. D.; SGARBIERI, V. C.; ALVIM, I. D. Determinação do valor protéico de células íntegras, autolisado total e extrato de levedura (*Saccharomyces sp.*). **Revista Nutrição**, v. 13, n. 3, p. 185- 192, 2000.

YAN, Y.; LI, X.; WANG, G.; GUI, X.; LI, G.; SU, F.; WANG, X.; LIU, T. Biotechnological preparation of biodiesel and its high-valued derivatives: a review. **Applied Energy**, v. 113, p. 1614–1631, 2014.

YEN, H. W.; YANG, Y. C. The effects of irradiation and microfiltration on the cells growing and total lipids production in the cultivation of *Rhodotorula glutinis*. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 539–541, 2012.

YU, X.; ZHENG, Y.; DORGAN, K. M.; CHEN, S. Oil production by oleaginous yeasts using the hydrolysate from pretreatment of wheat straw with dilute sulfuric acid. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6134–6140, 2011.

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS POR UMA NOVA LINHAGEM
DE *Cryptococcus humicola* A PARTIR DE GLICEROL BRUTO GERADO NA
SÍNTESE DO BIODIESEL**

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS POR UMA NOVA LINHAGEM DE *Cryptococcus humicola* A PARTIR DE GLICEROL BRUTO GERADO NA SÍNTESE DO BIODIESEL

RESUMO

A expectativa de diminuição das reservas de petróleo aliada à crescente preocupação com a poluição do meio ambiente vem incentivando iniciativas que visam à substituição dos combustíveis fósseis. Nas duas últimas décadas, tem aumentado o interesse no biodiesel como um biocombustível alternativo. Durante a síntese do biodiesel, o glicerol bruto é gerado como coproduto e vem se tornando um potencial poluente ambiental. A conversão do glicerol bruto por via biotecnológica constitui uma das mais promissoras alternativas para seu aproveitamento, podendo ser utilizado como fonte de carbono em cultivos microbianos. Os cultivos microbianos envolvem múltiplas variáveis. O planejamento Plackett-Burman é uma boa opção para uma triagem inicial, uma vez que permite determinar a influência de vários fatores com um número reduzido de variáveis. A otimização mediante o uso de um delineamento composto central rotacional (DCCR) e das superfícies de resposta é prática comum em biotecnologia, utilizada principalmente para a otimização das condições de cultivo. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos dos constituintes do meio e das condições de cultivo no acúmulo de lipídios pela levedura silvestre *Cryptococcus humicola*, bem como otimizar a produção de lipídios a partir de glicerol bruto gerado na síntese do biodiesel. A fim de selecionar as variáveis que exercem maiores efeitos na produção de lipídios foi realizado um planejamento Plackett-Burman onde foram avaliadas 10 variáveis. De acordo com os resultados, os maiores efeitos positivos foram encontrados para extrato de levedura e glicerol, sendo que as demais variáveis não apresentaram efeito significativo, o que permitiu excluir a adição de sais de cálcio, magnésio, zinco e ferro. Com as 2 variáveis selecionadas, foi proposto um DCCR, visando à maximização da produção de lipídios. Os modelos matemáticos e as curvas de contorno geradas permitiram estabelecer as condições ótimas para produção de lipídios, sendo estas: 100,0 g.L⁻¹ glicerol; 5,0 g.L⁻¹ KH₂PO₄; 1,0 g.L⁻¹ Na₂HPO₄; 4,8 g.L⁻¹ extrato de levedura; pH inicial 4,5; temperatura 25°C. Nestas condições obteve-se uma biomassa de 23,53 ± 0,16 (g.L⁻¹), teor de lipídios de 37,61 ± 2,39 (%) e 8,85 ± 0,61 (g.L⁻¹) de lipídios totais produzidos, o que representou um incremento de cerca de 4,8 vezes nos lipídios totais produzidos em relação às condições testadas inicialmente, cumprindo com os propósitos de bioconversão do glicerol bruto e produção de lipídios microbianos em condições otimizadas.

Palavras-chave: Plackett-Burmann, otimização de processos, levedura silvestre, lipídios microbianos.

1. INTRODUÇÃO

A expectativa de diminuição das reservas de petróleo com a possibilidade de escassez do mesmo, aliada à crescente preocupação com as mudanças climáticas decorrentes do aquecimento global devido às emissões de gás carbônico, tem incentivado iniciativas visando à substituição dos combustíveis fósseis (RYU et al., 2013). A produção de biodiesel tem sido incentivada por se tratar de um combustível renovável, biodegradável e não tóxico, obtido pela transesterificação de um óleo extraído via catálise ácida ou básica na presença de um álcool (MENEZES et al., 2013). Nesta reação, são formados ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos (biodiesel) e glicerol bruto (BEATRIZ, ARAUJO; LIMA, 2011). A produção de biodiesel gera em torno de 10% (m/m) de glicerol bruto como coproduto principal (YANG, HANNA; SUN, 2012).

Na literatura são descritos vários processos de transformação de triacilgliceróis em biocombustíveis, entretanto muitos são inviáveis economicamente devido ao alto custo da matéria-prima utilizada (GEN, WANG; CHI, 2014), sendo produzido basicamente a partir de óleos vegetais virgens como os de soja, canola e palma (POLI et al., 2014). Levando em consideração a enorme quantidade de glicerol bruto gerado no processo e seu baixo custo, torna-se urgente encontrar formas alternativas para converter este coproduto em produtos com valor agregado a fim de produzir biodiesel de forma sustentável (MAKRI, FAKAS; AGGELIS, 2010).

Sob certas condições, alguns micro-organismos são capazes de transformar carboidratos, hidrocarbonetos e lipídios em lipídios intracelulares. Os micro-organismos oleaginosos incluem bactérias, leveduras, fungos filamentosos e microalgas (VICENTE et al., 2009; LI et al., 2012). Constituem uma alternativa promissora, especialmente em termos de sua produtividade, sendo que algumas espécies de micro-organismos oleaginosos são capazes de acumular de 20 a 70% de lipídios no interior de sua célula (SAWANGKEAW; NGAMPRASERTSITH, 2013). As leveduras se destacam dentre os micro-organismos oleaginosos por crescerem mais rapidamente, serem mais robustas e fáceis de cultivar em grande escala (PAPANIKOLAOU, 2011; CHEIRSILP; LOUHASAKUL, 2013).

Os biolipídios produzidos por leveduras oleaginosas são considerados uma das mais importantes matérias-primas para produção de biodiesel (MENG et al., 2009), sendo que a qualidade do biodiesel obtido depende principalmente da composição dos

ácidos graxos desses lipídios (TANIMURA et al., 2014). Os óleos microbianos apresentam composição química e energia específica semelhantes aos dos óleos vegetais e gorduras utilizados da síntese do biodiesel. Além disso, os resíduos e coprodutos gerados na indústria e agricultura podem ser utilizados, com sucesso, como substrato no cultivo de micro-organismos oleaginosos (LEIVA-CANDIA et al., 2014).

Tem sido relatado que as condições de cultivo, como relação C/N, fontes de nitrogênio, temperatura, pH, oxigênio e sais inorgânicos são capazes de influenciar no acúmulo de óleo pelos micro-organismos (AGEITOS et al., 2011). Ainda, segundo Fakas et al. (2009), a diferença no acúmulo e composição lipídica pode ocorrer de acordo com a idade da célula, substrato utilizado e condições de cultivo empregadas.

Devido à grande biodiversidade brasileira, espécies de micro-organismos não são conhecidas em sua totalidade. Atualmente, há um grande interesse em micro-organismos não catalogados que sejam produtores de insumos interessantes à indústria (HERNALSTEENS; MAUGERI, 2010). A levedura *Cryptococcus humicola* vem sendo investigada, principalmente em biorremediação, como produtora de enzimas ou por sua atividade antifúngica (MURAKAMI-NITTA, KIRIMURA; KINO, 2003; KULAKOVSKAYA, GOLUBEV; KULAEV, 2006). É importante salientar que menos de 30 das 600 espécies de micro-organismos investigadas em estudos foram consideradas oleaginosas (MENG et al., 2009). Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos dos constituintes do meio e das condições de cultivo no acúmulo de lipídios pela levedura silvestre *Cryptococcus humicola*, bem como otimizar a produção de lipídios a partir de glicerol bruto gerado na síntese do biodiesel.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Micro-organismo

A levedura silvestre *Cryptococcus humicola*, isolada a partir de amostras ambientais do Sul do Brasil, foi utilizada nos cultivos. Para a manutenção, as colônias foram transferidas para tubos de ensaio com meio ágar inclinado YM (*Yeast Malt*) composto por (g.L⁻¹): 3 extrato de malte, 3 extrato de levedura, 5 peptona, 10 glicose, 20 ágar. Estes foram incubados em estufa bacteriológica a 25°C até crescimento satisfatório. A levedura foi mantida nos tubos, sob refrigeração (4°C), imersa em óleo mineral.

2.2. Glicerol bruto

Utilizou-se glicerol bruto proveniente da obtenção de biodiesel a partir do óleo degomado de soja por via metanólica, fornecido pela empresa BS Bios Indústria e Comércio de Biodiesel Sul Brasil S/A, localizada em Passo Fundo-RS. O glicerol bruto continha (%): 6,51 cinzas; 6,18 cloreto de sódio; 9,78 umidade; 1,22 matéria orgânica não glicerídica; 82,49 glicerol e pH 4,91.

2.3. Preparo do inóculo

A levedura armazenada foi reativada em ágar inclinado YM até desenvolvimento das colônias. Posteriormente dois tubos da cultura microbiana reativada foram raspados com 10 mL de água peptonada 0,1%, cada, para remoção das células do micro-organismo, transferindo-se para frascos Erlenmeyer contendo 180 mL de meio de cultivo, sendo utilizado o caldo YM. O inóculo foi incubado em frascos agitados a 30°C e 180 rpm, e a concentração celular foi acompanhada por contagem em câmara de Neubauer (SANTOS et al., 2012).

2.4. Planejamento experimental Plackett-Burman

A fim de selecionar as variáveis que exercem maiores efeitos na produção de lipídios utilizando glicerol bruto gerado na síntese de biodiesel como substrato, foi realizado um delineamento Plackett-Burman (RODRIGUES; IEMMA, 2009). A matriz do planejamento com os valores reais e codificados das variáveis independentes estudadas está apresentada na Tabela 1. Os pontos centrais do planejamento experimental corresponderam à composição de meio e condições de cultivo propostas por Evans; Ratledge (1983).

Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 500 mL com volume inicial de 200 mL, resultante da adição do meio de cultivo, suspensão de leveduras (inóculo) e água destilada estéril, cuja composição foi definida de acordo com o planejamento experimental (Tabela 1). Os frascos foram inoculados com o volume de inóculo necessário, calculado a partir de contagem realizada em câmara de Neubauer, para que se atingisse uma concentração inicial de 10^7 células.mL⁻¹, sendo mantidos em

agitador orbital (Tecnal TE-424) na temperatura determinada pelo planejamento experimental (Tabelas 1) e com agitação de 180 rpm, com retiradas de alíquotas em intervalos de tempo pré-definidos. Os cultivos foram conduzidos até a fase estacionária, quando não foi observada variação expressiva na concentração de biomassa.

Estimaram-se os efeitos principais de cada variável nas respostas avaliadas. As variáveis dependentes avaliadas foram biomassa máxima (g.L^{-1}), produtividade em biomassa ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), teor de lipídios em base seca (%), lipídios totais produzidos (g.L^{-1}) e produtividade em lipídios ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Os dados foram tratados a 90% de confiança através do *software* Statistica 5.0 (StatSoft Inc., EUA).

Tabela 1 - Matriz do planejamento Plackett-Burman com valores reais e codificados.

Ensaio	KH ₂ PO ₄ (g.L ⁻¹)	MgSO ₄ (g.L ⁻¹)	Na ₂ HPO ₄ (g.L ⁻¹)	EL (g.L ⁻¹)	CaCl ₂ .2H ₂ O (g.L ⁻¹)	Glicerol* (g.L ⁻¹)	pH inicial	Temperatura (°C)	ZnSO ₄ .7H ₂ O (g.L ⁻¹)	FeCl ₃ .6H ₂ O (g.L ⁻¹)
1	+1 (9,0)	-1 (0)	-1 (1,0)	-1 (0,4)	+1 (0,134)	-1 (30,0)	-1 (4,5)	+1 (35)	+1 (0,0002)	-1 (0)
2	+1 (9,0)	+1 (3,0)	-1 (1,0)	-1 (0,4)	-1 (0)	+1 (70,0)	-1 (4,5)	-1 (25)	+1 (0,0002)	+1 (0,016)
3	+1 (9,0)	+1 (3,0)	+1(3,0)	-1 (0,4)	-1 (0)	-1 (30,0)	+1 (6,5)	-1 (25)	-1 (0)	+1 (0,016)
4	+1 (9,0)	+1 (3,0)	+1(3,0)	+1 (1,2)	-1 (0)	-1 (30,0)	-1 (4,5)	+1 (35)	-1 (0)	-1 (0)
5	-1 (5,0)	+1 (3,0)	+1(3,0)	+1 (1,2)	+1 (0,134)	-1 (30,0)	-1 (4,5)	-1 (25)	+1 (0,0002)	-1 (0)
6	+1 (9,0)	-1 (0)	+1(3,0)	+1 (1,2)	+1 (0,134)	+1 (70,0)	-1 (4,5)	-1 (25)	-1 (0)	+1 (0,016)
7	-1 (5,0)	+1 (3,0)	-1 (1,0)	+1 (1,2)	+1 (0,134)	+1 (70,0)	+1 (6,5)	-1 (25)	-1 (0)	-1 (0)
8	+1 (9,0)	-1 (0)	+1(3,0)	-1 (0,4)	+1 (0,134)	+1 (70,0)	+1 (6,5)	+1 (35)	-1 (0)	-1 (0)
9	+1 (9,0)	+1 (3,0)	-1 (1,0)	+1 (1,2)	-1 (0)	+1 (70,0)	+1 (6,5)	+1 (35)	+1 (0,0002)	-1 (0)
10	-1 (5,0)	+1 (3,0)	+1(3,0)	-1 (0,4)	+1 (0,134)	-1 (30,0)	+1 (6,5)	+1 (35)	+1 (0,0002)	+1 (0,016)
11	-1 (5,0)	-1 (0)	+1(3,0)	+1 (1,2)	-1 (0)	+1 (70,0)	-1 (4,5)	+1 (35)	+1 (0,0002)	+1 (0,016)
12	+1 (9,0)	-1 (0)	-1 (1,0)	+1 (1,2)	+1 (0,134)	-1 (30,0)	+1 (6,5)	-1 (25)	+1 (0,0002)	+1 (0,016)
13	-1 (5,0)	+1 (3,0)	-1 (1,0)	-1 (0,4)	+1 (0,134)	+1 (70,0)	-1 (4,5)	+1 (35)	-1 (0)	+1 (0,016)
14	-1 (5,0)	-1 (0)	+1(3,0)	-1 (0,4)	-1 (0)	+1 (70,0)	+1 (6,5)	-1 (25)	+1 (0,0002)	-1 (0)
15	-1 (5,0)	-1 (0)	-1 (1,0)	+1 (1,2)	-1 (0)	-1 (30,0)	+1 (6,5)	+1 (35)	-1 (0)	+1 (0,016)
16	-1 (5,0)	-1 (0)	-1 (1,0)	-1 (0,4)	-1 (0)	-1 (30,0)	-1 (4,5)	-1 (25)	-1 (0)	-1 (0)
17	0 (7,0)	0 (1,5)	0 (2,0)	0 (0,8)	0 (0,067)	0 (50,0)	0 (5,5)	0 (30)	0 (0,0001)	0 (0,008)
18	0 (7,0)	0 (1,5)	0 (2,0)	0 (0,8)	0 (0,067)	0 (50,0)	0 (5,5)	0 (30)	0 (0,0001)	0 (0,008)
19	0 (7,0)	0 (1,5)	0 (2,0)	0 (0,8)	0 (0,067)	0 (50,0)	0 (5,5)	0 (30)	0 (0,0001)	0 (0,008)
20	0 (7,0)	0 (1,5)	0 (2,0)	0 (0,8)	0 (0,067)	0 (50,0)	0 (5,5)	0 (30)	0 (0,0001)	0 (0,008)

EL = extrato de levedura; * Concentração de glicerol a 100% de pureza.

2.5. Delineamento composto central rotacional

Posteriormente, com as variáveis selecionadas no planejamento apresentado na Tabela 1, foi proposto um delineamento composto central rotacional (DCCR), visando à maximização da produção de lipídios.

As respostas avaliadas foram biomassa máxima (g.L^{-1}), teor de lipídios em base seca (%) e lipídios totais produzidos (g.L^{-1}). Os dados foram tratados a 95% de confiança através do *software* Statistica 5.0 (StatSoft Inc., EUA).

2.6. Métodos analíticos

2.6.1. Biomassa

Alíquotas foram retiradas em intervalos de tempo pré-estabelecidos, centrifugadas a 1800 x g por 15 min e as células lavadas com água destilada, sendo novamente centrifugadas e ressuspensas. Posteriormente as células foram suspensas em volume de água que resultasse na leitura de absorvância dentro da faixa recomendada (0,2-0,8), utilizando-se comprimento de onda de 600 nm. Converteu-se o valor de absorvância em concentração (g.L^{-1}) através de uma curva padrão de biomassa previamente determinada para o micro-organismo (Apêndice A), baseada no método descrito por Choi; Park (2003).

2.6.2. pH

A determinação do pH foi realizada no sobrenadante, através da leitura em medidor de pH segundo AOAC (2000).

2.6.3. Glicerol

A determinação de glicerol no sobrenadante foi realizada através do *kit* enzimático LOD 0,4 mg.L^{-1} (R-Biopharm), de acordo com as recomendações do fabricante.

2.6.4. Lipídios

A concentração de lipídios foi determinada através do método de Bligh; Dyer (1959), adaptado por Manirakiza, Covaci; Schepens (2001), através da extração dos lipídios polares e não polares da biomassa utilizando uma mistura de metanol e clorofórmio. A biomassa seca foi primeiramente tratada com solução de HCl 2 mol.L⁻¹ para rompimento da parede celular, posteriormente centrifugada a 1785 x g e o sobrenadante descartado. A biomassa foi misturada com metanol, clorofórmio e água para a extração dos lipídios, seguido de centrifugação a 1785 x g por 10 min. Este procedimento foi repetido para a extração dos lipídios remanescentes na amostra. Com a mistura formaram-se três fases, onde os lipídios encontravam-se na fase inferior, dissolvidos em clorofórmio, que foi evaporado, e os lipídios quantificados por gravimetria, em massa seca.

2.7. Análise estatística

Os experimentos foram tratados através *software* Statistica 5.0 (StatSoft Inc., EUA). A fim de verificar a existência de diferenças significativas entre as condições de cultivo selecionadas, a 95% de confiança ($p \leq 0,05$), o teste *t* de *Student* foi empregado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Planejamento experimental Plackett-Burman

Os delineamentos Plackett-Burman são extremamente úteis quando se quer escolher um ou dois fatores mais importantes dentre vários fatores utilizados. É recomendada a escolha de um número de ensaios maior que o número de variáveis estudadas, deixando assim graus de liberdade para o cálculo do erro padrão (RODRIGUES; IEMMA, 2009). A levedura silvestre *Cryptococcus humicola*, que em estudo anterior se mostrou promissora no acúmulo de lipídios em meio contendo glicerol bruto como principal fonte de carbono, foi cultivada segundo planejamento Plackett-Burman, onde 10 variáveis foram avaliadas. Para isso, foram realizados 16 ensaios e 4 pontos centrais, seguindo-se a recomendação destes autores.

As curvas de crescimento celular bem como o acompanhamento do pH ao longo dos cultivos do planejamento Plackett-Burman são apresentados no Apêndice H.

A Tabela 2 apresenta as respostas para o planejamento Plackett-Burman em termos de biomassa máxima, produtividade de biomassa, teor de lipídios, lipídios totais e produtividade de lipídios ao final dos cultivos.

De acordo com a Tabela 2, os Ensaios 6, 8, 9, 11 e 14 foram os que apresentaram maior conteúdo lipídico, superiores a 40% (m/m da biomassa) de lipídios. Dentre esses, destaca-se o Ensaio 9, pois além de apresentar o maior conteúdo lipídico, 43,46%, foi o que apresentou também maior biomassa máxima (10,00 g.L⁻¹), elevada produtividade de biomassa e de lipídios (0,032 g.L⁻¹.h⁻¹ e 0,013 g.L⁻¹.h⁻¹, respectivamente) e maior concentração de lipídios totais (4,34 g.L⁻¹). Para este ensaio os parâmetros KH₂PO₄, MgSO₄.7H₂O, extrato de levedura, glicerol, pH, temperatura e ZnSO₄.7H₂O encontravam-se no nível +1 da faixa estudada, enquanto Na₂HPO₄, CaCl₂.2H₂O e FeCl₃.6H₂O encontravam-se no nível -1. Os Ensaios 10, 12 e 16 foram os que apresentaram os menores valores para as respostas avaliadas. Nestes três ensaios a concentração de glicerol no meio de cultivo encontrava-se no nível (-1).

Tabela 2 - Resultados do planejamento experimental Plackett-Burman para as respostas biomassa máxima, produtividade de biomassa, teor de lipídios, lipídios totais e produtividade de lipídios.

