



GÉSSYCA PAULA DE ALVARENGA SOARES

**AVALIAÇÃO DE LEVEDURAS PARA
PRODUÇÃO DE γ -DECALACTONA**

**LAVRAS – MG
2014**

GÉSSYCA PAULA DE ALVARENGA SOARES

**AVALIAÇÃO DE LEVEDURAS PARA PRODUÇÃO DE
 γ -DECALACTONA**

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

Orientador

Dr. Disney Ribeiro Dias

Coorientadora

~~Dr. Rosane~~ Rosane Freitas Schwan

**LAVRAS – MG
2014**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Soares, Géssyca Paula de Alvarenga.

Avaliação de leveduras para produção de γ -decalactona /
Géssyca Paula de Alvarenga Soares. – Lavras : UFLA, 2014.
77 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.
Orientador: Disney Ribeiro Dias.
Bibliografia.

1. Aroma. 2. Microrganismos. 3. Biotransformação. 4. Glicerol
bruto. 5. Óleo de rícino. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD – 589.233

GÉSSYCA PAULA DE ALVARENGA SOARES

**AVALIAÇÃO DE LEVEDURAS PARA PRODUÇÃO DE
 γ -DECALACTONA**

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

Aprovada em 29 de Julho de 2014

Dra. Rosane Freitas Schwan UFLA

Dr. Cledir Rodrigues dos Santos Universidade do Minho

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli UFLA


Dr. Disney Ribeiro Dias

Orientador

**LAVRAS – MG
2014**

Aos meus pais, Vicente e Kátia;

A minha irmã, Bruna;

E ao meu marido Paulo...

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado força para caminhar; paciência para esperar; sabedoria para agir; destreza para entender; palavras para confortar; esperança para não desistir; amor para compreender e acima de tudo fé para eu acreditar nesse sonho. Ele foi, é e sempre será meu guia e minha luz. A Ele toda honra e toda glória para sempre. Amém.

À minha família, pelas orações, pelo sofrimento cada vez que me viam chorar querendo ir embora pra casa, mas ao mesmo tempo pelo incentivo e palavras positivas dizendo que faltava pouco: “Não desiste”, “Você merece”, “Vai dar certo”... rrsrrs, meu refúgio, meu amparo. Nas horas de angústias sempre me ouviam, e rapidamente me faziam esquecer-las, devolvendo-me o sorriso e a alegria num instante.

Aos meus pais e minha irmã, por levantar minha autoestima me considerando como um exemplo, um troféu!

Ao meu marido Paulo, por tudo que faz por mim, por realizar minhas vontades, fazer comida gostosa, cuidar de mim, escutar assuntos científicos mesmo sem entender nada, pela confiança, paciência e saudade durante todo o tempo morando longe um do outro.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Biologia, pela credibilidade e conceito que oferecem.

Ao meu orientador Prof. Dr. Disney Ribeiro Dias, pela orientação, confiança, paciência e ensinamentos. Uma pessoa admirável, educadíssima, inteligente, compreensivo, amigo e do bem. Aprendi e cresci muito com o senhor.

A todos os professores Doutores, pelos valiosos ensinamentos e aprendizagem, não só na teoria e prática microbiológica, mas também na vida pessoal onde crescemos muito. Por todo apoio e paciência.

À Rose e à Cidinha, por serem minhas psicólogas de plantão, sempre deixando um divã reservado para mim!

A CAPES, pela bolsa de estudos.

Às minhas duas melhores amigas D^a Maria e Juliana Costa, pelo amor, amizade, carinho, companhia, almoços e cafés maravilhosos.

A todos os amigos da minha turma em especial Luciana, Verônica, Sirlei, Natálie e Kaliane.

Às minhas irmãs poções Alenir, Angélica, Karla, Monique e Dayana por me receberem de braços abertos, sempre me auxiliando nos afazeres do laboratório.

Aos meus amigos mais “adiantados” Suzana, Cíntia, Andréia, Mariana Dias, Igor, Ana Luiza, Kelly por todo carinho, paciência e suporte perante as dificuldades.

Aos amigos mais novos também Jorge, Tamara, Juliana, Nádia, Letícia e Roberta.

Aos meus eternos e fiéis companheiros do UNIFOR-MG, Prof. Ms. Pascoal, Prof. Dr. Lília, Prof. Anísio, Prof. Dr. Juraci, Prof. Ms. Camila, Ana Paula, Jordana, Lucas e Dayana.