Ensaio	Tempo (h)	$X_{m\acute{a}x}$ (g.L ⁻¹)	P_X (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Lip (%)	Lip_T (g.L ⁻¹)	P_L (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
1	264	5,01	0,018	38,19	1,91	0,007
2	216	4,09	0,019	37,06	1,51	0,007
3	288	4,86	0,016	36,46	1,77	0,006
4	288	8,98	0,031	29,27	2,63	0,009
5	288	8,61	0,029	33,10	2,85	0,009
6	288	7,85	0,027	40,05	3,14	0,010
7	288	8,43	0,029	36,60	3,09	0,010
8	264	4,17	0,015	41,39	1,73	0,006
9	312	10,00	0,032	43,46	4,34	0,013
10	288	4,45	0,015	27,00	1,20	0,004
11	312	9,67	0,030	42,76	4,13	0,013
12	216	7,21	0,033	25,04	1,81	0,008
13	288	6,07	0,021	36,67	2,22	0,007
14	288	4,39	0,015	40,73	1,79	0,006
15	288	8,40	0,029	34,15	2,87	0,009
16	216	4,02	0,019	25,31	1,02	0,004
17	264	9,09	0,034	34,75	3,16	0,011
18	264	9,42	0,035	34,88	3,29	0,012
19	264	9,07	0,034	34,20	3,10	0,011
20	264	9,23	0,034	33,65	3,11	0,011

Tempo: tempo de cultivo; $X_{m\acute{a}x}$: biomassa máxima; P_X : produtividade de biomassa; Lip: teor de lipídios em base seca; Lip_T : lipídios totais produzidos; P_L : produtividade de lipídios.

A Tabela 3 apresenta os efeitos estimados, obtidos no planejamento Plackett-Burman, para a resposta biomassa máxima.

Tabela 3 - Efeitos estimados para a biomassa máxima (g.L⁻¹).

Fator	Efeito (g.L ⁻¹)	Erro padrão	t (9)	p-valor
KH ₂ PO ₄	-0,23	0,81	-0,28	0,7823
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,60	0,81	0,74	0,4807
Na ₂ HPO ₄	-0,03	0,81	-0,04	0,9713
EL*	4,01	0,81	4,94	0,0008
CaCl ₂ .2H ₂ O	-0,32	0,81	-0,40	0,6999
Glicerol	0,39	0,81	0,48	0,6431
pH inicial	-0,30	0,81	-0,37	0,7216
T**	0,91	0,81	1,12	0,2903
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,08	0,81	0,10	0,9224
FeCl ₃ .6H ₂ O	-0,13	0,81	-0,16	0,8788

*EL: extrato de levedura; **T: temperatura

De acordo com a Tabela 3, apenas a variável extrato de levedura apresentou efeito significativo positivo a 90% de confiança ($p < 0,1$) para a resposta biomassa máxima, levando a um aumento de 4,01 g.L⁻¹ na biomassa quando passou do nível -1 (0,4 g.L⁻¹) para o nível +1 (1,2 g.L⁻¹).

A Tabela 4 apresenta os efeitos estimados obtidos no planejamento Plackett-Burman para a resposta produtividade de biomassa.

Tabela 4 - Efeitos estimados para a produtividade de biomassa (g.L⁻¹.h⁻¹).

Fator	Efeito (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Erro padrão	t (9)	p-valor
KH ₂ PO ₄	<0,001	0,003	0,181	0,8604
MgSO ₄ .7H ₂ O	<0,001	0,003	0,200	0,8455
Na ₂ HPO ₄	-0,002	0,003	-0,704	0,4993
EL*	0,013	0,003	3,840	0,0040
CaCl ₂ .2H ₂ O	>-0,001	0,003	-0,070	0,9458
Glicerol	>-0,001	0,003	-0,112	0,9136
pH inicial	-0,001	0,003	-0,364	0,7245
T**	<0,001	0,003	0,197	0,8479
ZnSO ₄ .7H ₂ O	<0,001	0,003	0,214	0,8352
FeCl ₃ .6H ₂ O	<0,001	0,003	0,078	0,9395

*EL: extrato de levedura; **T: temperatura

Conforme observado na Tabela 4, somente a variável extrato de levedura apresentou efeito significativo ($p < 0,1$), positivo, para a produtividade de biomassa, sendo que o incremento desta variável do nível -1 (0,8 g.L⁻¹) para o nível +1 (1,2 g.L⁻¹) resultou em um incremento de 0,013 g.L⁻¹.h⁻¹ na produtividade de biomassa.

A Tabela 5 apresenta os efeitos estimados obtidos no planejamento Plackett-Burman para a resposta teor de lipídios.

Tabela 5 - Efeitos estimados para o teor de lipídios da levedura (%).

Fator	Efeito (%)	Erro padrão	<i>t</i> (9)	<i>p</i> -valor
KH ₂ PO ₄	1,82	2,19	0,83	0,4258
MgSO ₄ .7H ₂ O	-1,00	2,19	-0,46	0,6584
Na ₂ HPO ₄	1,79	2,19	0,82	0,4356
EL*	0,20	2,19	0,09	0,9283
CaCl ₂ .2H ₂ O	-1,39	2,19	-0,64	0,5396
Glicerol	8,77	2,19	4,01	0,0031
pH inicial	0,30	2,19	0,14	0,8931
T**	2,32	2,19	1,06	0,3171
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,93	2,19	0,42	0,6808
FeCl ₃ .6H ₂ O	-1,11	2,19	-0,51	0,6249

*EL: extrato de levedura; **T: temperatura

Conforme observado na Tabela 5, a concentração de glicerol foi a única variável que apresentou efeito significativo positivo ($p < 0,1$) sobre o teor de lipídios, sendo que o incremento desta variável de 30 g.L⁻¹ para 70 g.L⁻¹ resultou em um aumento significativo de 8,77% no teor de lipídios.

A Tabela 6 apresenta os efeitos estimados obtidos no planejamento Plackett-Burman para a resposta lipídios totais.

Tabela 6 - Efeitos estimados para os lipídios totais (g.L⁻¹).

Fator	Efeito (g.L ⁻¹)	Erro padrão	<i>t</i> (9)	<i>p</i> -valor
KH ₂ PO ₄	-0,04	0,33	-0,12	0,9084
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,15	0,33	0,46	0,6535
Na ₂ HPO ₄	0,06	0,33	0,18	0,8632
EL*	1,46	0,33	4,42	0,0017
CaCl ₂ .2H ₂ O	-0,26	0,33	-0,80	0,4460
Glicerol	0,74	0,33	2,23	0,0528
pH inicial	-0,10	0,33	-0,32	0,7593
T**	0,51	0,33	1,54	0,1589
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,14	0,33	0,41	0,6914
FeCl ₃ .6H ₂ O	-0,09	0,33	-0,26	0,8002

*EL: extrato de levedura; **T: temperatura

De acordo com a Tabela 6, as concentrações de extrato de levedura e glicerol apresentaram efeito significativo ($p < 0,1$), positivo, para esta resposta. O incremento na concentração de extrato de levedura de $0,8 \text{ g.L}^{-1}$ (nível -1) para $1,2 \text{ g.L}^{-1}$ (nível +1) e na concentração de glicerol de 30 g.L^{-1} (nível -1) para 70 g.L^{-1} (nível +1) implicou em um aumento de $1,46 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,74 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente, nos lipídios totais produzidos.

A Tabela 7 apresenta os efeitos estimados, obtidos no planejamento Plackett-Burman, para a resposta produtividade de lipídios.

Tabela 7 - Efeitos estimados para a produtividade de lipídios ($\text{g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

Fator	Efeito ($\text{g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	Erro padrão	<i>t</i> (9)	<i>p</i> -valor
KH_2PO_4	<0,001	0,001	0,284	0,7827
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	<0,001	0,001	0,165	0,8727
Na_2HPO_4	>-0,001	0,001	-0,361	0,7265
EL*	0,004	0,001	3,870	0,0038
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	>-0,001	0,001	-0,506	0,6251
Glicerol	0,002	0,001	1,772	0,1101
pH inicial	>-0,001	0,001	-0,411	0,6909
T**	0,001	0,001	0,850	0,4172
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	<0,001	0,001	0,450	0,6632
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	>-0,001	0,001	-0,088	0,9320

*EL: extrato de levedura; **T: temperatura

De acordo com a Tabela 7, apenas a concentração de extrato de levedura apresentou efeito significativo ($p < 0,1$), positivo, para a resposta produtividade de lipídios, ocasionando um incremento de $0,004 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

A maioria dos micro-organismos oleaginosos relatados em estudos utilizam glicose para a produção de lipídios (LIU; ZHAO, 2007; LIN et al., 2011; SCHULZE et al., 2014). No entanto, o uso de glicose na produção de lipídios microbianos aumenta significativamente os custos de produção, o que limita sua aplicação (LI et al., 2012). O glicerol bruto, todavia, constituiu uma boa fonte de carbono em cultivos microbianos, mesmo com a presença de impurezas, que variam de acordo com a matéria-prima e o processo utilizado para a obtenção do biodiesel (XU et al., 2012). O glicerol análogo ao biodiesel pode desempenhar um papel positivo no acúmulo de lipídios microbianos, substituindo os carboidratos utilizados tradicionalmente, reduzindo os custos de produção. Papanikolaou et al. (2008) sugerem que o glicerol como única fonte de carbono no meio de cultivo pode ter efeito positivo sobre o acúmulo de lipídios e

relatam que o aumento da concentração de glicerol no meio resultou em maior síntese de lipídios e maior produção de ácido cítrico.

Extrato de levedura, peptona e sulfato de amônio são as fontes de nitrogênio comumente utilizadas para acúmulo de lipídios em leveduras, sendo que o extrato de levedura, utilizado neste trabalho, destaca-se por contribuir para uma quantidade elevada de biomassa e conteúdo lipídico (KUMAR et al., 2010). Minerais como magnésio, potássio, ferro e cálcio, quando em pequenas concentrações, são considerados, geralmente, como essenciais para o crescimento celular e acúmulo de lipídios (SPENCER; SPENCER, 1997).

As condições de cultivo como temperatura e pH são também de suma importância em cultivos microbianos que visam à produção de lipídios. A temperatura ideal para o crescimento de cada linhagem de levedura é diferente, sendo geralmente em torno de 25°C. Temperaturas muito altas ou muito baixas afetam a taxa de crescimento celular e o acúmulo de lipídios devido a alterações metabólicas (BEOPOULOS et al., 2009). O pH inicial dos cultivos que utilizam leveduras é um dado importante que pode influenciar a produção biotecnológica por também influenciar a atividade enzimática e o metabolismo microbiano (SCHIMIDELL et al., 2001).

Contudo, observando-se os dados obtidos na análise de efeitos segundo o delineamento Plackett-Burman, os maiores efeitos positivos entre as variáveis independentes estudadas foram para as concentrações de extrato de levedura (sobre a biomassa máxima, produtividade em biomassa, lipídios totais e produtividade em lipídios) e glicerol (teor de lipídios e lipídios totais produzidos), sendo, portanto, selecionadas para um planejamento experimental posterior. As demais variáveis analisadas não apresentaram efeitos significativos para todas as respostas, sendo então fixadas no nível -1, correspondendo a 5,0 g.L⁻¹ KH₂PO₄, 1,0 g.L⁻¹ Na₂HPO₄, pH inicial 4,5, temperatura 25°C, e com a exclusão dos sais de cálcio, magnésio, ferro e zinco do meio de cultivo.

Duarte, Ghiselli; Maugeri, (2013) utilizaram também, um planejamento experimental Plackett-Burman para investigar a influência dos constituintes do meio de cultivo sobre a produção de lipídios por *Candida sp.* LEB-M3. Para isto, os efeitos de 8 constituintes foram avaliados através de 15 ensaios experimentais. Os autores relataram que apenas a variável concentração de glicerol apresentou efeito significativo positivo sobre a resposta teor de lipídios. Para a concentração de lipídios (g.L⁻¹), as variáveis

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e temperatura apresentaram efeito significativo negativo e as variáveis glicerol, pH inicial e hidrolisado protéico apresentaram efeito significativo positivo.

Já Xu et al. (2012) avaliaram o efeito individual de algumas impurezas tais como sabões, acilgliceróis, gorduras, metais pesados, sais inorgânicos e metanol presentes no glicerol bruto utilizado no cultivo de *Rhodospiridium toruloides* AS2.1389 e relataram que algumas dessas impurezas, como oleato de sódio, oleato de metila e monooleato de glicerina podem atuar como elementos nutricionais que podem ser assimilados pelos micro-organismos durante o cultivo e aumentar a concentração de biomassa e o acúmulo de lipídios intracelulares. Entretanto, o metanol, utilizado na reação de transesterificação, durante o processo de obtenção do biodiesel, foi capaz de inibir o crescimento da levedura *Rhodospiridium toruloides* e diminuir o acúmulo de lipídios intracelulares. Segundo os autores, embora o metanol tenha apresentado efeito inibitório sobre *Rhodospiridium toruloides*, a pequena quantidade de metanol remanescente no glicerol bruto não afetaria o processo de cultivo.

3.2. Delineamento composto central rotacional

Os cultivos microbianos envolvem múltiplas variáveis e nem sempre é óbvio determinar as mais importantes. Devido a isso, na maioria das vezes é necessário submeter o processo a uma triagem inicial antes da otimização. O planejamento Plackett-Burman é uma boa opção para essa triagem uma vez que permite determinar a influência de vários fatores com um número reduzido de ensaios (RODRIGUES; IEMMA, 2009). Quando o processo é submetido a uma triagem prévia a análise de um planejamento fatorial e das superfícies de resposta pode ser limitada às variáveis mais importantes visando à determinação das condições ótimas. A otimização mediante o uso de um planejamento fatorial e das superfícies de resposta é prática comum em biotecnologia, utilizada principalmente para a otimização das condições de cultivo (KALIL, MAUGERI; RODRIGUES, 2000).

Com base nos resultados obtidos na triagem realizada a partir do planejamento experimental Plackett-Burman, foi realizado um delineamento composto central rotacional 2^2 com 4 pontos centrais e 4 axiais, tendo como variáveis a concentração de glicerol e de extrato de levedura, que apresentaram efeitos significativos positivos na etapa anterior, mantendo-se fixas as concentrações de KH_2PO_4 ($5,0 \text{ g.L}^{-1}$) e de Na_2HPO_4

(1 g.L⁻¹), o pH inicial (4,5) e a temperatura (25°C). As respostas avaliadas no planejamento foram biomassa máxima, teor de lipídios e lipídios totais produzidos.

As curvas de crescimento celular bem como o acompanhamento do pH ao longo dos cultivos do DCCR são apresentados no Apêndice I.

A Tabela 8 apresenta a matriz do planejamento experimental proposto, bem como as respostas obtidas (biomassa máxima, teor de lipídios e lipídios totais produzidos).

Tabela 8 - Resultados do delineamento composto central rotacional 2² para as respostas biomassa máxima, teor de lipídios e lipídios totais produzidos.

Ensaio	Tempo (h)	Glicerol (g.L ⁻¹)*	EL (g.L ⁻¹)	X _{máx} (g.L ⁻¹)	Lip (%)	Lip _T (g.L ⁻¹)
1	312	70 (-1)	1,2 (-1)	8,42	43,49	3,66
2	288	130 (+1)	1,2 (-1)	7,26	46,85	3,40
3	336	70 (-1)	4,8 (+1)	24,24	29,61	7,18
4	336	130 (+1)	4,8 (+1)	21,38	39,22	8,38
5	336	100 (0)	3,0 (0)	18,01	42,59	7,67
6	336	100 (0)	3,0 (0)	17,66	42,46	7,49
7	336	100 (0)	3,0 (0)	17,20	42,71	7,35
8	336	100 (0)	3,0 (0)	17,54	42,50	7,45
9	240	57,7 (-1,41)	3,0 (0)	15,98	27,87	4,45
10	240	142,3 (+1,41)	3,0 (0)	13,44	40,29	5,42
11	144	100 (0)	0,46 (-1,41)	3,09	26,66	0,82
12	336	100 (0)	5,54 (+1,41)	25,52	30,37	7,75

Tempo: tempo de cultivo (h); EL: extrato de levedura; X_{máx}: biomassa máxima; Lip: teor de lipídios em base seca; Lip_T: lipídios totais produzidos. *Concentração de glicerol a 100% de pureza.

Verifica-se (Tabela 8) que no ensaio com melhor resultado (Ensaio 4) a concentração de glicerol e de extrato de levedura foi mantida no nível +1 (130 g.L⁻¹ e 4,8 g.L⁻¹, respectivamente). Apesar de não possuir a maior concentração de biomassa (21,28 g.L⁻¹) nem o maior conteúdo de lipídios (39,22%), se destacou das demais por apresentar a maior concentração de lipídios totais dentre os ensaios, chegando a 8,38 g.L⁻¹ em 336 h de cultivo. Isso se deve ao equilíbrio entre a produção de biomassa e o acúmulo de lipídios, uma vez que os lipídios totais são obtidos pela relação entre a concentração celular e o conteúdo lipídico das mesmas.

Taccari et al. (2012) utilizaram um delineamento fatorial composto central (DCC) visando otimizar a concentração de glicerol bruto e a temperatura para a produção de biomassa por leveduras oleaginosas. Para os autores, cultivos que visam o acúmulo de lipídios necessitam também determinar a condição ideal para a produção de biomassa.

Papanikolaou; Aggelis (2002) relatam um acúmulo elevado de lipídios (43%) para a levedura *Yarrowia lipolytica* LGAM S(7) 1, cultivada em meio contendo glicerol bruto. Entretanto, a concentração de lipídios totais não ultrapassou $3,5 \text{ g.L}^{-1}$ devido à concentração relativamente baixa de biomassa, que foi de apenas $8,1 \text{ g.L}^{-1}$, obtendo-se assim resultados inferiores aos deste trabalho.

Já Kitcha; Cheirsilp (2011), ao analisarem os efeitos das fontes de nitrogênio e da concentração de glicerol sobre o crescimento celular e acúmulo de lipídios em leveduras, relatam que as fontes de nitrogênio orgânico como extrato de levedura e peptona são mais benéficas ao crescimento celular e ao acúmulo de lipídios que as fontes de nitrogênio inorgânico ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Demonstraram ainda que biomassa, conteúdo lipídico e lipídios totais produzidos aumentaram substancialmente com o aumento da concentração de 5% para 10% de glicerol bruto no meio de cultivo utilizado, chegando a uma biomassa máxima de $10,4 \text{ g.L}^{-1}$ e lipídios totais de $4,45 \text{ g.L}^{-1}$ para a levedura *Trichosporonoides spathulata*.

Os tempos de cultivo variaram de 144 h a 336 h (fase estacionária). O Ensaio 11, com o menor tempo de cultivo, apresentou os menores valores para as respostas avaliadas. De acordo com Ageitos et al. (2011), em geral o crescimento das leveduras oleaginosas é bastante lento comparado ao de ascomicetos, como por exemplo a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Segundo estes autores, a produção de lipídios por leveduras oleaginosas requer um período prolongado para produzir rendimentos máximos.

A Tabela 9 apresenta os efeitos estimados obtidos para a resposta teor de lipídios.

Conforme observado na Tabela 9, o aumento na concentração de glicerol apresentou efeito significativo positivo ($p < 0,05$) sobre o teor de lipídios, sendo que o incremento desta variável resultou em um aumento significativo de 7,64 % no teor de lipídios. Entretanto para a concentração de extrato de levedura foi observado um efeito significativo negativo, reduzindo em 4,08% o teor de lipídios, com o incremento desta

variável. A interação entre as duas variáveis gerou um aumento significativo de 3,12% no teor de lipídios.

Tabela 9 - Efeitos estimados para o teor de lipídios da levedura (%).

Fator	Efeito (%)	Erro padrão	<i>t</i> (3)	<i>p</i> -valor
GLI (L)	7,64	0,08	97,9	0,000002
EL (L)	-4,08	0,08	-52,26	0,000015
Interação	3,12	0,11	28,33	0,000097

$p < 0,05$; GLI: Glicerol; EL: extrato de levedura.

A Tabela 10 mostra a análise de variância (ANOVA) para a resposta biomassa máxima. Como o valor de F calculado foi 74 vezes superior ao F tabelado, o modelo empírico codificado de 2ª ordem foi considerado preditivo, sendo a interação entre as variáveis glicerol e extrato de levedura não significativa. O modelo está apresentado na Equação 1, onde GLI corresponde à concentração de glicerol e EL à concentração de extrato de levedura.

$$\text{Biomassa (g.L}^{-1}\text{)} = 17,6 - 0,95(\text{GLI}) - 1,24(\text{GLI})^2 + 7,71(\text{EL}) - 1,44 (\text{EL})^2 \quad \text{(Eq. 1)}$$

Tabela 10 - ANOVA para a biomassa máxima (g.L⁻¹).

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	501,82	4	125,45	305,97
Resíduo	2,91	7	0,41	
Total	504,73	11	45,88	

$p < 0,05$; $R^2 = 0,99$; $F_{4,7, 95\%} = 4,12$

A Tabela 11 mostra a análise de variância (ANOVA) para a resposta lipídios totais produzidos. Como o valor de F calculado foi 7,5 vezes superior ao F tabelado, o modelo empírico de 2ª ordem foi considerado preditivo, sendo a interação entre as variáveis glicerol e extrato de levedura não significativa (Equação 2).

$$\text{Lipídios totais} = 7,48 - 1,01(\text{GLI})^2 + 2,29(\text{EL}) - 1,34 (\text{EL})^2 \quad \text{(Eq. 2)}$$

Tabela 11 - ANOVA para os lipídios totais (g.L^{-1}).

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	57,03	3	19	41,3
Resíduo	3,74	8	0,46	
Total	60,77	11	5,52	

$p < 0,05$; $R^2 = 0,94$; $F_{3,8, 95\%} = 4,07$

A partir dos modelos preditivos (Equações 1 e 2) foi possível obter as curvas de contorno (Figuras 1 e 2) para avaliar o comportamento das respostas frente às variações nas concentrações de glicerol e de extrato de levedura, buscando uma região ótima.

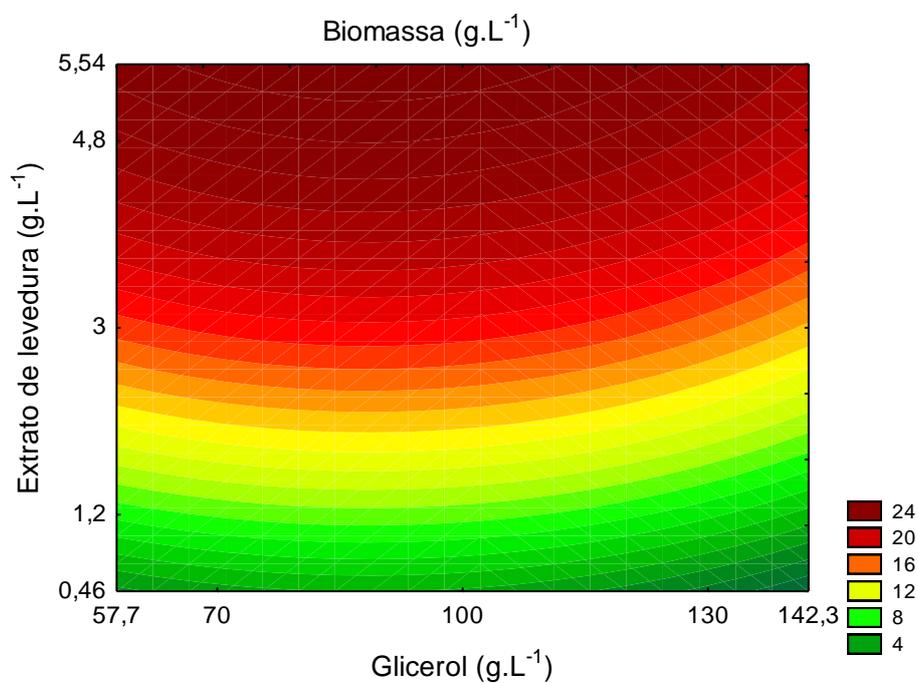
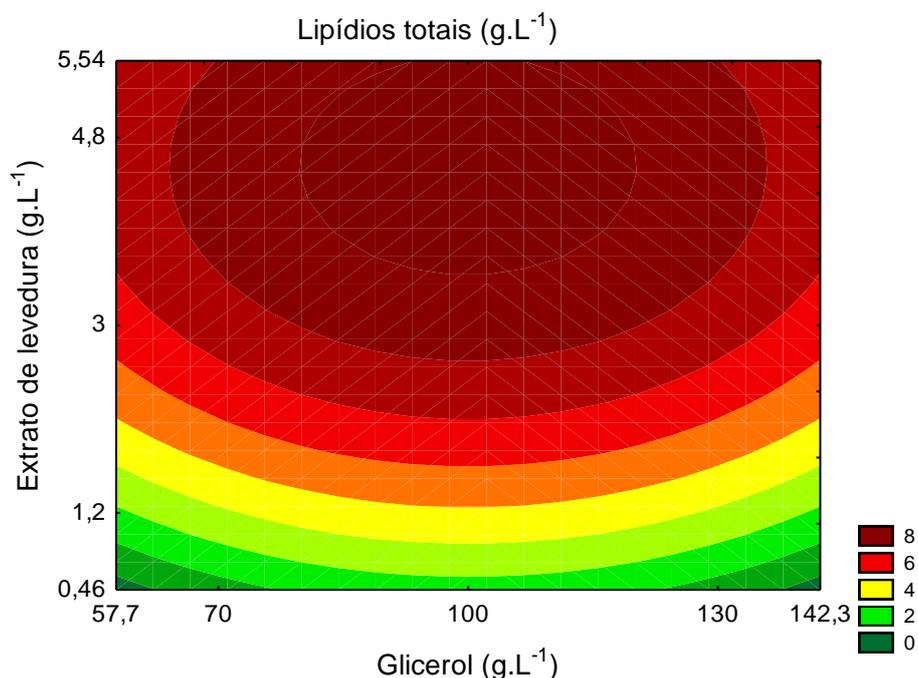
Figura 1 - Curva de contorno para biomassa em função da concentração de glicerol e de extrato de levedura nos diferentes níveis estudados.

Figura 2 - Curva de contorno para lipídios totais em função da concentração de glicerol e de extrato de levedura nos diferentes níveis estudados.



Ao observar a Figura 1 constata-se que as maiores concentrações de biomassa ocorreram quando elevadas concentrações de extrato de levedura, acima de $4,8 \text{ g.L}^{-1}$, foram utilizadas no meio de cultivo. Entretanto, para a concentração de glicerol a condição ótima parece estar entre 70 e 100 g.L^{-1} , que correspondem ao nível -1 e ao ponto central do planejamento experimental, respectivamente.

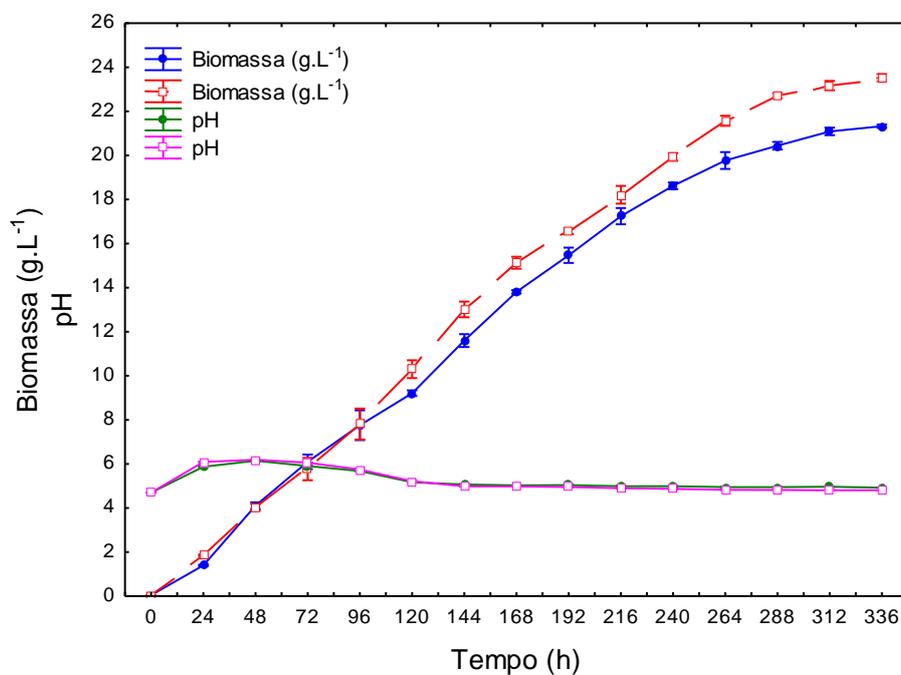
Na Figura 2 é possível observar que altas concentrações de extrato de levedura, acima de $3,0 \text{ g.L}^{-1}$, e concentrações de glicerol ao redor do ponto central (100 g.L^{-1}) favorecem maiores concentrações de lipídios totais.

3.3. Validação do modelo matemático para biomassa e lipídios totais

De acordo com os resultados obtidos, optou-se por validar 2 condições distintas: condição 1, referente ao ensaio 4 ($130,0 \text{ g.L}^{-1}$ glicerol; $5,0 \text{ g.L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$; $1,0 \text{ g.L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$; $4,8 \text{ g.L}^{-1}$ extrato de levedura; pH inicial 4,5; temperatura 25°C); e condição 2, apontada pelas curvas de contorno ($100,0 \text{ g.L}^{-1}$ glicerol; $5,0 \text{ g.L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$; $1,0 \text{ g.L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$; $4,8 \text{ g.L}^{-1}$ extrato de levedura; pH inicial 4,5; temperatura 25°C), que não constava na matriz do delineamento composto central rotacional.

Nas condições descritas, foram realizados ensaios em triplicata, acompanhando-se a cinética de crescimento celular e o pH ao longo do cultivo (Figura 3).

Figura 3 - Biomassa e pH ao longo do cultivo de *Cryptococcus humicola*. Ensaio 1 (●): correspondente à condição do Ensaio 4 do planejamento experimental; Ensaio 2 (□): corresponde à condição apontada pelas curvas de contorno.



A Tabela 12 apresenta as médias \pm desvio padrão para biomassa máxima, teor de lipídios e lipídios totais para a repetição do Ensaio 4 e a condição apontada pelas curvas de contorno.

Tabela 12 - Médias \pm desvio padrão para biomassa máxima, teor de lipídios e lipídios totais e análise estatística dos dados*

Condição	$X_{m\acute{a}x}$ (g.L ⁻¹)	Lip (%)	Lip _T (g.L ⁻¹)
1**	21,33 \pm 0,07 ^b	39,61 \pm 1,24 ^a	8,44 \pm 0,24 ^a
2***	23,53 \pm 0,16 ^a	37,61 \pm 2,39 ^a	8,85 \pm 0,61 ^a

*Letras minúsculas iguais indicam que não há diferença significativa para uma mesma resposta, a 95% de confiança ($p < 0,05$).

** 130,0 g.L⁻¹ glicerol; 4,8 g.L⁻¹ extrato de levedura.

*** 100,0 g.L⁻¹ glicerol; 4,8 g.L⁻¹ extrato de levedura.

Através da Tabela 12, é possível observar que a condição apontada pelas curvas de contorno, com uma concentração de extrato de levedura de 4,8 g.L⁻¹ e de glicerol de

100 g.L⁻¹, correspondentes ao nível (+1) e ao ponto central do planejamento experimental, respectivamente, ocasionaram um aumento na concentração de biomassa, mas não havendo diferenças significativas quanto ao teor de lipídios e lipídios totais.

Cui, Blackburn; Liang (2012) relatam que a metodologia de superfície de resposta permitiu o desenvolvimento de um modelo empírico para a previsão da produção de biomassa e conteúdo lipídico pela levedura oleaginosa *Cryptococcus curvatus* cultivada em glicerol bruto. As equações e os gráficos de contorno gerados permitiram a identificação das condições ótimas para produção máxima de biomassa e lipídios. A verificação, através de um experimento usando a temperatura, pH e concentração de glicerol indicadas, resultou em valores semelhantes de produção de biomassa e lipídios aos previstos pelo modelo. O cultivo adotando as variáveis otimizadas gerou melhores rendimentos de biomassa e lipídios em comparação aos obtidos anteriormente.

A Tabela 13 apresenta o desvio relativo entre os resultados preditos pelo modelo e os resultados experimentais obtidos para biomassa máxima e lipídios totais.

Tabela 13 - Resultados esperados e resultados experimentais obtidos para biomassa máxima e lipídios totais no cultivo de *Cryptococcus humicola*

Biomassa máxima (g.L ⁻¹)							
Condição	Valor experimental			Valor predito	Erro relativo (%)		
	A	B	C		A	B	C
1*	21,26	21,33	21,41	21,68	-1,97	-1,64	-1,26
2**	23,42	23,72	23,45	23,87	-1,92	-0,63	-1,79

Lipídios totais (g.L ⁻¹)							
Condição	Valor experimental			Valor predito	Erro relativo (%)		
	A	B	C		A	B	C
1*	8,72	8,24	8,38	7,42	14,91	9,95	11,45
2**	8,79	9,49	8,26	8,43	4,09	11,17	2,06

* 130,0 g.L⁻¹ glicerol; 4,8 g.L⁻¹ extrato de levedura.

** 100,0 g.L⁻¹ glicerol; 4,8 g.L⁻¹ extrato de levedura.

De acordo com a Tabela 13, constata-se que a condição 2 (condição apontada pelas curvas de contorno) é a que melhor valida o modelo, com um desvio relativo inferior a 5,8% (média), ou seja, com valores muito próximos aos previstos pelo modelo. A condição correspondente ao Ensaio 4 do planejamento experimental (condição 1) apresentou um desvio relativo superior, apresentando valores um pouco inferiores aos esperados para biomassa e superiores aos esperados para lipídios totais.

É importante salientar que os resultados obtidos na condição de cultivo estabelecida pela análise das curvas de contorno (condição 2) representa um incremento de cerca de 2 vezes nos lipídios totais em relação à melhor condição estabelecida pelo planejamento de Plackett-Burmann e um acréscimo de cerca de 4,8 vezes em relação às condições testadas inicialmente (meio proposto por Evans; Ratledge, 1983), em etapa anterior do estudo (artigo 3). Segundo Tanimura et al. (2014), a capacidade de produzir elevadas concentrações de lipídios totais é uma característica crucial a qualquer micro-organismo que possa ser utilizado para a produção de biodiesel.

3.4. Cinética do crescimento celular, consumo de glicerol e acúmulo de lipídios

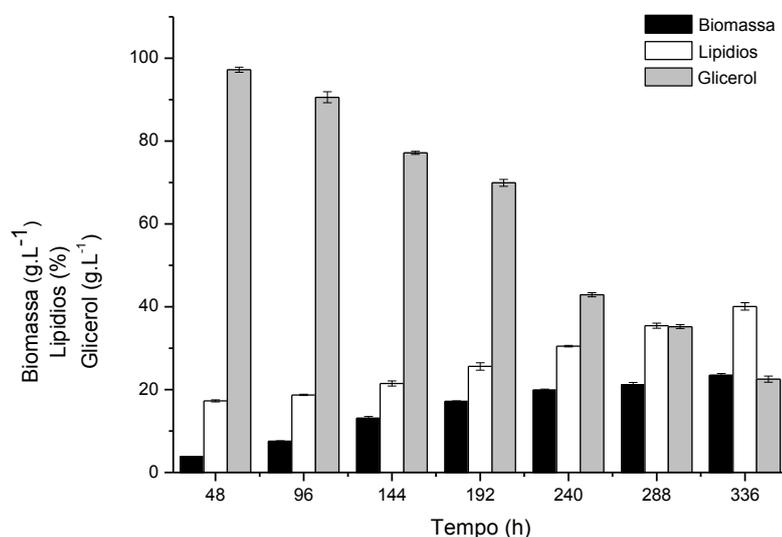
A fim de avaliar o comportamento da levedura silvestre *Cryptococcus humicola* ao longo do cultivo, a mesma foi cultivada na condição estabelecida pela análise das curvas de contorno: 100,0 g.L⁻¹ glicerol; 5,0 g.L⁻¹ KH₂PO₄; 1,0 g.L⁻¹ Na₂HPO₄; 4,8 g.L⁻¹ extrato de levedura; pH inicial 4,5; temperatura 25°C.

A Figura 4 apresenta o acompanhamento da concentração de glicerol, biomassa e acúmulo de lipídios pela levedura *Cryptococcus humicola* ao longo do cultivo em frascos agitados.

Observa-se (Figura 4) que o acúmulo de lipídios ocorre gradativamente, ao longo do cultivo, acompanhando o crescimento celular da levedura, passando de 17,28 ± 0,24% em 48 h de cultivo para 40,08 ± 0,90% em 336 h de cultivo. O cultivo foi interrompido em 336 h, sendo a fase estacionária atingida por volta de 288 h, pois embora o acúmulo lipídico continue durante a fase estacionária, períodos prolongados podem levar a degradação dos lipídios formados.

A capacidade de acumular lipídios é extremamente afetada pela proporção das fontes de carbono e nitrogênio (relação C/N) do meio. Quando a relação C/N é baixa, o fluxo de carbono é distribuído para permitir a proliferação celular. Assim, um elevado número de células pode ser obtido com um baixo conteúdo lipídico. Enquanto que com uma relação C/N elevada, o crescimento celular é limitado, uma vez que sem a presença de nitrogênio as células não podem se multiplicar. Portanto, é importante determinar a condição ideal para biomassa e acúmulo de lipídios (SAENGE et al., 2011) Nesta condição, estabelecida pela análise das curvas de contorno, foi utilizada uma relação de 84 g.g⁻¹, buscando além de elevado conteúdo lipídico altas concentrações de lipídios totais que são dados pela relação entre a biomassa e seu conteúdo lipídico.

Figura 4 - Acompanhamento da concentração de glicerol, biomassa e acúmulo de lipídios da levedura *Cryptococcus humicola* ao longo do tempo de cultivo.



4. CONCLUSÃO

As variáveis concentração de extrato de levedura e concentração de glicerol bruto apresentaram maior influência na produção de lipídios pela levedura *Cryptococcus humicola*.

A metodologia de superfície de resposta permitiu desenvolver um modelo para a previsão da produção de biomassa e lipídios totais produzidos. As equações e as curvas de contorno geradas permitiram a identificação das condições ótimas para produção máxima de biomassa e lipídios totais, sendo que a condição para a maximização, validada pelo modelo empírico, representou um incremento de cerca de 4,8 vezes nos lipídios totais produzidos em relação às condições testadas inicialmente, cumprindo com os propósitos de bioconversão do glicerol bruto e produção de lipídios microbianos em condições otimizadas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 17 th edition. Washington, D.C., CD-ROM, 2000.
- AGEITOS, J. M.; VALLEJO, J. A.; VEIGA-CRESPO, P.; VILLA, T. G. Oily yeasts as oleaginous cell factories. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, p. 1219-1227, 2011.
- BEATRIZ, A.; ARAUJO, Y. J. K.; LIMA, D.P. **Glicerol: um breve histórico e aplicação em sínteses estereosseletivas**. **Química Nova**, v. 34, p. 306-319, 2011.
- BEOPOULOS, A.; CESCUT, J.; HADDOUCHE, R.; URIBELARREA, J.; MOLINA-JOUVE, C.; NICAUD, J. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. **Progress in Lipid Research**, v. 91, p. 692–696, 2009.
- BLIGH, E. G.; DYER, J. W. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911–917, 1959.
- CHEIRSILP, B.; LOUHASAKUL, Y. Industrial wastes as a promising renewable source for production of microbial lipid and direct transesterification of the lipid into biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 329–337, 2013.
- CHOI, M. H.; PARK, Y. H. Production of yeast biomass using waste Chinese cabbage. **Biomass and Bioenergy**, v. 25, p. 221-226, 2003.
- CUI, Y.; BLACKBURN, J. W.; LIANG, L. Fermentation optimization for the production of lipid by *Cryptococcus curvatus*: use of response surface methodology. **Biomass and Bioenergy**, v.4 7, p. 410-417, 2012.
- DUARTE, S.H.; GHISELLI, G.; MAUGERI, F. Influence of culture conditions on lipid production by *Candida sp.* LEB-M3 using glycerol from biodiesel synthesis. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, p. 339–343, 2013.
- EVANS, C. T.; RATLEDGE, C. Biochemical activities during lipid accumulation in *Candida curvata*. **Lipids**, v. 18, n. 9, p. 630-635, 1983.
- FAKAS, S.; PAPANIKOLAOU, S.; BASTOS, A.; GALIOTOUPANAYOTOU, M.; MALLOUCHOS, A.; AGGELIS, G. Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, p. 573–580, 2009.
- GEN,Q.; WANG, Q.; CHI, Z. Direct conversion of cassava starch into single cell oil by co-cultures of the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* and immobilized amylases-producing yeast *Saccharomycopsis fibuligera*. **Renewable Energy**, v. 62, p. 522-526, 2014.

HERNALSTEENS, S.; MAUGERI, F. Synthesis of fructooligosaccharides using extracellular enzymes from *Rhodotorula* sp. **Journal of Food Biochemistry**, v. 34, p. 520-534, 2010.

KALIL, S. J.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 539–550. 2000.

KITCHA, S.; CHEIRSIL, B.; Screening of oleaginous yeasts and optimization for lipid production using crude glycerol as a carbon source. **Energy Procedia**, v. 9, p. 274–282, 2011.

KULAKOVSKAYA, E.V.; GOLUBEV, V.I.; KULAEV, S. Extracellular antifungal glycolipids of *Cryptococcus humicola* yeasts. **Doklady Biological Sciences**, v. 410, p. 393–395, 2006.

KUMAR, S. V.; KUMUTHA, K.; KRISHNAN, P. S.; GOPAL, H. Influence of nitrogen on lipid and biomass production by oleaginous yeast culture. **Asian Journal of Bio Science**. v. 5, p. 87-91, 2010.

LEIVA-CANDIA, D. E.; PINZI, S.; REDEL-MACÍAS, M. D.; KOUTINAS, A.; WEBB, C.; DORADO, M. P. The potential for agro-industrial waste utilization using oleaginous yeast for the production of biodiesel. **Fuel**, v. 123, p. 33-42, 2014.

LI, S. L.; LIN, Q.; LI, X. R.; XU, H.; YANG, Y. X.; QIAO, D. R.; CAO, Y. Biodiversity of the oleaginous microorganisms in Tibetan Plateau. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 12, p. 627-634, 2012.

LIN, J.; SHEN, H.; TAN, H.; ZHAO, X.; WU, S.; HU, C.; ZHAO, Z. K. Lipid production by *Lipomyces starkeyi* cells in glucose solution without auxiliary nutrients. **Journal of Biotechnology**, v. 152, p. 184–188, 2011.

LIU, B.; ZHAO, Z. B. Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, p. 775–780, 2007.