A nova família que ganhei em Lavras, vinda de Varginha, Thayane, Meire, Paulo, Thomas e Thalles, pelas brincadeiras, lanches, cuidados e carinho.

Enfim, a todos que torceram por essa conquista...

... Muito Obrigada!

“Mas os que esperam no Senhor renovarão as forças, subirão com asas como águias; correrão, e não se cansarão; caminharão, e não se fatigarão”

Isaías 40:31

RESUMO

Os compostos aromatizantes estão presentes em muitos produtos industriais que conferem sabor e aroma, sendo a maioria destes obtidos pela síntese química ou extraídos de plantas. Esses processos, entretanto, apresentam algumas desvantagens como misturas racêmicas, maior número de etapas, problemas geográficos, baixo rendimento e alto custo. Tais desvantagens, associadas à nova tendência dos consumidores por produtos naturais, fazem com que a fermentação microbiana seja considerada meio alternativo e potencial para a obtenção destes compostos. Microrganismos como as leveduras têm sido descritos por produzirem vários compostos aromatizantes, entre eles γ -decalactona, através do seu metabolismo secundário. Lactonas como a γ -decalactona são amplamente empregadas em alimentos, bebidas, cosméticos e fármacos por possuírem aroma frutado de pêssego muito característico. Esta pode ser obtida através da biotransformação do ácido ricinoleico pela via da β -oxidação peroxisomal das leveduras. Nesse contexto, alguns estudos têm sido realizados com a *Yarrowia lipolytica*. O grande desafio da biotecnologia da produção de aromas é identificar formas economicamente viáveis para aplicação nas indústrias. Para que a produção microbiana seja competitiva é necessário que o custo de produção seja baixo e o rendimento do produto alto. Com isso, o objetivo deste trabalho foi buscar substratos alternativos como o glicerol bruto e também avaliar o potencial de novos gêneros de levedura, como a *Lindnera*, para maior produção de γ -decalactona e menor custo do processo. Além disso, obter produtos de alto valor agregado e reduzir problema ambiental. Duas leveduras (*Yarrowia lipolytica* UFLA CM-Y9.4 e *Lindnera saturnus* UFLA CES-Y677) foram testadas em diferentes concentrações (10, 20 e 30%) de dois substratos (óleo de rícino e glicerol bruto) para produção de γ -decalactona. Foram avaliados a viabilidade celular, pH, produção de γ -decalactona e consumo de glicerol. Observou-se interação entre os parâmetros analisados. O máximo de γ -decalactona (3 g/L) produzido a partir da biotransformação do óleo de rícino foi pela *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9.4 nas concentrações de 10 e 20%. Quando a fonte de carbono foi o glicerol bruto, o valor máximo alcançado foi de 5 g/L de γ -decalactona pelas leveduras *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9.4 e *L. saturnus* UFLA CES-Y677, nas concentrações de 10 e 20% respectivamente, sendo que *L. saturnus* UFLA CES-Y677 apresentou, de modo geral, maior produção. Observou-se que o glicerol bruto é substrato alternativo para a produção de γ -decalactona, apresentando melhores resultados em relação ao óleo de rícino, e que a nova espécie *L. saturnus* UFLA CES-Y677 tem elevado potencial para maior produção de γ -decalactona a partir do glicerol bruto, diminuindo o custo do processo e reduzindo um problema ambiental.

Palavras-chave: Aroma. Microrganismos. Biotransformação. Glicerol bruto. Óleo de rícino.