MANIRAKIZA, P.; COVACI, A.; SCHEPENS, P. Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and Modified Bligh & Dyer extraction methods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, p. 93-100, 2001.

MAKRI, A.; FAKAS, S.; AGGELIS, G. Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeated batch cultures. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2351–2358, 2010.

MENEZES, R. S.; LELES, M. I. G.; SOARES, A. T.; BRANDÃO, P. I.; FRANCO, M.; ANTONIOSI FILHO, N. R. Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 36, p. 10-15, 2013.

MENG, X.; YANG, J.; XU, X.; ZHANG, L.; NIE, Q.; XIAN, Q. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable Energy**, v. 34, p. 1-5, 2009.

MURAKAMI-NITTA, T.; KIRIMURA, K.; KINO, K. Oxidative degradation of dimethyl sulfoxide by *Cryptococcus humicolus* WU-2, a newly isolated yeast. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 95, p. 109–111, 2003.

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

PAPANIKOLAOU, S.; FAKAS, S.; FICK, M.; CHEVALOT, I.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; KOMAITIS, M., MARC, I.; AGGELIS, G. 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 and Bioenergy**, v. 32, p. 60–71, 2008.

PAPANIKOLAOU, S. Oleaginous yeasts: biochemical events related with lipid synthesis and potential biotechnological applications. **Fermentation Technology**, v. 1, p. 1–3, 2011.

POLI, J. S.; LÜTZHOFT, H. H.; KARAKASHEV, D. B.; VALENTE, P.; ANGELIDAKI, I. An environmentally-friendly fluorescent method for quantification of lipid contents in yeast. **Bioresource Technology**, v. 151, p. 388–391, 2014.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de Processos**. 2 ed. Campinas: Casa de Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009. 358p.

RYU, B.; KIM, J.; KIM, K.; CHOI, Y.; HAN, J.; YANG, J. High-cell-density cultivation of oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* for biodiesel production using organic waste from the brewery industry. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 357–364, 2013.

SAENGE, C.; CHEIRSILPB, B.; SUKSAROGEA, T. T.; BOURTOOMC, T. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 210–218, 2011.

SANTOS, E. O.; MICHELON, M.; FURLONG, E. B.; BURKERT, J. F. M.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V. Evaluation of the composition of culture medium for yeast biomass production using raw glycerol from biodiesel synthesis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 432-440, 2012.

SAWANGKEAWA, R.; NGAMPRASERTSITH, S. A review of lipid-based biomasses as feedstocks for biofuels production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 25, p. 97–108, 2013.

SCHIMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial, Engenharia Bioquímica**. V. 2. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. 403 p.

SCHULZE, I.; HANSEN, S.; GROßHANS, S.; RUDSZUCK, T.; OCHSENREITHER, K.; SYLDATK, C.; NEUMANN, A. Characterization of newly isolated oleaginous yeasts - *Cryptococcus podzolicus*, *Trichosporon porosum* and *Pichia segobiensis*. **AMB Express**, v. 4, p. 1-11, 2014.

SPENCER, J. F. T.; SPENCER, D.M. Yeasts as Living objects: Yeast Nutrition. In: **Yeasts in Natural and Artificial Habitats**. p.68-74, 1997.

TACCARI, M.; CANONICO, L.; COMITINI, F.; MANNAZZU, I.; CIANI, M. Screening of yeasts for growth on crude glycerol and optimization of biomass production. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 488–495, 2012.

TANIMURA, A.; TAKASHIMA, M.; SUGITA, T.; ENDOH, R.; KIKUKAWA, M.; YAMAGUCHI, S.; SAKURADANI, E.; JUN OGAWA, J.; SHIMA, J. Selection of oleaginous yeasts with high lipid productivity for practical biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 153, p. 230–235, 2014.

VICENTE, G.; BAUTISTA, L. F.; RODRIGUEZ, R.; GUTIERREZ, F. J.; SADABA, I.; RUIZ-VAZQUEZ, R. M.; TORRES-MARTINEZ, S.; GARRE, V. Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 22–27, 2009.

YANG, F.; HANNA, M. A.; SUN, R. Value-added uses for crude glycerol– a byproduct of biodiesel production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, p. 1-10, 2012.

XU, J.; ZHAO, X.; WANG, W.; DU, W.; LIU, D. Microbial conversion of biodiesel byproduct glycerol to triacylglycerols by oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* and the individual effect of some impurities on lipid production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 65, p. 30-36, 2012.

CAPITULO IV
CONCLUSÕES GERAIS

4. CONCLUSÕES GERAIS

Dentre as leveduras provenientes de banco de culturas verificou-se que, nos cultivos em frascos agitados, foram capazes de assimilar glicerol bruto e acumular elevados conteúdos lipídicos. Nesta etapa do estudo, *Lipomyces lipofer* NRRL Y-1155 apresentou diferenças significativas em relação às demais leveduras ($p \leq 0,05$), atingindo $57,64 \pm 2,81\%$ de lipídios na biomassa. As leveduras apresentaram perfis de ácidos graxos diferenciados, semelhantes aos dos principais óleos vegetais utilizadas na síntese de biodiesel, com predominância de ácidos graxos poli-insaturados, especialmente ácido linoleico (68,3% na levedura *Rhodotorula glutinis* NRRL YB-252). O ácido gama-linolênico, um ácido graxo essencial $\omega 6$, foi detectado em todas as leveduras analisadas, sendo que na biomassa de *Candida cylindracea* NRRL Y-17506 chegou a 23,1%.

Através de um planejamento Plackett-Burman, foi possível estabelecer as variáveis com efeitos significativos na produção de lipídios pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, sendo elas as concentrações de extrato de levedura e $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. A partir da análise de efeitos, foi possível estabelecer a seguinte condição para a produção de lipídios por esta levedura: 30,0 g.L⁻¹ glicerol; 5,0 g.L⁻¹ KH_2PO_4 ; 1,0 g.L⁻¹ Na_2HPO_4 ; 3,0 g.L⁻¹ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 1,2 g.L⁻¹ extrato de levedura; pH inicial 4,5; temperatura 25°C. Nestas condições foram obtidos: biomassa máxima de $9,20 \pm 0,09$ g.L⁻¹, produtividade de biomassa de $0,038 \pm 0,000$ g.L⁻¹.h⁻¹, teor de lipídios de $59,96 \pm 0,65\%$, lipídios totais produzidos de $5,51 \pm 0,11$ g.L⁻¹ e produtividade de lipídios de $0,023 \pm 0,0004$ g.L⁻¹.h⁻¹. A avaliação cinética do cultivo permitiu verificar o aumento no teor de lipídios da biomassa ao longo do tempo, bem como o aumento do teor relativo de ácido linoleico.

Um planejamento de Plackett-Burman foi também aplicado para a levedura *Cryptococcus humicola*, onde as variáveis concentrações de extrato de levedura e de glicerol demonstraram efeitos significativos na produção de lipídios. Na sequência, um delineamento composto central rotacional (DCCR) tornou possível a proposição de modelos empíricos de 2ª ordem preditivos para biomassa máxima e lipídios totais produzidos. As condições estabelecidas foram: 100,0 g.L⁻¹ glicerol; 5,0 g.L⁻¹ KH_2PO_4 ; 1,0 g.L⁻¹ Na_2HPO_4 ; 4,8 g.L⁻¹ extrato de levedura; pH inicial 4,5; temperatura 25°C. Nestas condições, biomassa máxima, teor de lipídios e lipídios totais produzidos foram de $23,53 \pm 0,16$ g.L⁻¹, $37,61 \pm 2,39\%$ e $8,85 \pm 0,61$ g.L⁻¹ respectivamente, representando um

incremento de cerca de 4,8 vezes nos lipídios totais produzidos em relação às condições testadas inicialmente.

Desta forma, pode-se afirmar que o trabalho desenvolvido contribuiu para o desenvolvimento de tecnologia nacional de aproveitamento do glicerol bruto oriundo do processo de produção do biodiesel, disponibilizando novas linhagens de leveduras como produtoras de lipídios, com composição dos meios de produção, pH inicial e temperatura estabelecidos, havendo potencialidades quanto ao desenvolvimento de um processo que vise à produção de óleos microbianos, abrindo um novo caminho, sustentável e renovável, para agregar valor à cadeia produtiva do biodiesel e permitir a produção de biodiesel de segunda geração.

CAPÍTULO V
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

5. Sugestões para Trabalhos Futuros

Avaliar as condições de aeração e agitação em biorreator de bancada de forma a maximizar o desempenho de *Cryptococcus humicola* e *Rhodotorula mucilaginosa* quanto à obtenção de biomassa lipídica, bem como obter dados que permitam a ampliação de escala dos processos;

Correlacionar as condições de aeração e agitação com o perfil de ácidos graxos dos lipídios obtidos;

Avaliar os cultivos destas leveduras em batelada alimentada;

Avaliar a extração dos lipídios da biomassa, visando processos em larga escala;

Avaliar a produção de biodiesel a partir dessas biomassas.

CAPÍTULO VI

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIQUIM – **Associação Brasileira da Indústria Química**. São Paulo – SP, Brasil. Disponível em: < <http://www.abiquim.org.br> >. Acesso em 14 de maio de 2010.

ADAMS, I.P., DACK, S., DICKINSON, F.M. The distinctiveness of ATP: citrate lyase from *Aspergillus nidulans*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1597, p. 36–41, 2002.

AGEITOS, J. M.; VALLEJO, J. A.; VEIGA-CRESPO, P.; VILLA, T. G. Oily yeasts as oleaginous cell factories. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, p. 1219-1227, 2011.

ALVES, J. C. S. **Medidas da emissão de poluentes e da eficiência na combustão assistida do glicerol residual de biodiesel**. 2010. 87f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Físicas Aplicadas). Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza-CE, 2010.

AMARAL, P. F. F.; FERREIRA, T. F.; FONTES, G. C.; COELHO, M. A. Z. Glycerol valorization: new biotechnological routes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 87, p. 179-186, 2009.

AMI, D.; POSTERI, R.; MEREGHETTI, P.; PORRO, D.; DOGLIA, S. M.; BRANDUARDI, P. Fourier transform infrared spectroscopy as a method to study lipid accumulation in oleaginous yeasts. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, p. 1-14, 2014.

ANDRADE, R. C. R. **Estudo do desenvolvimento e da produtividade lipídica da levedura *Rhodotorula glutinis* NCYC 921 em culturas descontínuas por citometria de fluxo**. 2010, 47f. Dissertação. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. Monte de Caparica, 2010.

ANGERBAUER, C.; SIEBENHOFER, M.; MITTELBAACH, M.; GUEBITZ, G.M. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 99, p.3051–3056, 2008.

ANP - **Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis**. Brasília – DF, Brasil. Disponível em: < <http://www.anp.gov.br> >. Acesso em 27 de março de 2014.

AOAC – **ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS**. Official Methods of Analysis. 17th ed. Washington, D.C., 2000. CD-ROM.

ARRUDA P. V.; RODRIGUES R. C. L. B.; FELIPE M. G. A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista Analytica**, n.26, p. 56-62, 2007.

ATABANI, A.; SILITONGA, A.; BADRUDDIN, I.; MAHLIA, T.; MASJUKI, H.; MEKHILEF, S. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**. v.16, p. 2070–2093, 2012.

- ATHENSTAEDT, K.; JOLIVET, P.; BOULARD, C.; ZIVY, M.; NEGRONI, L.; NICAUD, J. M.; CHARDOT, T. Lipid particle composition of the yeast *Yarrowia lipolytica* depends on the carbon source. **Proteomics**, v. 6, p.1450–1459, 2006.
- BATISTA, F. **Brasil não tem destino certo para glicerina gerada por biodiesel**. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com>> Acesso em setembro de 2010.
- BEATRIZ, A.; ARAUJO, Y. J. K.; LIMA, D. P. Glicerol: um breve histórico e aplicação em sínteses estereosseletivas. **Química Nova**, v. 34, p. 306-319, 2011.
- BEN. **Balanco Energético Nacional 2013**. Ministério das Minas e Energia, Disponível em: <<http://www.mme.gov.br>> Acesso em 17 de janeiro de 2014.
- BEOPOULOS, A.; MROZOVA, Z.; THEVENIEAU, F.; LE DALL, M.T.; HAPALA, I.; PAPANIKOLAOU, S.; CHARDOT, T.; NICAUD, J. M. Control of lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.4, p.7779-7789, 2008.
- BEOPOULOS, A.; CESCUT, J.; HADDOUCHE, R.; URIBELARREA, J.; MOLINA-JOUE, C.; NICAUD, J. *Yarrowia lipolytica*: as a model for bio-oil production. **Progress in Lipid Research**, v. 91, p.692–696, 2009.
- BEOPOULOS, A.; NICAUD, J. M.; GAILLARDIN, C. An overview of lipid metabolism in yeast and its impact on biotechnological processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.10, p.1193-1203, 2011.
- BLIGH, E. G.; DYER, J. W. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p.911–917, 1959.
- BONOMI, A.; POÇO, J. G.; TRIELLI, M. A. Biocombustíveis – a solução brasileira para uma matriz energética sustentável. **Revista Brasileira de Engenharia Química**, v. 22, p. 16-21, 2006.
- BORSCHIVER, S. Desafios da sustentabilidade. **Revista Brasileira de Engenharia Química**, v. 22, p. 24-25, 2006.
- BORZANI, W.; AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial – Fundamentos**. v.1. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda, 2001. 254p.
- BRISSON, D.; VOHL, M. C.; ST-PIERRE, J.; HUDSON, T. J.; GAUDET, D. Glycerol: a neglected variable in metabolic process? **Bio Essays**, v. 23, p. 534-542, 2001.
- CAMPOS, A. A. CARMÊLIO, E. C. Construir a diversidade da matriz energética: o biodiesel no Brasil. In: **Biocombustíveis a energia da controvérsia**. São Paulo: Editora SENAC, p.12-21, 2009.
- CASTANHA, R. F.; MORAIS, L. A. S.; MARIANO, A. P.; MONTEIRO, R. T. R. Comparison of two lipid extraction methods produced by yeast in cheese whey. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, p. 629-636, 2013.

CAZETTA, M.L.; CELLIGOI, M.A.P.C. Aproveitamento do melão e vinhaça de cana-de-açúcar como substrato para produção de biomassa protéica e lipídica por leveduras e bactéria. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 26, p. 105-112, 2005.

CHANG, Y.; CHANG, K.; HSU, C.; CHUANG, L.; CHEN, C.; HUANG, F.; JANG, H. A comparative study on batch and fed-batch cultures of oleaginous yeast *Cryptococcus sp.* in glucose-based media and corncob hydrolysate for microbial oil production. **Fuel**, v. 105, p. 711–717, 2013.

CHATZIFRAGKOU, A.; MAKRI, A.; BELKA, A.; BELLOU, S.; MAVROU, M.; MASTORIDOU, M. Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. **Energy**, v. 36, p.1097–108, 2011.

CHEIRSILP, B.; LOUHASAKUL, Y. Industrial wastes as a promising renewable source for production of microbial lipid and direct transesterification of the lipid into biodiesel. **Bioresource Technology**, v.142, p. 329–337, 2013.

CHOI, M. H.; PARK, Y. H. Production of yeast biomass using waste Chinese cabbage. **Biomass & Bioenergy**, v. 25, p. 221-226, 2003.

CODA, R.; RIZZELLO, C.G.; CAGNO, R.; TRANI, A.; CARDINALI, G.; GOBBETTI, M. Antifungal activity of *Meyerozyma guilliermondii*: identification of active compounds synthesized during dough fermentation and their effect on long-term storage of wheat bread. **Food Microbiology**, v.33, p.243-251, 2013.

COSTA, F. C. *Centro nacional de gestão de bionegócios – CENABIO: uma estrutura de fomento para biocombustíveis*. 2006. 151f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) –Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

CRUGER, W.; CRUEGER, A. **Biotechnology: a textbook of industrial microbiology**. Madison: Science Technology Inc., 1984. 308p.

CUELIK, E.; OZBAY, N.; OKTAR, N.; CUALIK, P. Use of biodiesel byproduct crude glycerol as the carbon source for fermentation processes by recombinant *Pichia pastoris*. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 47, p. 2985–2990, 2008.

CUI, Y.; BLACKBURN, J. W.; LIANG, L. Fermentation optimization for the production of lipid by *Cryptococcus curvatus*: Use of response surface methodology. **Biomass and Bioenergy**, v.47, p.410 - 417, 2012.

CZABANY, T.; ATHENSTAEDT, K.; DAUM, G. Synthesis, storage and degradation of neutral lipids in yeast. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1771, p. 299–309, 2007.

DAI, C. C.; TAO, J.; XIE, F.; DAI, Y. J.; ZHAO, M. Biodiesel generation from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 2130-2134, 2007.

DAVOLI, P.; MIERAU, V.; WEBER, R. S. W. Carotenoids and fatty acids in arid yeasts *Sporobolomyces rosus* and *Rhodotorula glutinis*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 40, p. 392–397, 2004.

DHARMADI, Y.; MURARKA, A.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering. **Biotechnology and Bioengineering**, v.9, p. 794-821, 2006.

DOU, B.; DUPONT, V.; WILLIAMS, P. T.; CHEN, H.; DING, Y. Thermogravimetric kinetics of crude glycerol. **Bioresource Technology**, v. 100, p.2613-2620, 2009.

DUARTE, S. H.; GHISELLI, G.; MAUGERI, F. Influence of culture conditions on lipid production by *Candida sp.* LEB-M3 using glycerol from biodiesel synthesis. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.2, p.339-343, 2013.

DYAL, S. D.; NARINE, S. S. Implications for the use of *Mortierella* fungi in the industrial production of essential fatty acids. **Food Research International**, v. 38, p. 445-467, 2005.

EASTERLING, E. R.; FRENCH, W. T.; HERNANDEZ, R.; LICHA, M. The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. **Bioresource Technology**, v.100, p.356-361, 2009.

EVANS, C. T.; RATLEDGE, C. Biochemical activities during lipid accumulation in *Candida curvata*. **Lipids**, v. 18, p. 9 -16, 1983.

EVANS, C. T.; RATLEDGE, C.; GILBERT, S. C. A rapid screening method for lipid-accumulating yeast using a replica-printing technique. **Journal of Microbiological Methods**, v. 4, p. 203-210, 1985.

FAIRBANKS, M. Crescimento do biodiesel provoca inundação no mercado de glicerina, incentivando a descobrir novas aplicações. **Revista Química e Derivados**, n. 487, 2009.

FAKAS, S.; PAPANIKOLAOU, S.; BASTOS, A.; GALIOTOUPANAYOTOU, M.; MALLOUCHOS, A.; AGGELIS, G. Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, p. 573-580, 2009.

FEI, Q.; CHANG, H. N.; SHANG, L. A.; CHOI, J. D. R.; KIM, N.; KANG, J. The effect of volatile fatty acids as a sole carbon source on lipid accumulation by *Cryptococcus albidus* for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v.102, p.2695-2701, 2011.

FICKERS, P.; BENETTI, P. H.; WACHE, Y.; MARTY, A.; MAUERSBERGER, S.; SMIT, M.S.; NICAUD, J.M. Hydrophobic substrate utilization by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. **FEMS Yeast Research**, v.5, p.527-543, 2005.

FREITAS, C.; PARREIRA, T. M.; ROSEIRO, J.; REIS, A.; SILVA, T. L. Selecting low-cost carbon sources for carotenoid and lipid production by the pink yeast *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 using flow cytometry. **Bioresource Technology**, v.158, p. 355-359, 2014.

FRENGOVA, G.; BESHKOVA, D. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnology importance. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.36, p.163-180, 2009.

- GALAFASSI, S.; CUCCHETTI, D.; PIZZA, F.; FRANZOSI, G.; BIANCHI, D.; COMPAGNO, C. Lipid production for second generation biodiesel by the oleaginous yeast *Rhodotorula graminis*. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 398–403, 2012
- GANGAR, A.; RAYCHAUDHURI, S.; RAJASEKHRAN, R. Alteration in the cytosolic triacylglycerol biosynthetic machinery leads to decreased cell growth and triacylglycerol synthesis in oleaginous yeast. **Biochemistry Journal**, v.365, p.577–589, 2002.
- GAO, Q.; CUI, Z.; ZHANG, J.; BAO, J. Lipid fermentation of corncob residues hydrolysate by oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum*. **Bioresource Technology**, v. 152, p.552–556, 2014.
- GASPAR, M. L.; AREGULLIN, M. A.; JESCH, S.A.; NUNEZ, L. R.; VILLAGARCÍA, M.; SUSAN A.; HENRY, S. A. The emergence of yeast lipidomics. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1771, p. 241–254, 2007.
- GEN, Q.; WANG, Q.; CHI, Z. Direct conversion of cassava starch into single cell oil by co-cultures of the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* and immobilized amylases-producing yeast *Saccharomycopsis fibuligera*. **Renewable Energy**, v.62 p.522-526, 2014.
- GOLDBECK, R. **Triagem, produção e avaliação da atividade da enzima lipase a partir de leveduras silvestres**. 2008. 113f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.
- GONZALEZ-PAJUELO, M.; MEYNIAL-SALLES, I.; MENDES, F.; ANDRADE, J.C.; VASCONCELOS, I.; SOUCAILLE, P. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for the industrial production of 1,3-propanediol from glycerol. **Metabolic Engineering**, v. 7, p.329–336, 2005.
- GOVERNO FEDERAL. **Biodiesel 2007**. Disponível em: <http://www.biodiesel.gov.br>. Acesso em 02 de agosto de 2010.
- GRIFFITHS, M. J.; HARRISON, S. T. L. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. **Journal of Applied Phycology**, v. 21, p.493–507, 2009.
- HAAS, M.J.; MCALOON, A. J.; YEE, W. C.; FOGLIA, T. A. A process model to estimate biodiesel production costs. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 671–678, 2006.
- HAALAND P. D. **Experimental design in biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1989, 284p.
- HASSAN, M.; BLANC, P.J.; GRANGER, L. M.; PAREILLEUX, A., GOMA, G., Influence of nitrogen and iron limitations on lipid production by *Cryptococcus curvatus* grown in batch and fed-batch culture. **Process Biochemistry**, v. 31, p. 355–361, 1996.
- HERNALSTEENS, S. **Isolamento, identificação e caracterização de microrganismos produtores de oligossacarídeos a partir de coletas em diferentes regiões brasileiras**. 2006. 174f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos)-

Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

HERNALSTEENS, S.; MAUGERI, F. Synthesis of fructooligosaccharides using extracellular enzymes from *Rhodotorula* sp. **Journal of Food Biochemistry**, v.34, p. 520-534, 2010.

HOLDSWORTH, J. E.; VEENHUIS, M.; RATLEDGE, C. Enzyme activities in oleaginous yeasts accumulating and utilizing exogenous or endogenous lipids. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 134, p. 2907–2915, 1988.

HUANG, J. Z.; SHI, Q. Q.; ZHOU, X. L.; LIN, Y. X.; XIE, B. F.; WU, S. G. Studies on the breeding of *Mortierella isabellina* mutant high producing lipid and its fermentation conditions. **Microbiology**, v.25, p.187–191, 1998.

JIN, G.; YANG, F.; HU, C.; SHEN, H.; ZHAO, Z. K. Enzyme-assisted extraction of lipids directly from the culture of the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 378–382, 2012.

KALIL, S. J.; MAUGERI, A. F.; RODRIGUES, M. I. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. **Process Biochemistry**, v.35, p. 539–550. 2000.

KARATAY, S. E.; DÖNMEZ, G. Improving the lipid accumulation properties of the yeast cells for biodiesel production using molasses. **Bioresource Technology**, v.101 p.7988–7990, 2010.

KAWAI, F.; ZHANG, D.; SUGIMOTO, M. Isolation and characterization of acid- and Al-tolerant microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v.189, p.143–147, 2000.

KIMURA, K.; YAMAOKA, M.; KAMISAKA, T. Inhibition of lipid accumulation and lipid body formation in oleaginous yeast by effective components in spices, carvacrol, eugenol, thymol, and piperine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 3528-3534, 2006.

KITCHA, S.; CHEIRSILP, B.; Screening of oleaginous yeasts and optimization for lipid production using crude glycerol as a carbon source. **Energy Procedia**, v.9, p. 274 – 282, 2011.

KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. **Fuel Processing Technology**, v. 86, p. 1059– 1070, 2005.

KNOTHE, G. Improving biodiesel fuel properties by modifying fatty ester composition. **Energy & Environmental Science**, v. 2, p. 759–766, 2009.

KODAMA, S.; NAKANISHI, H.; THALAGALA, T. A. T. P.; ISONO, N.; HISAMATSU, M. A wild and tolerant yeast suitable for ethanol fermentation from lignocellulose. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 115, p. 557-561, 2013.

KONG, X. L.; LIU, B.; ZHAO, Z. B.; FENG, B. Microbial production of lipids by cofermentation of glucose and xylose with *Lipomyces starkeyi* 2#. **Chinese Journal of Bioprocess Engineering**, v. 5, p.36–41, 2007.

KULAKOVSKAYA, E.V.; GOLUBEV, V.I.; KULAEV, S. Extracellular antifungal glycolipids of *Cryptococcus humicola* Yeasts. **Doklady Biological Sciences**, v.410, p. 393–395, 2006.

KUMAR, S. V.; KUMUTHA, K.; KRISHNAN, P. S.; GOPAL, H. Influence of nitrogen on lipid and biomass production by oleaginous yeast culture. **Asian Journal of Bio Science**. v. 5, p. 87-91, 2010.

LACHANCE, M. A.; BOWLES, J. M.; STARMER, W. T.; BARKER, J. S. F. *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new yeast species from Australian *Hibiscus* flowers. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 172-177, 1999.

LANGE, J.; HAMMER, E.; SPECHT, M.; FRANCKE, W.; SCHAUER, F. Biodegradation of biphenyl by the ascomycetous yeast *Debaryomyces vanriijiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, p. 364-368, 1998.

LEIVA-CANDIA, D. E.; PINZI, S.; REDEL-MACÍAS, M. D.; KOUTINAS. A.; WEBB, C.; DORADO, M. P. The potential for agro-industrial waste utilization using oleaginous yeast for the production of biodiesel. **Fuel**, v. 123, p. 33-42, 2014

LEONETI, A. B.; ARAGÃO-LEONETI, V.; OLIVEIRA, S.V.W.B. Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: alternatives for the use of unrefined glycerol. **Renewable Energy**, v. 45, p. 138-145, 2012.

LI, Y. H.; LIU, B.; ZHAO, Z.B.; BAI, F. W. Optimized culture medium and fermentation conditions for lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 22, p. 650–656, 2006.

LI, Y. H.; ZHAO, Z. B. K.; BAI F. W. High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v.41, p. 312-317, 2007.

LI, Q.; DU, W.; LIU, D. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, p. 749–56, 2008.

LI, M.; LIU, G. L.; CHI, Z.; CHI, Z. M. Single cell oil production from hydrolysate of cassava starch by marine-derived yeast *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, p. 101-107, 2010.

LI, S. L.; LIN, Q.; LI, X. R.; XU, H.; YANG, Y. X.; QIAO, D. R.; CAO, Y. Biodiversity of the oleaginous microorganisms in Tibetan Plateau. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 12, p. 627-634, 2012.

LIAN, J.; GARCIA-PEREZ, M.; CHEN, S. Fermentation of levoglucosan with oleaginous yeasts for lipid production. **Bioresource Technology**, v. 133, p.183–189, 2013.

LIANG, X. A.; DONG, W. B.; MIAO, X. J.; DAI, C. J. Production technology and influencing factors of microorganism grease. **Food Research and Development**, v. 27, p. 46-47, 2006.

LIANG, Y.; CUI, Y.; TRUSHENSKI, J.; BLACKBURN, J. W. Converting crude glycerol derived from yellow grease to lipids through. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7581-7586, 2010.

LIANG, M. H.; JIANG, J. G. Advancing oleaginous microorganisms to produce lipid via metabolic engineering technology. **Progress in Lipid Research**, v.52, p.395–408, 2013.

LIBKIND, D.; GADANHO, M.; BROOCK, M., SAMPAIO, J. P. Studies on the heterogeneity of the carotenogenic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* from Patagonia, Argentina. **Journal of Basic Microbiology**, v. 48, p. 93-98, 2008.

LIN, J.; SHEN, H.; TAN, H.; ZHAO, X.; WU, S.; HU, C.; ZHAO, Z. K. Lipid production by *Lipomyces starkeyi* cells in glucose solution without auxiliary nutrients. **Journal of Biotechnology**, v. 152, p. 184–188, 2011.

LIU, S. J.; YANG, W.B.; SHI, A. H. Screening of the high lipid production strains and studies on its flask culture conditions. **Microbiology**, v.27, p.93–97, 2000.

LIU, B.; ZHAO Z. B. Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, p. 775–780, 2007.

MA, Z.; SHENTU, X.; BIAN Y.; YU, X. Production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* using raw glycerol from *Zygosaccharomyces rouxii*. **African Journal of Biotechnology**, v.11, p.1245-1249, 2012

MAKRI, A.; FAKAS, S.; AGGELIS, G. Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeated batch cultures. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2351–2358, 2010.

MANIRAKIZA, P.; COVACI, A.; SCHEPENS, P. Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and Modified Bligh & Dyer extraction methods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.14, p.93-100, 2001.

MARTIN, C. E.; OH, C.; JIANG, Y. Regulation of long chain unsaturated fatty acid synthesis in yeast. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1771, p. 271–285, 2007.

MAUGERI, F.; HERNALSTEENS, S. Screening of yeast strains for transfructosylating activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 49, p. 43-49, 2007

MEHER, L. C.; SAGAR, D. V.; NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.10, p.248–268, 2006.

MENEZES, R. S.; LELES, M. I. G.; SOARES, A. T.; BRANDÃO, P. I.; FRANCO, M.; ANTONIOSI FILHO, N. R. Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 36, p. 10-15, 2013.

- MENG, X.; YANG, J.; XU, X.; ZHANG, L.; NIE, Q.; XIAN, Q. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable Energy**, v. 34, p. 1-5, 2009.
- METCALFE, L.D.; SCHIMTZ, A.A.; PELKE, J.R. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 38, p. 514-515, 1966.
- MOLINÉ, M.; LIBKIND, D.; BROOCK, M. Production of torularhodin, torulene, and β -carotene by *Rhodotorula* yeasts. **Methods in Molecular Biology**, v.898, p. 275-283, 2012.
- MONTGOMERY, D.C. **Introdução ao controle estatístico de qualidade**. 4ª Edição. Rio de Janeiro: Editora LTC, 2004. 269p
- MORITA, T.; KONISHI, M.; FUKUOKA, T.; IMURA, T.; KITAMOTO, D. Microbial conversion of glycerol into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by a basidiomycete yeast, *Pseudozyma antarctica* JCM 10317^T. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 104, n. 1, p78–81, 2007.
- MOTA, C. J. A.; SILVA, C. X. A.; GONÇALVES, V. L. C. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir do glicerol de produção do biodiesel. **Química Nova**, v.32, p. 639-648, 2009.
- MU, Y.; XIU, Z.; ZHANG, D. A combined bioprocess of biodiesel production by lipase with microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p.537–541, 2008.
- MURAKAMI-NITTA, T.; KIRIMURA, K.; KINO, K. Oxidative degradation of dimethyl sulfoxide by *Cryptococcus humicolus* WU-2, a newly isolated yeast. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.95, p. 109–111, 2003.
- NATTER, K.; LEITNER, P.; FASCHINGER, A.; WOLINSKI, H.; MCCRAITH, S.; FIELDS, S.; KOHLWEIN, S.D. The spatial organization of lipid synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* derived from large scale green fluorescent protein tagging and high resolution microscopy. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 4, p.662–672, 2005.
- NIELSEN, J. Systems biology of lipid metabolism: from yeast to human. **FERBS Letters**, v.583, p.3905-3913, 2009.
- ORDOG, V.; STIRK, W. A.; BALINT, P.; LOVASZ, C.; PULZ, O.; VAN STADEN, J. Lipid productivity and fatty acid composition in *Chlorella* and *Scenedesmus* strains grown in nitrogen-stressed conditions. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, p.233–243, 2013.
- OTERO, D. M. **Bioprospeção de leveduras silvestres produtoras de carotenoides**. Rio Grande, 2011. 93 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2011.
- PACHAURI, N.; HE, B. **Value-added utilization of crude glycerol from biodiesel production: a survey of current research activities**. In: ASABE ANNUAL INTERNATIONAL MEETING. Portland, Oregon. p. 9-12, 2006.

PAN, L. X.; YANG, D. F.; SHAO, L.; Li, W.; CHEN, G. G.; LIANG, Z. Q. Isolation of the oleaginous yeasts from the soil and studies of their lipid-producing capacities. **Food Technology and Biotechnology**, v. 47, n. 2, p. 215–220, 2009.

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

PAPANIKOLAOU, S.; MUNIGLIA, L.; CHEVALOT, I.; AGGELIS, G.; MARC, I. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p.737–744, 2002.

PAPANIKOLAOU, S., SARANTOU, S., KOMAITIS, M. Repression of reserve lipid turnover in *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina* cultivated in multiple limited media. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 867–875, 2004.

PAPANIKOLAOU, S.; FAKAS, S.; FICK, M.; CHEVALOT, I.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; KOMAITIS, M., MARC, I.; AGGELIS, G. 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 and Bioenergy**, v. 32, p.60–71, 2008.

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Biotechnological valorization of biodiesel derived glycerol waste through production of single cell oil and citric acid by *Yarrowia lipolytica*. **Lipid Technology**, v. 21, p.83–87, 2009.

PAPANIKOLAOU S, AGGELIS G. Lipids of oleaginous yeasts. Part I: biochemistry of single cell oil production. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.113, p.1031–1051, 2011.

PAPANIKOLAOU, S. Oleaginous yeasts: biochemical events related with lipid synthesis and potential biotechnological applications. **Fermentation Technology**, v. 1, p. 1–3, 2012.

PELLICCIA, C.; ANTONIELLI, L.; CORTE, L.; BAGNETTI, A.; FATICHENTI, F.; CARDINALI, G. Preliminary prospection of the yeast biodiversity on apple and pear surfaces from Northern Italy orchards. **Annals of Microbiology**, v. 61, p. 965–972, 2011.

PINZI, S.; GARCIA, I. L.; LOPEZ-GIMENEZ, F. J.; LUQUE DE CASTRO, M. D.; DORADO, G.; DORADO, M. P. The ideal vegetable oil-based biodiesel composition: a review of social, economical and technical implications. **Energy Fuel**, v.23, p.2325–2341, 2009.

PIROZZI, D.; AUSIELLO, A.; ZUCCARO, G.; SANNINO, F.; YOUSUF, A. Culture of oleaginous yeasts in dairy industry wastewaters to obtain lipids suitable for the production of II-generation biodiesel. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v.7, p. 4-26, 2013.

PNPB - Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel. **Biodiesel: o novo combustível do Brasil**. Disponível em: < <http://www.mme.gov.br>.> Acesso em: 25 de março de 2014.

POLI, J. S.; DALLÉ, P.; SENTER, L.; MENDES, S.; RAMIREZ, M.; VAINSTEIN, M.; VALENTE, P. Fatty acid methyl ester produced by oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* QU21: an alternative for vegetable oils. **Revista Brasileira de Biociências** v.11, p. 203–208, 2013.

POLI, J.S.; LÜTZHOFT, H. H.; KARAKASHEV, D. B.; VALENTE, P.; ANGELIDAKI, I. An environmentally-friendly fluorescent method for quantification of lipid contents in yeast. **Bioresource Technology**, v. 151, p. 388–391, 2014.

QUINTELLA, C. M.; TEIXEIRA, L. S. G.; KORN, M. G. A.; NETO, P. R. C.; TORRES, E. A.; CASTRO, M. P.; JESUS, C. A. C. Cadeia do biodiesel da bancada à indústria: uma visão geral com prospecção de tarefas e oportunidades para P&D&I. **Química Nova**, v.32, n.3, p.793-808, 2009.

RAMOS, L. P.; COSTA NETO, P. R.; ROSSI, L. F. S.; ZAGONEL, G. F. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. **Química Nova**, v. 23, p. 531-537, 2000.

RAMOS, L. P. **Manual de Biodiesel**. 1. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2006.

RAMOS, L. P. Glicerina, o tamanho do problema. **Revista Biodieselbr**, v. 3, 2008.

RATLEDGE, C. Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. **Biochemical Society Transactions**, v.30, p.1047-1050, 2002.

RATLEDGE, C.; WYNN, J. P. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. **Advances in Applied Microbiology**, v. 51, p. 1–51, 2002.

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

RATLEDGE, C.; COHEN, Z. Single cell oils for the 21 century. In: **Single cell oils**. p. 1-20, 2005.

REGULY, J. C. **Biotechnologia dos processos fermentativos**. Pelotas: Editora Gráfica Universitária – UFPel, 2000. 221p.

RINALDI, R.; GARCIA, C.; MARCINIUK, L. L.; ROSSI, A. V.; SCHUCHARDT, U. Síntese de biodiesel: uma proposta contextualizada de experimento para laboratório de química geral. **Química Nova**, v.30, p. 1374-1380, 2007.

RIVALDI, J. D.; SARROUH, B. F.; FIORILO, R.; SILVA, S. S. Glicerol de biodiesel: estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel. **Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.37, p. 44-51, 2009.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de Processos**. 2 ed. Campinas: Casa de Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009. 358p.

ROEPCKE, C. B. S. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de biomassa de levedura rica em zinco orgânico**. 2007. 137f. Dissertação. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

ROUSSEF, D. Biodiesel o novo combustível do Brasil. **Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel**, Ministério das Minas e Energia, 2004.

RUANGUDOM, C.; PUNPENG, B. Effect of C/N ratio and temperature on lipid accumulation of *Rhodospiridium toruloides* TISTR 5123 using sugar cane juice. In: **Proceedings of the 12th ASEAN Food Conference**, BITEC Bangna, Bangkok, Thailand, 2011.

RYU, B.; KIM, J.; KIM, K.; CHOI, Y.; HAN, J.; YANG, J. High-cell-density cultivation of oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* for biodiesel production using organic waste from the brewery industry. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 357–364, 2013.

SAENGE^a, C.; CHEIRSILPB, B.; SUKSAROGEA, T.T.; BOURTOOMC, T. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 210–218, 2011.

SAENGE^b, C.; CHEIRSILPB, B.; SUKSAROGEA, T. T.; BOURTOOMC, T. Efficient concomitant production of lipids and carotenoids by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultured in palm oil mill effluent and application of lipids for biodiesel production. **Biotechnology and Bioprocess Engineering** v.16, p. 23-33, 2011.

SANTOS, E.O.; MICHELON, M.; FURLONG, E. B.; BURKERT, J. F. M; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V. Evaluation of the composition of culture medium for yeast biomass production using raw glycerol from biodiesel synthesis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 432-440, 2012.

SAWANGKEAWA, R.; NGAMPRASERTSITH, S. A review of lipid-based biomasses as feedstocks for biofuels production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.25, p.97–108, 2013.

SBRT- **Serviço Brasileiro de Resposta Técnica**. Purificação do glicerol vegetal bruto obtido na produção de biodiesel. Disponível em: <<http://www.respostatecnica.org.br>> Acesso em: 23 de maio de 2010.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial, Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001, 403p.

SCHNEIDER, T.; GRAEFF-HÖNNINGER, S.; FRENCH, W.T.; HERNANDEZ, R.; MERKT, N.; CLAUPEIN, W.; HETRICK, M.; PHAM, P. Lipid and carotenoid production by the oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultivated on brewery effluents. **Energy**, v. 61, p. 34–43, 2013.

SCHULZE, I.; HANSEN, S.; GROBHANS, S.; RUDSZUCK, T.; OCHSENREITHER, K.; SYLDATK, C.; NEUMANN, A. Characterization of newly isolated oleaginous

yeasts - *Cryptococcus podzolicus*, *Trichosporon porosum* and *Pichia segobiensis*. **AMB Express**, v. 4, p.1-11, 2014.

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

SILVA, T. L.; GOUVEIA, L.; REIS, A. Integrated microbial processes for biofuels and high added value products: the way to improve the cost effectiveness of biofuel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 21, p. 1043-1053, 2013.

SILVEIRA, L. **Glicerina gerada na produção do biodiesel terá novos usos**. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com>> Acesso em novembro de 2011.

SITEPU, I. R.; SESTRIC, R.; IGNATIA, L.; LEVIN, D.; GERMAN, J. B.; GILLIES, L. A.; ALMADA, L. A. G.; BOUNDY-MILLS, K. L. Manipulation of culture conditions alters lipid content and fatty acid profiles of a wide variety of known and new oleaginous yeast species. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 360–369, 2013.

SONG, M. M.; PEI, H. Y.; HU, W. R.; MA, G. X. Evaluation of the potential of 10 microalgal strains for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v.141, p.245–251, 2013.

SPENCER, J. F. T. SPENCER, D. M. Yeasts as living objects: yeast nutrition. In: **Yeasts in natural and artificial habitats**. p. 68-74, 1997.

STANSELL, G.; GRAY, V.; SYM, S. Microalgal fatty acid composition: implications for biodiesel quality. **Journal of Applied Phycology**, v.24, p.791–801, 2012

SUAREZ, P. A. Z.; SANTOS, A. L. F.; RODRIGUES J. P. ALVES, M. B. Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: desafios tecnológicos para viabilizá-los. **Química Nova**, v.32, p. 768-775, 2009.

SUBRAMANIAM, R.; DUFRECHE, S.; ZAPPI, M.; BAJPAI, R. Microbial lipids from renewable resources: production and characterization. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 1271–1287, 2010.

TACCARI, M.; CANONICO, L.; COMITINI, F.; MANNAZZU, I.; CIANI, M. Screening of yeasts for growth on crude glycerol and optimization of biomass production. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 488–495, 2012.

TAI, M.; STEPHANOPOULOS, G. Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production. **Metabolic Engineering**, v. 15, p. 1–9, 2013.

TAKASHIMA, M.; SUGITA, T.; VAN, B. H.; NAKAMURA, M.; ENDOH, R.; OHKUMA, M. Taxonomic richness of yeasts in Japan within subtropical and cool temperate areas. **PLoS One**, v. 7, p. 1-8, 2012.

TAKAHASHI, S.; NAKAJIMA, Y.; IMAIZUMI, T.; FURUTA, Y.; OHSHIRO, Y.; ABE, K.; YAMADA, R.; KERA, Y. Development of an autonomously replicating linear vector of the yeast *Cryptococcus humicola* by using telomere-like sequence repeats. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, p. 1213–1221, 2011.