ABSTRACT

The aromatic compounds are present in many industrial products which confer flavor and aroma, whereas most of these are produced by chemical synthesis or extraction from plants. These processes, however, have some disadvantages such as racemic mixtures, more stages, geographical problems, low yield and high cost. Such disadvantages associated with the new trend of consumers for natural products, causes the microbial fermentation to be considered an alternative and potential way to produce these compounds. Microorganisms as yeasts have been described due to production of several aromatic compounds, including γ -decalactone, through its secondary metabolism. Lactones such as γ -decalactone are widely used in foods, beverages, cosmetics and pharmaceuticals due to the aroma peach fruity very characteristic. This can be obtained by biotransformation of ricinoleic acid via β -oxidation peroximal of yeast. In this context, numerous studies have described the *Yarrowia lipolytica*. The main challenge of biotechnology in the production of flavorings is to identify economically viable forms for application in industries. In order to have a competitive microbial production it is necessary a low production cost and high yield of the product. Therefore, the aims of this work were to seek alternative substrates as crude glycerol and also assess the potential of new genres like *Lindnera* for higher production of γ -decalactone and lower process cost. Moreover, to obtain products with high added value and to reduce environmental problem. Two yeasts (*Yarrowia lipolytica* UFLA CM-Y9.4 and *Lindnera saturnus* UFLA CES-Y677) were tested at different concentrations (10, 20 and 30%) of two substrates (castor oil and crude glycerol) for the production of γ -decalactone. It was evaluated cell viability, pH, of γ -decalactone production and consumption of crude glycerol. It was observed interaction between the analyzed parameters. The maximum of γ -decalactone (3 g/L) produced from the biotransformation of castor oil was by UFLA *Y. lipolytica* CM-Y9.4 in concentrations of 10 and 20%. When the carbon source was crude glycerol, the maximum value achieved was 5 g/L of γ - decalactone by the yeasts *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9.4 and *L. saturnus* UFLA CES-Y677 in the concentrations of 10 and 20 % crude glycerol respectively, where the *L. saturnus* UFLA CES-Y677 showed higher production generally. It was observed that the crude glycerol is an alternative substrate for the production of γ -decalactone showing better results compared to castor oil, and that new specie *L. saturnus* UFLA CES-Y677 has high potential for higher production of γ -decalactone from crude glycerol, decreasing the cost of the process and solving an environmental problem.

Keywords: Aroma. Microorganisms. Biotransformation. Crude glycerol. Castor oil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Biotransformação do ácido ricinoleico em γ -decalactona (PINHEIRO, 2004).....	23
Figura 2	Bioconversão do ácido ricinoleico em γ -decalactona por <i>Yarrowia lipolytica</i> (SCHRADER et al., 2004).....	28
Figura 3	Reações e enzimas envolvidas na β -oxidação peroxisomal (WACHÉ et al., 1998).....	29
Figura 4	Molécula do triacilglicerol do ácido ricinoleico (AZEVEDO et al., 2009).....	31
Figura 5	Fórmula estrutural do glicerol (DUARTE, 2011).	33
Figura 6	Curvas de crescimento da <i>Lindnera saturnus</i> UFLA CES-Y677 e da <i>Yarrowia lipolytica</i> UFLA CM-Y9.4 obtidas a partir da densidade óptica (600 nm) ao longo de 48 horas de cultivo.....	75

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Análise da viabilidade celular (cél/mL) das leveduras *L. saturnus* UFLA CES-Y677 e *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9.4 cultivadas em diferentes concentrações (10, 20 e 30%) de óleo de rícino e glicerol bruto no tempo inicial e final (120 horas) 42
- Tabela 2 Análise do pH final (120 horas) das leveduras *L. saturnus* UFLA CES-Y677 e *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9.4 cultivadas em diferentes concentrações (10, 20 e 30%) de óleo de rícino e glicerol bruto 45
- Tabela 3 Produção de γ -decalactona (g/L) por *L. saturnus* UFLA CES-Y677 e *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9.4 cultivadas em diferentes concentrações (10, 20 e 30%) de óleo de rícino e glicerol bruto 49
- Tabela 4 Consumo de glicerol bruto (g/L) pelas leveduras *L. saturnus* UFLA CES-Y677 e *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9.4 após 120 horas de cultivo em diferentes concentrações 10, 20 e 30%. 57

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Metabólitos microbianos na indústria	16
2.2	Aromas microbianos	18
2.3	γ- Decalactona	22
2.3.1	Via de produção de γ-decalactona: β-oxidação peroxisomal	27
4.4	Óleo de rícino	31
4.5	Glicerol	33
3	MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1	Leveduras e Substratos	37
3.1.1	Meio, condições de cultivo e preparo do inóculo	37
3.1.2	Biotransformação	38
3.2	Métodos analíticos	38
3.2.1	Contagem de células viáveis	38
3.2.2	Análise de pH	39
3.2.3	Avaliação da produção de γ-decalactona	39
3.2.4	Consumo de glicerol	40
3.3	Delineamento experimental e análises estatísticas	41
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1	Análise da viabilidade celular inicial e final no processo de biotransformação	42
4.2	Análise do pH (inicial e final)	44
4.3	Análise da produção de γ-decalactona	49
4.4	Análise do consumo de glicerol	57
5	CONCLUSÃO	61
	APÊNDICE	74