TALEBIAN-KIAKALAEH, A.; AMIN, N. A. S.; MAZAHERI, H. A review on novel processes of biodiesel production from waste cooking oil. **Applied Energy**, v. 104, p. 683–710, 2013.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

TANIMURA, A.; TAKASHIMA, M.; SUGITA, T.; ENDOH, R.; KIKUKAWA, M.; YAMAGUCHI, S.; SAKURADANI, E.; JUN OGAWA, J.; SHIMA, J. Selection of oleaginous yeasts with high lipid productivity for practical biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 153 p. 230–235, 2014.

TAPIA, E. V.; ANSCHAU, A.; CORADINI, A. L. V.; FRANCO, T. T.; DECKMANN, A. A. Optimization of lipid production by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* by random mutagenesis coupled to cerulenin screening. **AMB Express**, v. 2, p. 1-8, 2012.

TEHLIVETS, O.; SCHEURINGER, K.; KOHLWEIN, S. D. Fatty acid synthesis and elongation in yeast. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1771, p. 255–270, 2007.

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

THIRU, M.; SANKH, S.; RANGASWAMY, V. Process for biodiesel production from *Cryptococcus curvatus*. **Bioresource Technology**, v.102, p.10436–10440, 2011.

UBRABIO- União Brasileira do Biodiesel. Combustível ecológico que mudou a matriz energética: O Combustível da Sustentabilidade. **Revista Institucional**. Brasília. DF, 2009. 17p.

UCHIDA, H.; HOJYO, M.; FUJII, Y.; MAEDA, Y.; KAJIMURA, R.; YAMANAKA, H.; SAKURAI, A.; SAKAKIBARA, M.; AISAKA, K. Purification, characterization, and potential applications of formate oxidase from *Debaryomyces vanriijiae* MH201. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, p. 805–812, 2007.

VALERO, E., MILLAN, C., ORTEGA, J. M. Influence of oxygen addition during growth phase on the biosynthesis of lipids in *Saccharomyces cerevisiae* (M(3)30-9) in enological fermentations. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.92, p.33-38, 2001.

VICENTE, G.; BAUTISTA, L.F.; RODRIGUEZ, R.; GUTIERREZ, F.J.; SADABA, I.; RUIZ-VAZQUEZ, R.M.; TORRES-MARTINEZ, S.; GARRE, V. Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. **Biochemical Engineering Journal**, v.48, p.22–27, 2009.

VILELA, E. S. D.; SGARBIERI, V. C.; ALVIM, I. D. Determinação do valor protéico de células íntegras, autolisado total e extrato de levedura (*Saccharomyces sp.*). **Revista Nutrição**, v.13, n. 3, p. 185- 192, 2000.

WANG, Z. X.; ZHUGE, J.; FANG, H.; PRIOR, B. A. Glycerol production by microbial fermentation: a review. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 201-223, 2001.

WANG, J.; ZHANG, B.; CHEN, S. Oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* mutants with a disrupted fatty acyl-CoA synthetase gene accumulate saturated fatty acid. **Process Biochemistry**, v.46, p. 1436–1441, 2011.

WYNN, J. P.; HAMID, A. A.; LI, Y.; RATLEDGE, C. Biochemical events leading to the diversion of carbon into storage lipids in the oleaginous fungi *Mucor circinelloides* and *Mortierella alpina*. **Microbiology**, v. 147, p. 2857-2864, 2001.

XU, J.; ZHAO, X.; WANG, W.; DU, W.; LIU, D. Microbial conversion of biodiesel byproduct glycerol to triacylglycerols by oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* and the individual effect of some impurities on lipid production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 65, p. 30-36, 2012.

XUE, F. Y.; GAO, B.; ZHU, Y. Q.; ZHANG, X.; FENG, W.; TAN, T. W. Pilot-scale production of microbial lipid using starch wastewater as raw material. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6092–6095, 2010.

YAN, Y.; LI, X.; WANG, G.; GUI, X.; LI, G.; SU, F.; WANG, X.; LIU, T. Biotechnological preparation of biodiesel and its high-valued derivatives: A review. **Applied Energy**, v.113 , p. 1614–1631, 2014.

YANG, F.; HANNA, M.A.; SUN, R. Value-added uses for crude glycerol—a byproduct of biodiesel production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, p. 1-10, 2012.

YEN, H. W.; ZHANG, Z. Y. Effects of dissolved oxygen level on cell growth and total lipid accumulation in the cultivation of *Rhodotorula glutinis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 112, p.71–74, 2011.

YEN, H. W.; YANG, Y. C. The effects of irradiation and microfiltration on the cells growing and total lipids production in the cultivation of *Rhodotorula glutinis*. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 539–541, 2012.

YONG, K. C.; OOI, T. L.; DZULKEFLY, K.; WAN-YUNUS, W. M. Z.; HAZIMAH, A. H. Refining of crude glycerin recovered from glycerol residue by simple vacuum distillation. **Journal of Oil Palm Research**, v. 13, p. 39-44, 2001.

YU, X.; ZHENG, Y.; DORGAN, K.M.; CHEN, S. Oil production by oleaginous yeasts using the hydrolysate from pretreatment of wheat straw with dilute sulfuric acid. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6134–6140, 2011.

ZANOTTO, S. P.; LISBÔA, L. U. S.; NASCIMENTO, M. G.; CAVALLAZZI, J. R. P.; MARTINS, M. K.; PEREIRA, J. O. Seleção de fungos isolados de plantas da região amazônica, fornecedores de lipases para biotransformações. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 2007. Curitiba: CIETEP, 2007.

ZHANG, Y.; RITTMANN, B.E.; WANG, J.; SHENG, Y., YU, J.; SHI, H.; QIAN, Y. High-carbohydrate wastewater treatment by IAL-CHS with immobilized *Candida tropicalis*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 857–863, 2005.

ZHANG, Z.; JI, H.; GONG, G.; ZHANG, X.; TAN, T. Synergistic effects of oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* and microalga *Chlorella vulgaris* for enhancement of biomass and lipid yields. **Bioresource Technology**, v.164, p. 93–99, 2014.

ZHAO, X.; KONG, X.; HUA, Y.; FENG, B.; ZHAO, Z. K. Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. **European Journal of Lipid Science and Technology** v. 110, p. 405–412, 2008.

ZHAO, C.; ZHANG, T.; LI, M.; CHI, Z. Single cell oil production from hydrolysates of inulin and extract of tubers of Jerusalem artichoke by *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. **Process Biochemistry**, v.45, p. 1121–1126, 2010.

ZHENG, Y.; CHI, Z.; AHRING, B.K.; CHEN, S. Oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* for biofuel production: ammonia's effect. **Biomass and Bioenergy**, v. 37 . p. 114-121, 2012.

ZHU, L.Y.; ZONG, M. H.; WU H. Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation. **Bioresource Technology** v. 99, p. 7881–7885, 2008.

ZHU, C.; CHEN, B.; FANG, B.; Pretreatment of raw glycerol with activated carbon for 1,3-propanediol production by *Clostridium butyricum*. **Food and Energy Security**, v. 13, p. 376–384, 2013.

APÊNDICES

Apêndice A – Curvas Padrão para as Leveduras Estudadas

Figura 1A: Curva padrão de biomassa das leveduras: (a) *Candida cylindracea* NRRL Y-17506, (b) *Cryptococcus curvatus* NRRL Y-1511, (c) *Lipomyces starkeyi* NRRL Y-11557, (d) *Rhodotorula glutinis* NRRL YB-252, (e) *Rhodotorula mucilaginosa* e (f) *Lipomyces lipofer* NRRL Y-11555.

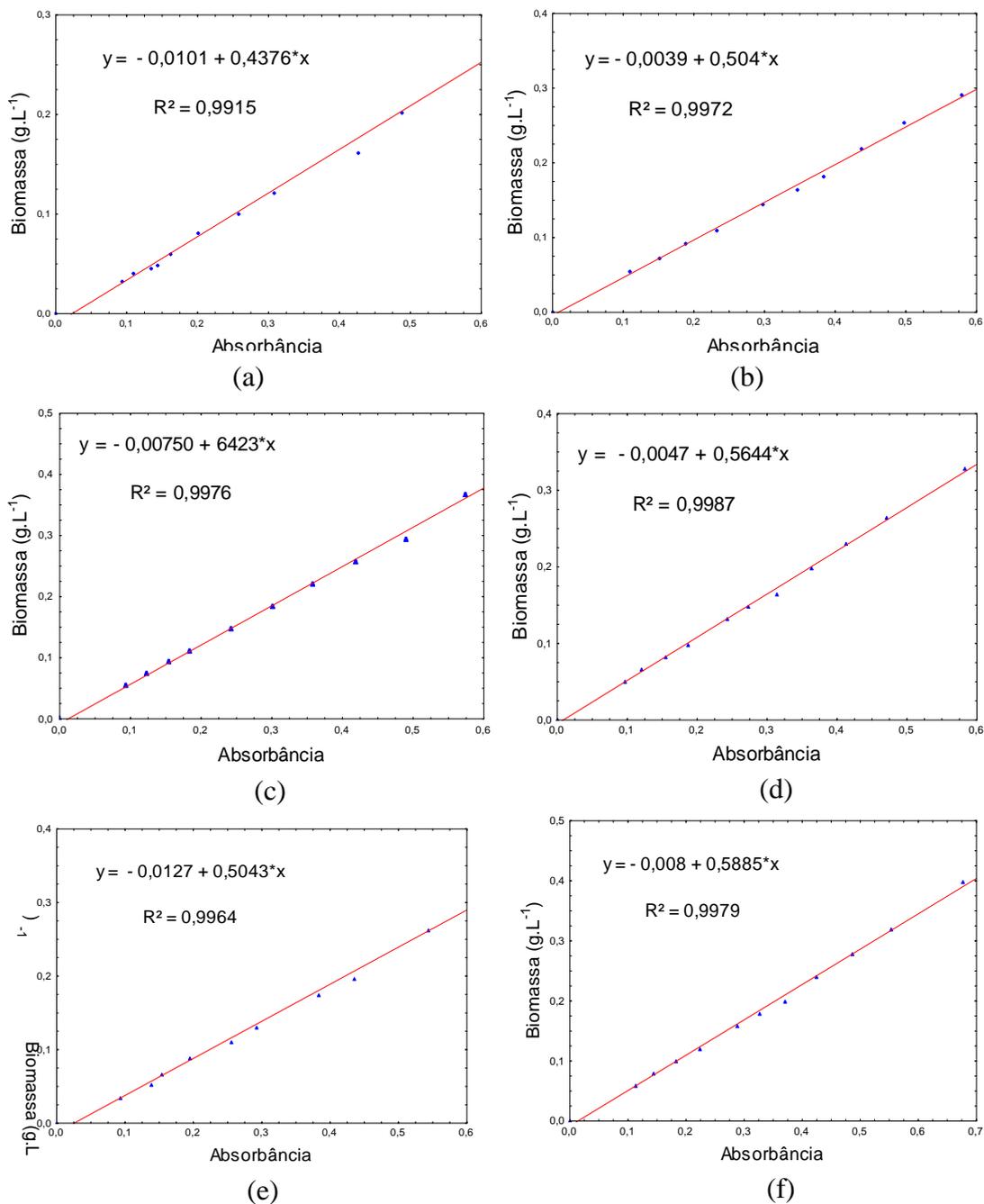
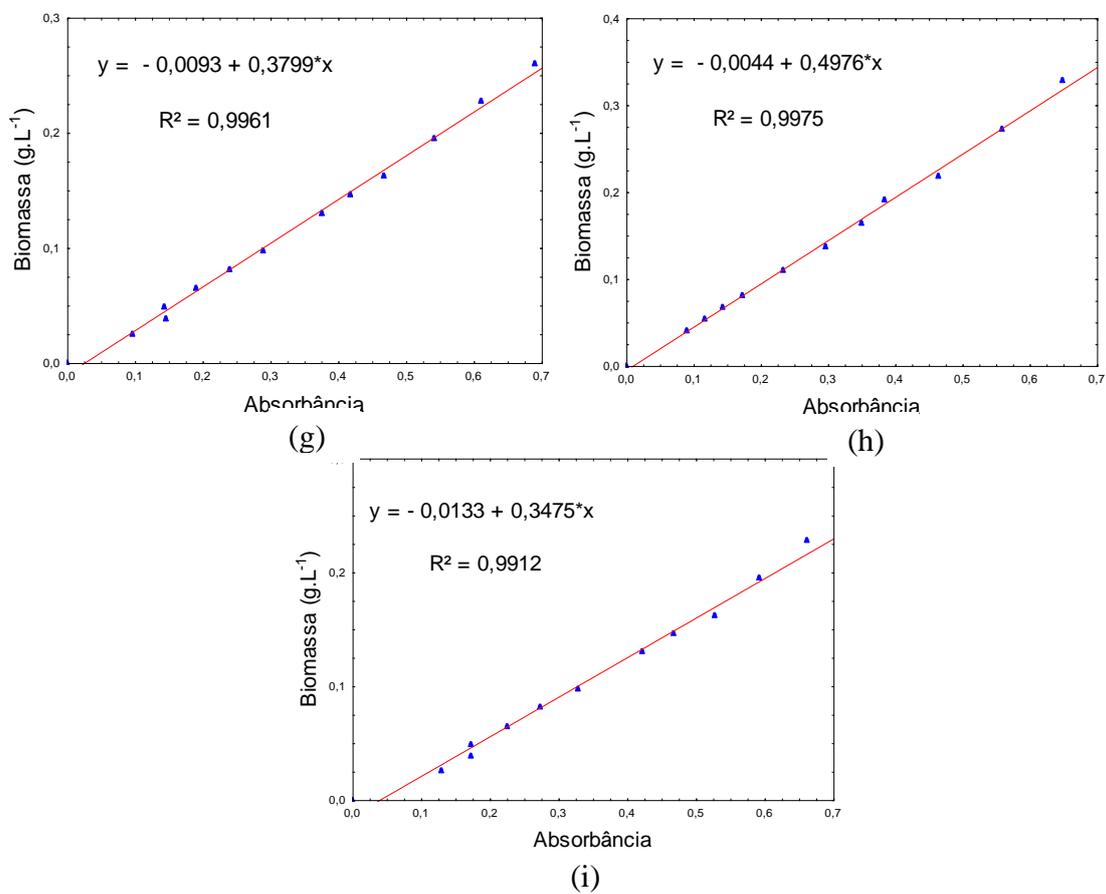


Figura 2A: Curva padrão de biomassa das leveduras: (g) *Schwanniomyces variijiae*, (h) *Cryptococcus humicola* e (i) *Meyerozyma guilliermondi*.



Apêndice B - Curvas de Crescimento Celular das Leveduras Oriundas de Banco de Cultura

Figura 1B - Crescimento celular da levedura *Lipomyces lipofer* NRRL Y-11555 e evolução de pH ao longo do cultivo em meio contendo glicerol bruto.

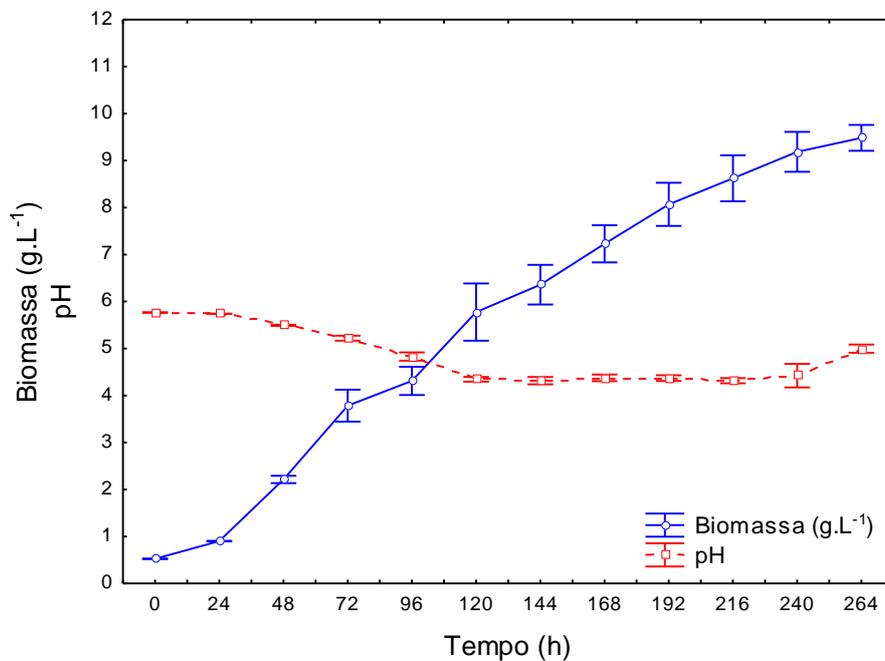


Figura 2B - Crescimento celular da levedura *Candida cylindracea* NRRL Y-17506 e evolução de pH ao longo do cultivo em meio contendo glicerol bruto.

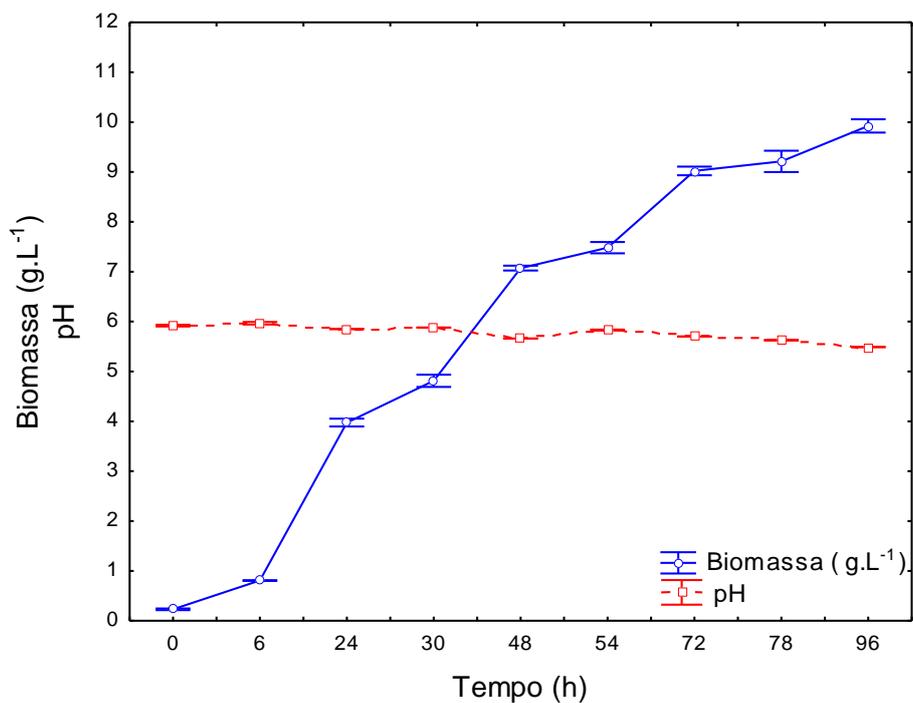


Figura 3B - Crescimento celular da levedura *Cryptococcus curvatus* NRRL Y-1511 e evolução de pH ao longo do cultivo em meio contendo glicerol bruto.

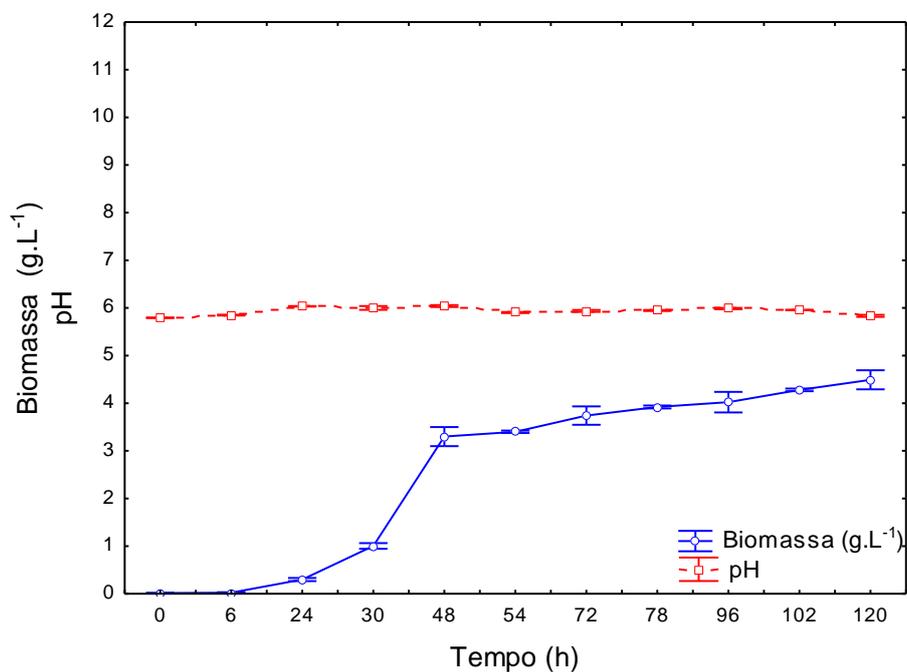


Figura 4B - Crescimento celular da levedura *Lipomyces starkeyi* NRRL Y-11557 e evolução de pH ao longo do cultivo em meio contendo glicerol bruto.