1 INTRODUÇÃO

Os compostos aromatizantes são essenciais para as indústrias de alimentos, cosméticos, farmacêuticas e químicas, sendo a maioria destes compostos produzida através de síntese química ou extração a partir de vegetais. Porém, a utilização desses métodos apresenta alguns problemas. A síntese química, além de requerer várias etapas, pode gerar misturas racêmicas indesejáveis. Já os aromas naturais obtidos a partir de plantas enfrentam problemas quanto ao baixo rendimento e alto custo. A nova tendência dos consumidores por produtos que sejam naturais, também vem sendo preocupação quanto ao uso dos dois processos previamente citados, levando a estudos para obtenção de aromas a partir do metabolismo microbiano (JANSSENS et al., 1992; CHEETHAM, 1997; PINHEIRO; BELO; MOTA, 2002; SCHRADER et al., 2004; LONGO; SANROMÁN, 2006).

A fim de contornar esses problemas a utilização de métodos biotecnológicos para a síntese de aromas e sabores, baseado em processos de fermentação microbiana surgem como alternativa potencial e viável.

Vários compostos aromatizantes foram identificados como sendo produzidos por microrganismos, incluindo leveduras, através de seu metabolismo secundário (LEE; LIN; CHOU, 1995).

Alguns fungos, em particular, possuem diversidade metabólica, como a síntese *de novo* ou biotransformação, onde catalisam conversões específicas de precursores adicionados ou intermediários, e ainda possibilitam a obtenção de vários compostos voláteis com aplicação industrial, como, por exemplo, a γ -decalactona (NETO; PASTORE; MACEDO, 2004; SCHRADER et al., 2004).

Lactonas como a γ -decalactona são amplamente empregadas em alimentos, bebidas, cosméticos e fármacos por possuírem aroma frutado de pêssago muito característico, sendo de grande interesse para indústria sua

produção biotecnológica (JANSSENS et al., 1992; KRZYCZKOWSKA, 2012; ALCHIHAB et al., 2009; ROMERO-GUIDO et al., 2011).

Nesse contexto, a produção microbiana de γ -decalactona utiliza na sua maioria o ácido ricinoleico (ácido 12-hidroxi-octadec-9-enoico) como substrato, um ácido graxo hidroxilado (C_{18}) que, na forma esterificada, é o maior constituinte (cerca de 80%) do óleo de rícino (ou óleo de mamona). A γ -decalactona pode ser obtida através da biotransformação desse ácido hidroxilado pela via da β -oxidação peroxisomal (sistema de oxidação cíclica de ácidos graxos) por diversas espécies de microrganismos, principalmente por leveduras. O processo envolve a biodegradação do substrato formando o ácido 4-hidroxi-decanóico, o qual cicliza (lactoniza) formando a γ -decalactona (BLIN-PERRIN et al., 2000; PUTHLI; RATHOD; PANDIT, 2006; WACHÉ et al., 2000, 2001, 2003, 2006; GOMES; TEIXEIRA; BELO, 2010, 2011, 2012).

Apesar de vários microrganismos serem capazes de produzir lactonas, os processos que envolvem a levedura *Yarrowia lipolytica* têm sido relatados como os que obtêm maiores concentrações de produto (WACHÉ et al., 2001). Vários trabalhos são realizados com essa levedura para a produção do composto γ -decalactona (ZINJARDE, 2014; MORADI; ASADOLLAHI; NAHVI, 2013; GOMES et al., 2013; BRAGA; BELO, 2013; KRZYCZKOWSKA, 2012).

Lindnera saturnus é uma espécie de levedura recentemente descrita, e por esse motivo poucos são os trabalhos publicados com ela. No entanto, os estudos com essa espécie estão direcionados para os processos de biotransformação com a formação de aromas (YILMAZTEKIN; TAY, 2013).

Uma alternativa biotecnológica que também se destaca é a bioconversão do glicerol bruto utilizando microrganismos que são capazes de metabolizá-lo através do processo fermentativo, podendo assim obter produtos de alto valor agregado e reduzir seu impacto ambiental (SILVA; MACK; CONTIERO, 2009; RYWINSKA et al., 2013).

Com isso, o objetivo do trabalho foi avaliar a produção de γ -decalactona pelas leveduras *Yarrowia lipolytica* UFLA CM-Y9.4 e *Lindnera saturnus* UFLA CES-Y677, através da bioconversão do óleo de rícino e do glicerol bruto. Analisando a viabilidade celular das leveduras, o pH inicial e final do meio de biotransformação e o consumo do glicerol bruto em diferentes concentrações pelas leveduras.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Metabólitos microbianos na indústria

A microbiologia industrial utiliza microrganismos para a síntese de produtos comerciais ou para a realização de importantes transformações bioquímicas. Microrganismos com aplicações industriais são capazes de sintetizar produtos em altos níveis, sendo os fungos (leveduriformes e filamentosos) os principais. Existem dois tipos de metabólitos microbianos: primário e secundário. O metabólito primário é sintetizado durante a fase exponencial de crescimento do microrganismo, enquanto que o metabólito secundário é sintetizado próximo ao final da fase de crescimento ou na fase estacionária (MADIGAN et al., 2012).

Durante séculos, estes metabólitos foram usados na medicina tradicional devido às suas extensas atividades biológicas. Hoje, os metabólitos secundários produzidos pelos microrganismos constituem importante classe de compostos altamente valiosos com amplo espectro de aplicações nas indústrias, como medicamentos, agroquímicos, biocombustíveis, cosméticos e aditivos alimentares como, por exemplo, os compostos voláteis (NGUYEN et al., 2012).

Uma vez que as reações bioquímicas necessárias para sintetizar nova célula e o conhecimento do metabolismo primário já foram elucidadas, o interesse agora é descobrir através do metabolismo secundário, novos compostos, onde muitos microrganismos possuem a capacidade de produzi-los. Sendo assim, a avaliação do microrganismo produtor e o teste de seleção empregado são os principais fatores que determinam a eficácia da seleção destes compostos (RYWINSKA et al., 2013).

Um dos metabólitos secundários microbianos mais estudados são os compostos aromatizantes, pois estão aplicados em muitos produtos industriais conferindo sabor, fragrância e aroma aos mesmos. Por sua vez, estes produtos são cada vez mais adquiridos pelos consumidores, que agora mais exigentes e preocupados com a saúde procuram por produtos que sejam mais naturais.

2.2 Aromas microbianos

O consumo de aromatizantes pela população vem crescendo cada vez mais, pois estão presentes em muitos produtos industriais. Os inconvenientes do seu processamento químico e a demanda dos consumidores por produtos designados naturais fez surgir uma alternativa viável para contornar esses problemas: a utilização de processos biotecnológicos para a síntese de aromas e sabores, baseado em processos de fermentação microbiana, isto é, bioconversão de compostos precursores adequados (JANSSENS et al., 1992).

Através do processo fermentativo de nutrientes simples como açúcares e aminoácidos, muitos microrganismos são capazes de produzir aromas de frutas em cultura. Em um processo chamado de bioconversão, eles também catalisam conversões específicas de precursores adicionados ou intermediários (JANSSENS et al., 1992).

A produção de aromas utilizando microrganismos é antiga, sendo usada primeiramente apenas para aumentar a vida útil do produto através de processos fermentativos. Mas, além dessa característica, em alimentos e bebidas fermentadas, a ação microbiana ajudou na produção de aromas característicos devido a sua capacidade metabólica (GATFIELD, 1995).

Tradicionalmente, os processos microbianos desempenham um papel funcional no desenvolvimento de misturas complexas de aromas alimentares, desde o advento da cerveja, vinho, queijo, e produtos relacionados com fermentados (KRINGS; BERGER, 1998).

O primeiro composto de sabor identificado foi o benzaldeído. Os primórdios da indústria moderna do sabor foram marcados pelo isolamento, identificação e síntese de vanilina. A separação e a elucidação estrutural de compostos voláteis foram facilitadas pela substituição dos métodos clássicos de análise orgânicos pela cromatografia gasosa emergente. Desde então, muitas

revisões que abordam a produção de sabor e fragrâncias químicas por microrganismos têm sido publicadas (TYRRELL, 1995; FERON et al., 1996b; GATFIELD, 1996; KRINGS; BERGER, 1998).