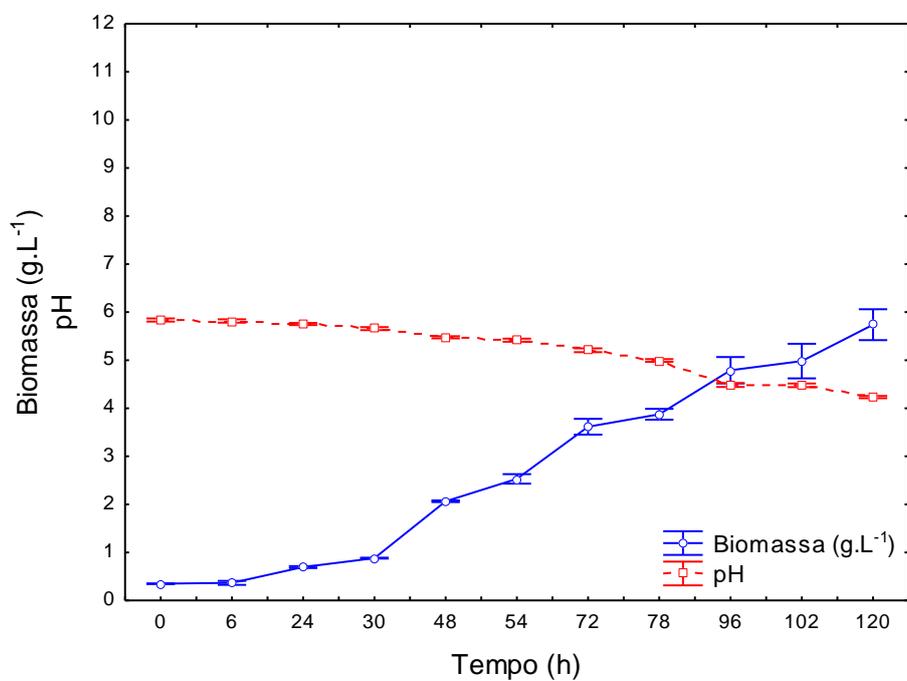
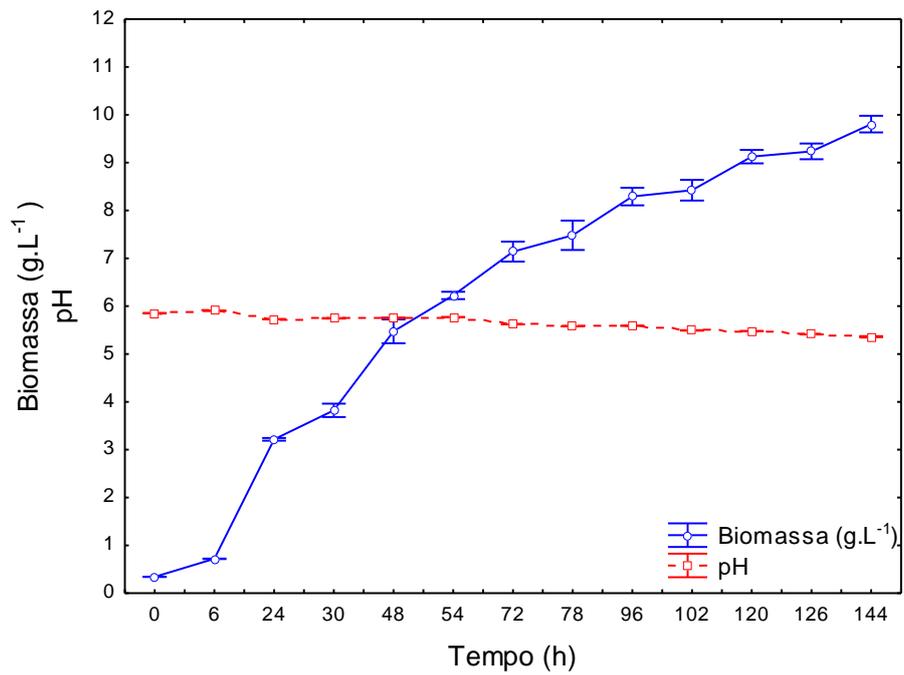


Figura 5B - Crescimento celular da levedura *Rhodotorula glutinis* NRRL YB-252 e evolução de pH ao longo do cultivo em meio contendo glicerol bruto.



Apêndice C – Perfil de Ácidos Graxos das Leveduras Estudadas

Tabela 1C - Perfil de ácidos graxos das leveduras pré-selecionadas e cultivadas em meio contendo glicerol bruto.

Ácido graxo	Teor relativo de ácidos graxos totais (%)							
	A	B	C	D	E	F	G	H
14:0	-	-	-	-	-	-	-	-
14:1	-	-	-	-	-	-	-	-
15:0	0,3	0,4	0,9	0,5	0,5	0,7	0,6	0,3
15:1	-	-	-	-	-	-	-	-
16:0	17,3	30,0	20,4	39,3	35,1	21,2	21,4	19,0
16:1	-	3,6	1,8	4,3	5,3	-	3,2	4,2
17:0	-	-	-	-	-	-	-	-
17:1	-	-	-	-	-	-	-	-
18:0	-	0,3	0,1	0,2	0,2	0,3	1,2	0,8
18:1n9	18,0	7,3	1,1	7,8	8,2	12,6	9,8	9,3
18:2n6	49,5	29,3	68,3	42,5	43,1	52,3	45,1	56,1
18:3n6	10,6	23,1	4,0	4,2	3,7	-	13,6	-
18:3n3	-	-	-	-	-	-	0,8	0,2
20:0	2,1	3,3	0,3	0,2	0,2	2,3	0,7	0,5
20:1n9	0,3	0,2	0,2	0,1	0,6	2,2	0,4	0,3
20:2	0,2	0,3	0,6	0,2	0,2	1,2	0,4	0,4
20:5n3	-	0,1	-	-	-	-	-	-
22:0	-	-	0,2	-	-	-	0,2	-
22:1n9	0,2	0,2	0,6	0,2	0,5	0,3	0,3	0,2
22:02	-	0,2	0,1	0,1	0,2	0,3	0,4	0,1
23:0	-	-	-	-	-	-	0,4	0,1
24:0	-	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1
22:6n3	1,7	1,9	0,8	0,1	1,7	1,6	0,8	1,2
24:1n9	-	0,1	0,5	0,3	0,3	-	0,3	0,5

A: *C. curvatus* NRRL Y-1511; B: *C. cylindracea* NRRL Y-1750; C: *R. glutinis* NRRL YB-252; D: *L. starkeyi* NRRL Y-11557; E: *L. lipofer* NRRL Y-11555; F: *C. humicola*; G: *S. varijiae*; H: *M. guilliermondii*.

Apêndice D – Cromatogramas Obtidos na Determinação do Perfil de Ácidos Graxos

Figura 1D. Cromatograma de ácidos graxos da fração de lipídios obtida da biomassa da levedura *Lipomyces lipofer* NRRL Y-11555 cultivada em meio contendo glicerol bruto.

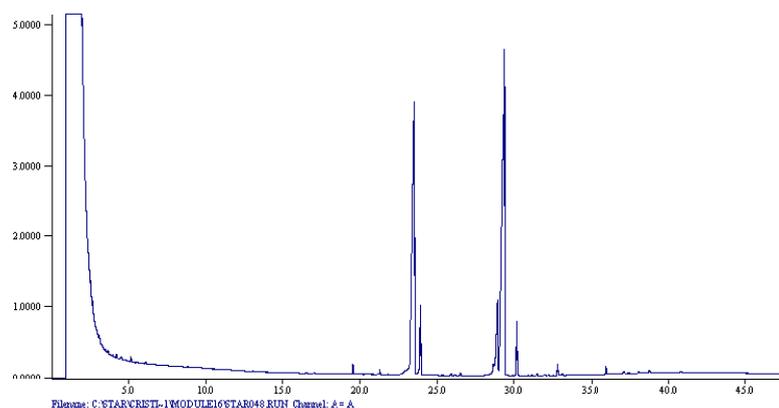


Figura 2D. Cromatograma de ácidos graxos da fração de lipídios obtida da biomassa da levedura *Candida cylindracea* NRRL Y-1750 cultivada em meio contendo glicerol bruto

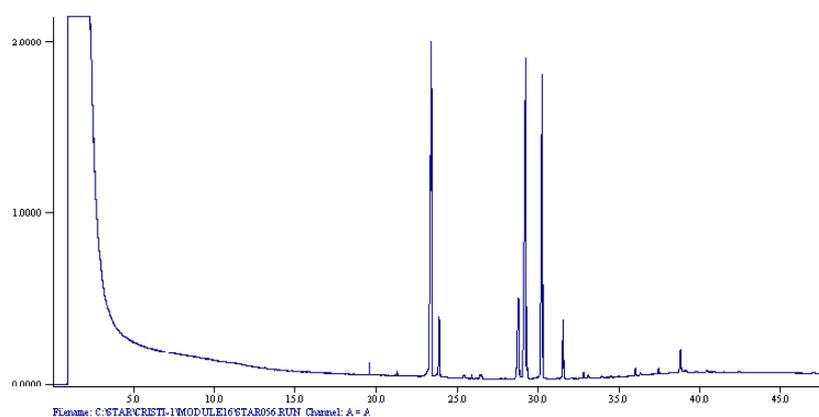


Figura 3D. Cromatograma de ácidos graxos da fração de lipídios obtida da biomassa da levedura *Cryptococcus curvatus* NRRL Y-1511 cultivada em meio contendo glicerol bruto.

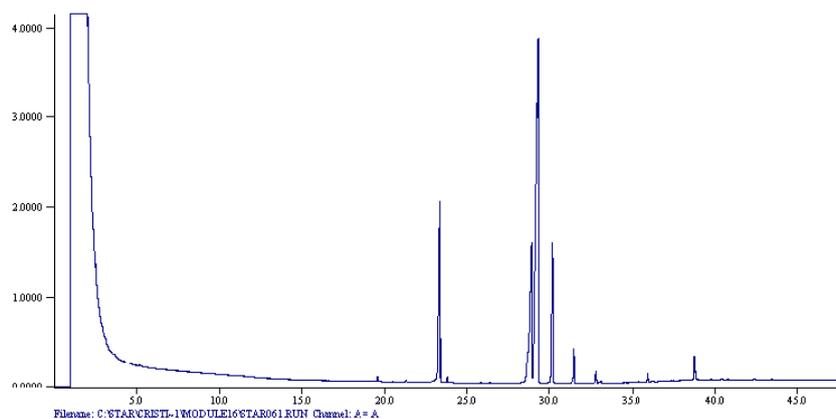


Figura 4D. Cromatograma de ácidos graxos da fração de lipídios obtida da biomassa da levedura *Lipomyces starkeyi* NRRL Y-11557 cultivada em meio contendo glicerol bruto

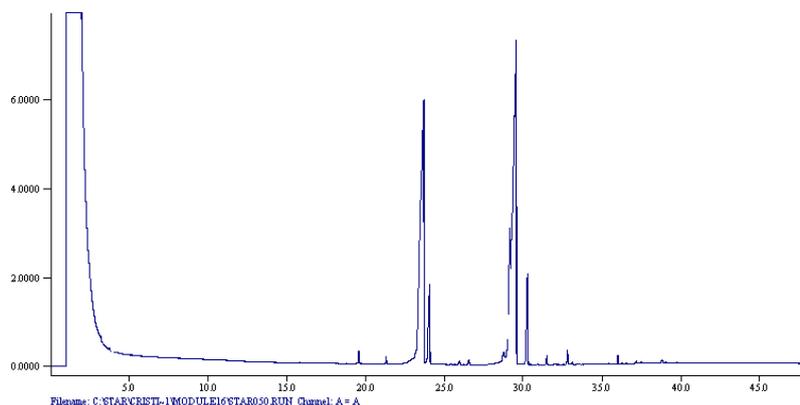


Figura 5D. Cromatograma de ácidos graxos da fração de lipídios obtida da biomassa da levedura *Rhodotorula glutinis* NRRL YB-252 cultivada em meio contendo glicerol bruto.

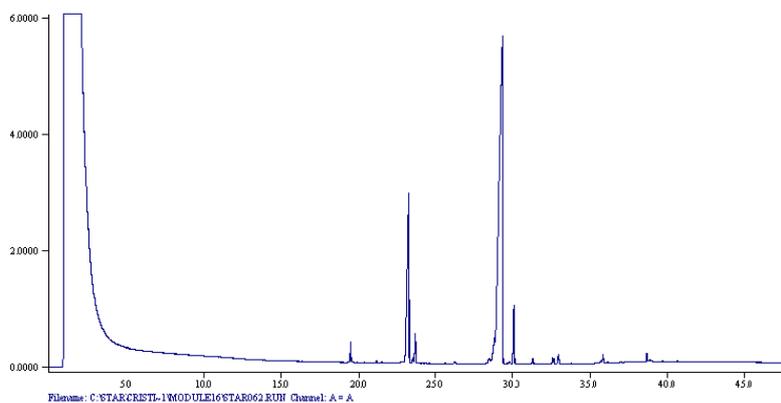


Figura 6D. Cromatograma de ácidos graxos da fração de lipídios obtida da biomassa da levedura *Cryptococcus humicola* cultivada em meio contendo glicerol bruto.

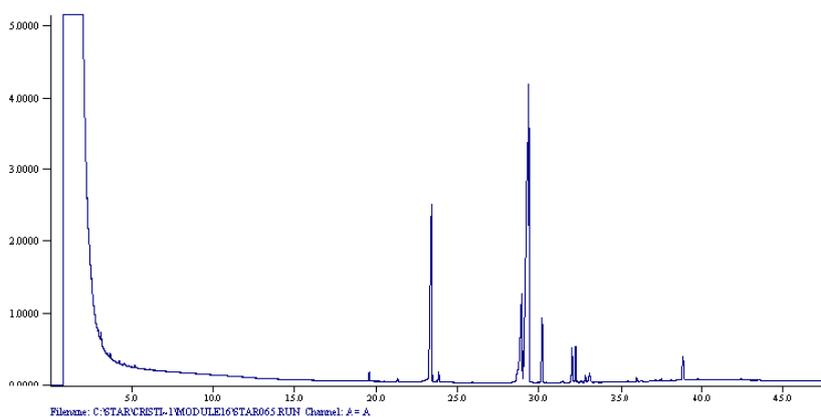


Figura 7D. Cromatograma de ácidos graxos da fração de lipídios obtida da biomassa da levedura *Schwanniomyces variijiae* cultivada em meio contendo glicerol bruto.

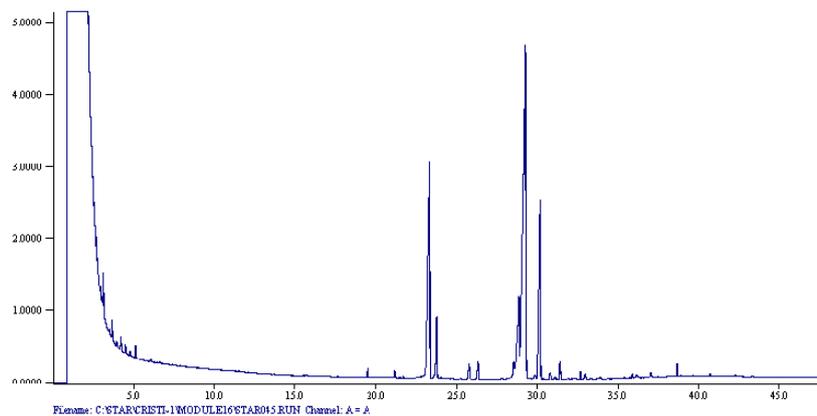
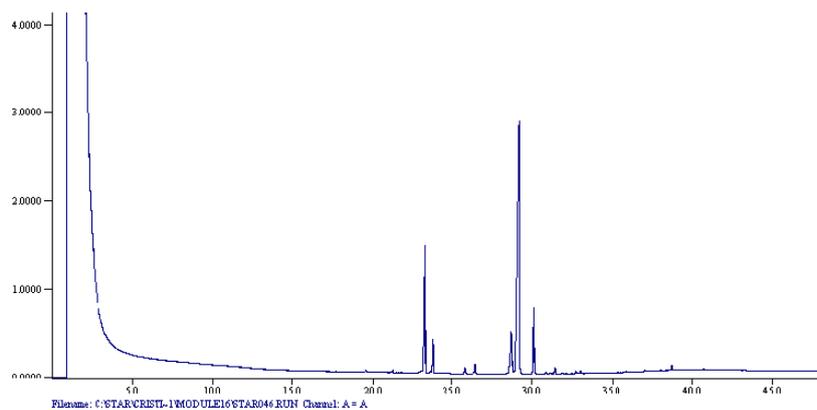


Figura 8D. Cromatograma de ácidos graxos da fração de lipídios obtida da biomassa da levedura *Meyerozyma guilliermondii* cultivada em meio contendo glicerol bruto.



Apêndice E – Acompanhamento do Crescimento Celular e pH nos Ensaio do Planejamento Plackett-Burman para *Rhodotorula mucilaginosa*

Figura 1E - Crescimento celular da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* ao longo dos cultivos do planejamento Plackett-Burmann.

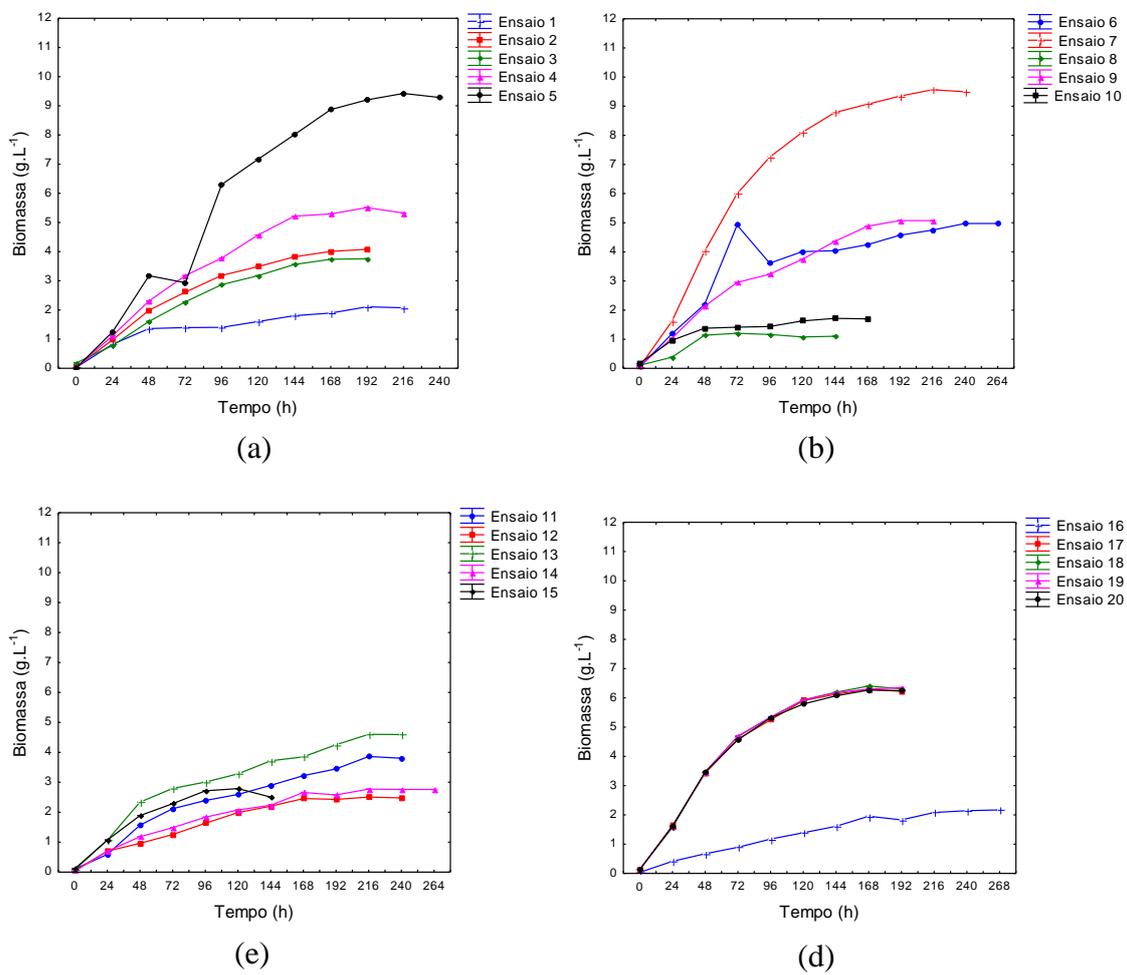
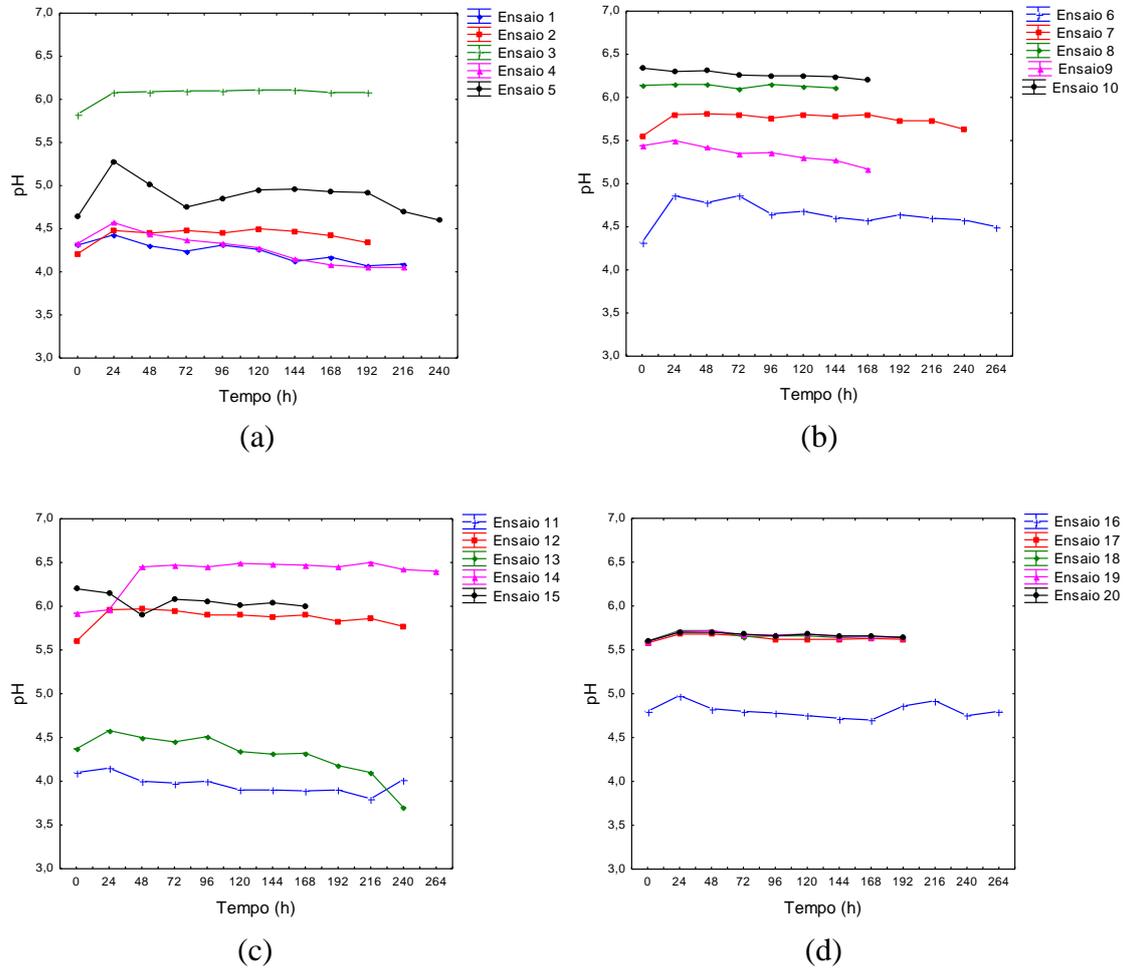


Figura 2E - Evolução do pH da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* ao longo dos cultivos do planejamento Plackett-Burmann.



Apêndice F – Perfil de Ácidos Graxos da Levedura *Rhodotorula mucilaginosa*

Tabela 1F - Perfil de ácidos graxos da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* ao longo de 240 h de cultivo.

Ácido graxo	Teor relativo de ácidos graxos totais (%)				
	48 h	96 h	144 h	192 h	240 h
14:0	1,6	1,6	0,9	0,9	0,9
14:1	-	-	-	-	-
15:0	-	0,4	0,2	-	-
15:1	-	-	-	-	-
16:0	22,8	26,0	24,9	25,6	23,7
16:1	0,7	1,4	1,6	1,5	1,6
17:0	0,3	0,3	0,3	-	-
17:1	-	-	-	-	-
18:0	0,7	0,2	0,7	0,3	0,2
18:1n9	8,7	5,1	3,9	4,7	4,4
18:2n6	39,0	43,3	46,7	49,0	52,0
18:3n6	6,2	5,7	5,8	6,3	5,6
18:3n3	6,6	6,9	6,4	6,7	6
20:0	0,5	0,5	0,6	0,3	0,2
20:1n9	5,7	3,2	3,3	2,8	3,8
20:2	0,4	0,4	0,3	0,3	0,2
20:5n3	0,4	0,3	0,3	-	-
22:0	1,0	0,7	0,7	0,5	1,0
22:1n9	0,6	0,5	0,4	0,3	0,1
22:02	0,8	0,9	1,0	-	-
23:0	0,4	0,4	0,2	-	-
24:0	0,9	0,5	0,6	0,2	-
22:6n3	1,7	1,3	0,8	0,4	0,4
24:1n9	1,0	0,4	0,3	0,2	-

Apêndice G- Identificação das Leveduras (BLASTn)

Identificação das Leveduras

A levedura FS II foi identificada como *Cryptococcus humicola*, através de placas de sequenciamento de DNA tendo como resultados do BLASTn:

[AF189836.1](#) *Cryptococcus humicola* strain CBS571 26S ribosomal RNA gene; partial sequence [gb |FJ534906.1|](#) *Asterotremella humicola* strain CBS 571 large subunit ribosomal RNA gene

Length= 625

Score = 889 bits (481)

Expect = 0.0

Identities = 551/579 (95%)

Gaps = 28/579 (5%)

TATCTGGACAGTCATATTCAGGACGTCCGAGTTAGTAATCTAATAGAAAGTGT
 TTTCCGTGCTGGACCATGTCCAAGTCCCTTGGAACAGGGTATCAAAGAGGG
 TGACAATCCCGTACTTGACATGACCACCAGTGCTCTGTGATACACTTTCTAC
 GAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAATGGGTGGTAAATTCCATCTA
 AAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAA
 GATGAAAAGCAACTTTGGAAAGAGAGTTAAACAAGTACGTGCAAATTGTTC
 GAAAGCGGAAACGATTGAAGTCCACGATCGTGTCATTGGACTCAGCCCGGT
 TTTCCGGGTGTATTTCCCTTTGAACGGGGTCAACATTCAGTTTTGGTCCGGT
 GGATCAACGAGGCAGGGAAGAAAGTGGCTCCCTCGGGAGTGTTATAGGCTT
 TCTGTACATACTGGAGGAGACTGAGGACTGCAGCTCGCCTTTTGGCCG
 GGGTTCGCCACGTTTCGAGCTTAGGATGTTGACATAATGGCTTTAAACGACC
 CGTCTTGAAACACGGGAA

A levedura S1 I foi identificada como *Meyerozyma guilliermondii* (nome atual de *Pichia guilliermondii*), através de placas de sequenciamento de DNA tendo como resultados do BLASTn:

[DQ655689.1](#) *Pichia guilliermondii* strain NRRL Y-27949 26S ribosomal RNA gene

Length= 581

Score = 1046 bits (566)

Expect = 0.0

Identities = 568/569 (99%)

Gaps = 0/569 (0%)

GGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATCGCCTTAGTAGCGGCGAGTGAAGCGG
 CAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGCCTTCGGTGTCCGAGTTGTAATTTGA
 AGATTGTAACCTTGGGGTTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGGACGTC
 ACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGCCCAATCCTATGTAAGGTGC
 TTTCTGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTC
 CATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGAT
 GGAAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTG
 TTGAAAGGGAAGGGTTTGAGATCAGACTCGATATTTTGTGAGCCTTGCCTTC
 GTGGCGGGGTGACCCGCAGCTTATCGGGCCAGCATCGGTTTGGGCGGTAGG
 ATAATGGCGTAGGAATGTGACTTTACTTCGGTGAAGTGTTATAGCCTGCGTT
 GATGCTGCCTGCCTAGACCGAGGACTGCGATTTTATCAAGGATGCTGGCAT
 AATGATCCCAAACCGCCCGTCTT

A levedura C1 I foi identificada como *Schwanniomyces variijae* (nome antigo, *Debaryomyces vanrijiae*), através de placas de sequenciamento de DNA tendo como resultados do BLASTn:

U45842.1|DVU45842 *Debaryomyces vanrijiae* var. *vanrijiae* 26S ribosomal RNA
 gene,

Length= 570

Score = 1053 bits (570)

Expect = 0.0

Identities = 570/570 (100%)

Gaps = 0/570 (0%)

AGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAG
 CGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCACCTTTGGTGTCCGAGTTGTAATT
 TGAAGAAGGTAACCTTTGGAGTTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGGAC
 GTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGCCCAATTCTATGTAAG
 TGCTTTCTGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAA
 ATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAG
 TGATGGAAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAA
 ATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGCAAGCTTTAC
 CTTTCGTGGTGGAGTCCCCTGCAGTTTACTGGGCCAGCATCGGTTTGGATGGT
 AGGATAATGACTTGGGAATGTGGCTTTGCTTCGGTAAAGTGTTATAGCCCTT
 GTTGATGCTACCTGTCTAGACCGAGGACTGCGTCTTTGACTAGGATGTTGGC
 ATAATGATCTTAAGTCGCCCGT

Apêndice H – Acompanhamento do Crescimento Celular e pH nos Ensaios do Planejamento Plackett-Burman para *Cryptococcus humicola*

Figura 1H - Crescimento celular da levedura *Cryptococcus humicola* ao longo dos cultivos do planejamento Plackett-Burmann.

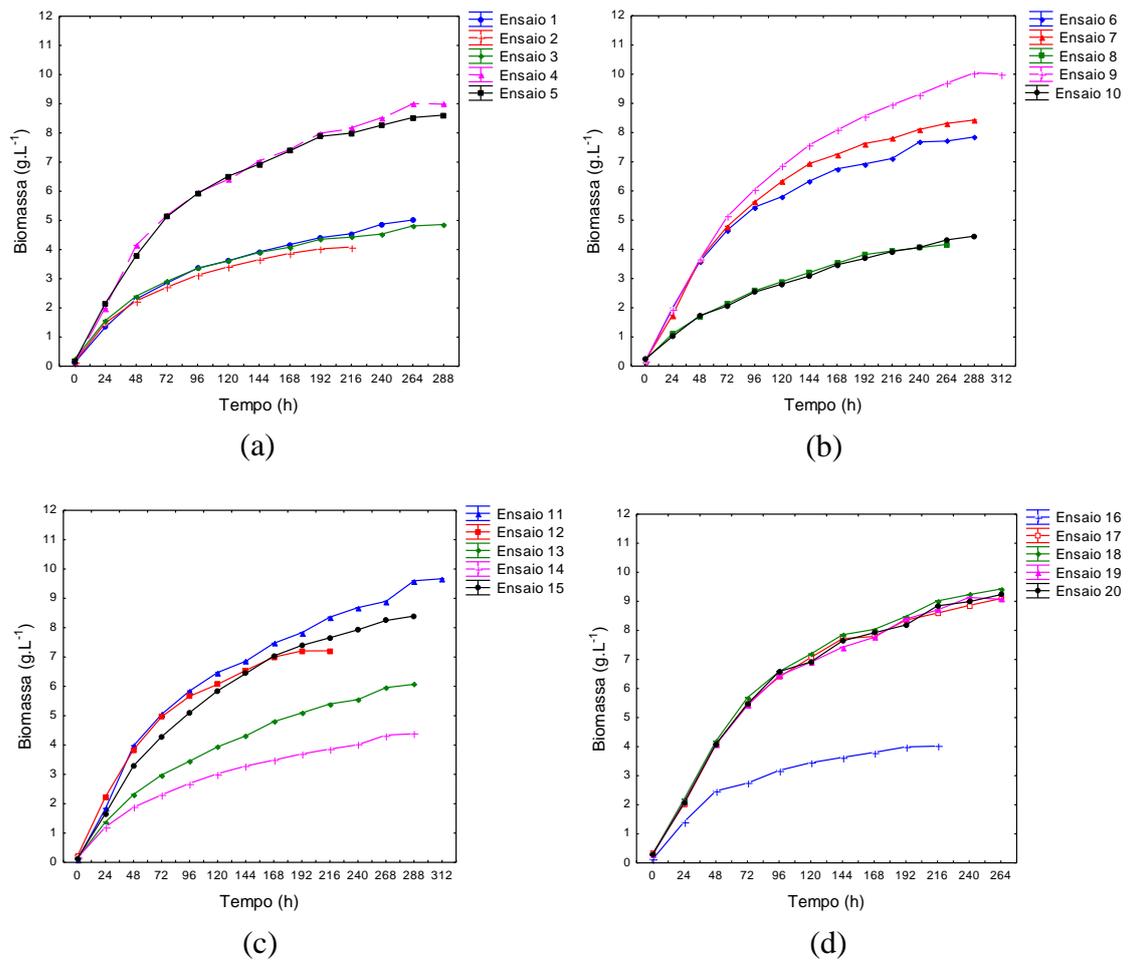
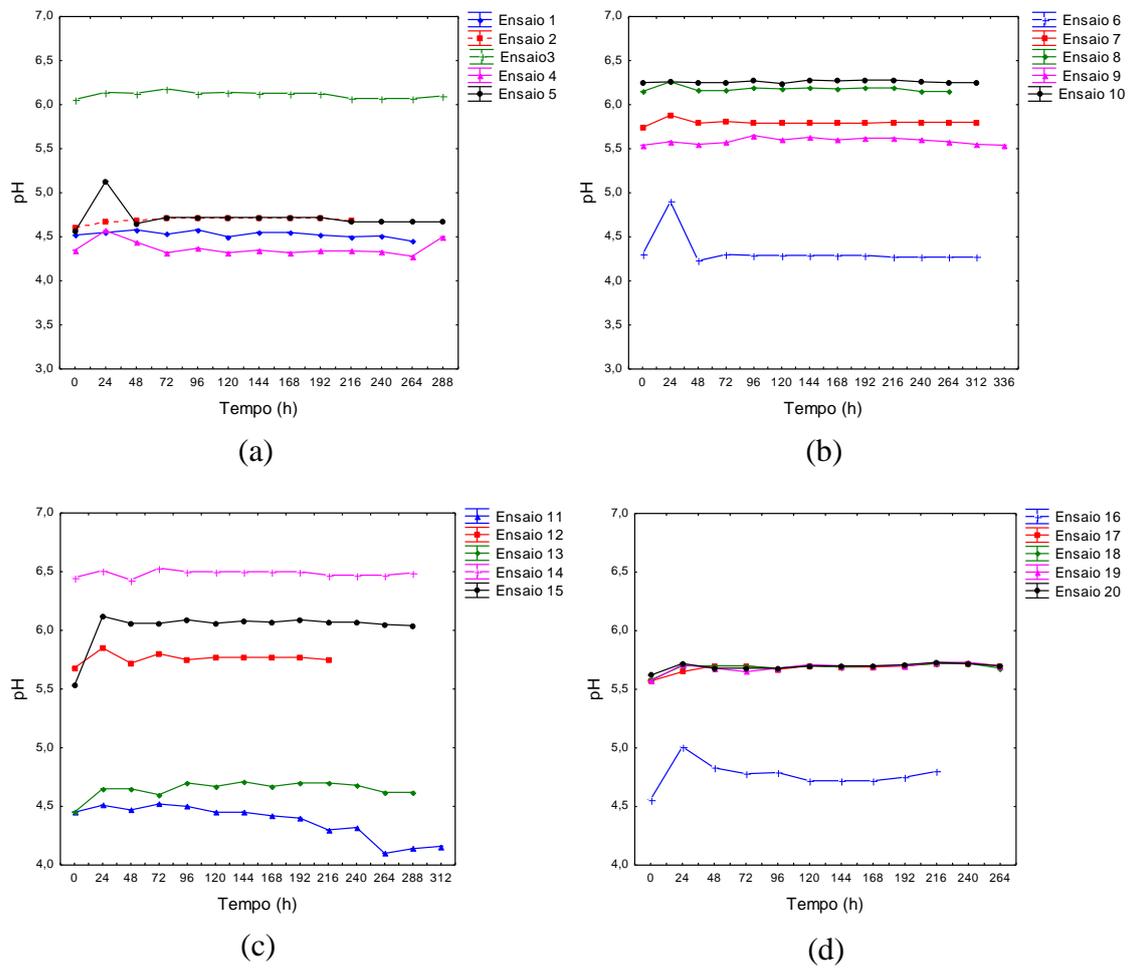
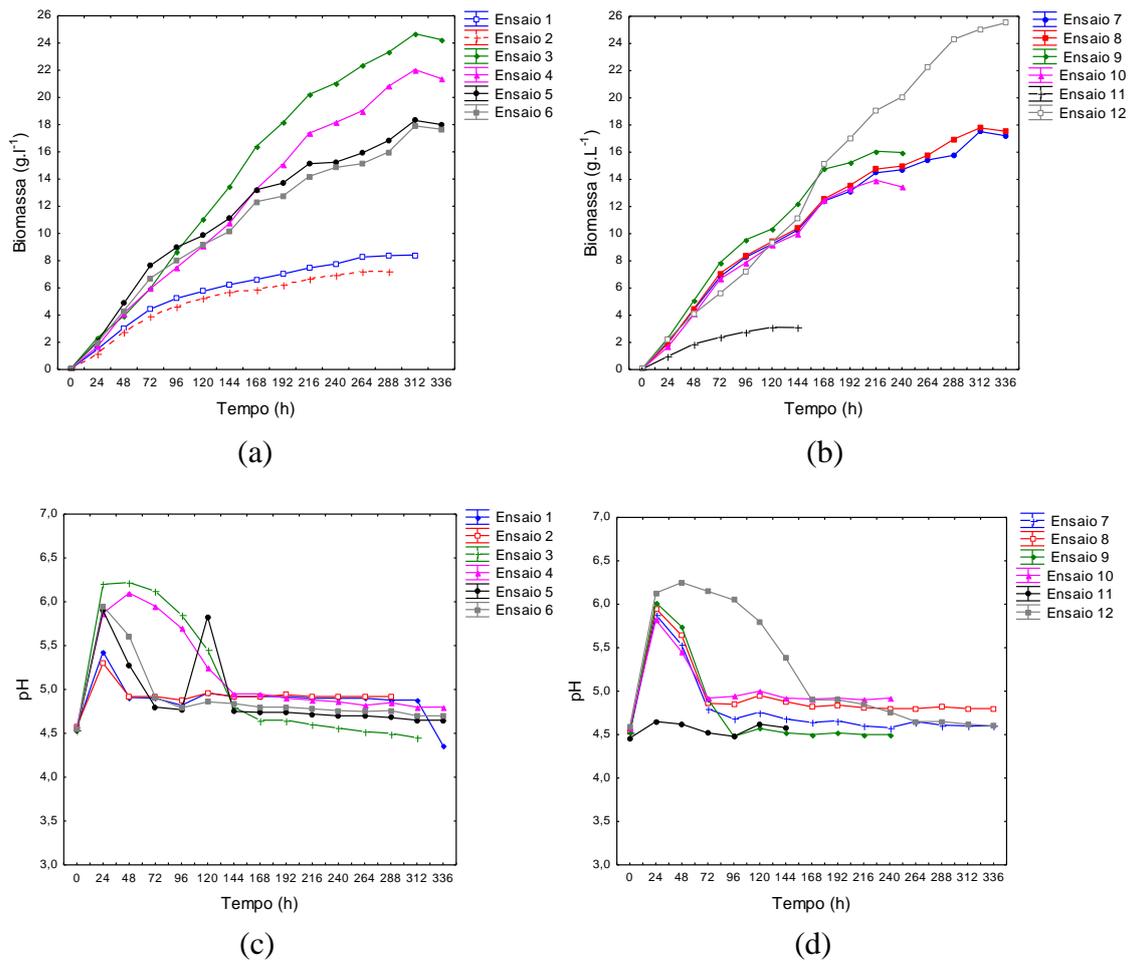


Figura 2H - Evolução do pH da levedura *Cryptococcus humicola* ao longo dos cultivos do planejamento Plackett-Burmann.



Apêndice I – Acompanhamento do Crescimento Celular e pH nos Ensaios do Delineamento Composto Central Rotacional para *Cryptococcus humicola*

Figura II - Crescimento celular e evolução do pH da levedura *Cryptococcus humicola* ao longo dos cultivos do delineamento composto central rotacional (DCCR).



ANEXOS



Laudo Analítico

Produto:

Glicerina Bruta

Data de carregamento:

Lote:

Produção

Item Analítico	Unidade	Resultado	Especificação	Métodos
Glicerol	% massa	82,49	mínimo 80	Official Monographs USP XXI
Cinzas	% massa	6,51	máximo 8,0	Official Monographs USP XXI
Cloreto de sódio	% massa	6,18	máximo 7,0	Mohr
Umidade	% massa	9,78	máximo 13,0	Karl Fisher
MONG	% massa	1,22	máximo 2,0	cálculo
pH	-	4,91	4,5 - 9,0	***

Origem do produto: 100% de origem vegetal - Óleo degomado de soja.

Larissa Garibotti

CRQ 05302605 - 5ª Região / CREA 10.4710

VERIFICADO
 Controle de Qualidade
B S B I O S

Passo Fundo, 05 de junho de 2009.

Controle de Qualidade - BSBIOS Indústria e Comércio de Biodiesel Sul Brasil S/A
 BR 285, km 174, s/nº - Distrito Industrial - Passo Fundo/RS - CEP99050-000 - (0x54)2103-7100 - www.bsbios.com

ANÁLISE: Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio

AMOSTRA: Extrato de levedura e Glicerol

RESPONSÁVEL: Profa. Mônica Wallner-Kersanach/Lab. de Hidroquímica/Instituto de Oceanografia

EQUIPAMENTO: Analisador elementar CHNS/O, Modelo 2400 Serie II da Perkin Elmer; a calibração do equipamento foi realizada utilizando o Material de Referência Certificado Acetanilida.

RESULTADO DAS AMOSTRAS:

AMOSTRA	% C	% H	% N
Extrato de levedura	39,27	6,37	10,80
Glicerol*	43,69	3,13	0,13

*Analisado em base à massa de 30 μ L de amostra.

Resultado da Acetanilida (Material de Referência Certificado):

A acetanilida também foi analisada como amostra, como controle de qualidade das análises. Os resultados de recuperação da acetanilida (n=3) lida como amostra foi de:

Acetanilida	% C	% H	% N
Valor certificado	71,09	6,71	10,36
Valores analisados	71,33	6,75	10,45
	71,24	6,84	10,47
	71,35	6,82	10,42