Compostos aromatizantes como ácidos, álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, lactonas, pirazinas e terpenos foram descritos por serem produzidos por muitos microrganismos incluindo fungos, leveduras e bactérias (LEE et al., 1999; LEE; LIN; CHOU, 1995).

A primeira revisão publicada sobre compostos formadores de sabores, produzidos por microrganismos, foi elaborada por Omelianski (1923). O autor destacou as leveduras como um dos grupos mais importantes de microrganismos que produzem, em cultura, um forte aroma que lembra o odor de frutas.

Diversos microrganismos são capazes de produzir aromas, porém as leveduras merecem especial destaque, pois oferecem sistemas geneticamente bem desenvolvidos para estudo de transmissão de caracteres e são de extrema importância para a indústria (BRUNS; WHITE; TAYLOR, 1991).

As leveduras e seus produtos contribuem para o aroma e sabor, produzindo uma gama de produtos com características desejáveis, sendo assim biocatalisadoras de processos de fermentação ou biotransformadoras dos componentes alimentares (ABBAS, 2006).

As leveduras são as mais utilizadas na produção de aromas devido à grande quantidade de informações acumuladas pelas pesquisas de cepas para a produção de vinhos, e pela identificação de aromas gerados por essas cepas nos produtos fermentados. Espécies dos gêneros *Hansenula*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Geotrichium*, *Saccharomyces* e *Candida*, entre outras, permitem desde a síntese de produtos orgânicos mais simples (ALBERTAZZI et al., 1994; PASTORE et al., 1994), até a biotransformação de ácidos graxos formando lactonas (GATFIELD, 1995; GATFIELD et al., 1993). Em ambos os casos,

esses produtos encontram grande aplicação na indústria de alimentos por serem característicos de frutas.

Com isso, tem se realizado programas para seleção de microrganismos produtores de compostos orgânicos voláteis que são industrialmente aplicáveis (STEELE; STOWER, 1991; CHEETHAM, 1997; SCHOLLER et al., 2002).

Cheetham (1997) aponta a seleção de microrganismos como uma das principais etapas nos processos de biotransformação. Esse fato está relacionado aos substratos utilizados nas reações de biotransformação, os quais são insolúveis em meio aquoso. Além disso, essas biotransformações precisam ser economicamente mais viáveis do que quando comparadas aos processos químicos.

No campo da degradação de substrato hidrofóbico, algumas espécies de leveduras (*Candida*, *Yarrowia*, *Sporobolomyces*) conhecidas há alguns anos como não convencionais, atualmente são consideradas boas biocatalisadoras. Essas espécies e suas lipases estão sendo usadas em processos para a produção de aromas e fragrâncias (WACHÉ et al., 2006).

Espécies de leveduras oleaginosas têm a capacidade de acumular grandes quantidades de lipídeos, que são considerados fontes alternativas para a produção de ácidos graxos poli-insaturados que por sua vez podem ser degradados através da β -oxidação peroxisomal (principal via metabólica degradativa de ácidos graxos em leveduras) e produzir compostos aromatizantes (FAKAS et al., 2006).

Um grande número de compostos aromatizantes já é produzido por microrganismos em escala industrial. Quase todas as empresas de sabor declaram usar regularmente técnicas de fermentação para a produção de compostos aromatizantes, mas apenas algumas delas mencionam os produtos específicos (JANSSENS et al., 1992).

A BASF (Alemanha) já produz comercialmente γ -decalactona através de microrganismos. O processo envolve a bioconversão do óleo de rícino (obtido a partir das sementes de *Ricinus communis* composta por 80% do ácido 12-hidroxi-9-octadeceno, ácido ricinoleico) pela levedura *Yarrowia lipolytica*. A levedura lipolisa, o óleo de rícino, liberando o hidroxiácido que por sua vez é metabolizado pela via β -oxidação peroxisomal, resultando na formação de ácido 4-hidroxi-decanóico. Este composto lactoniza facilmente produzindo a γ -decalactona. Um rendimento de 6 g/litro pode ser alcançado (TYRRELL, 1990).

Atualmente, na produção microbiana de γ -decalactona, os seguintes gêneros de levedura têm sido utilizados: *Sporidiobolus*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Candida* e *Yarrowia* (KRZYCZKOWSKA, 2012).

A levedura *Yarrowia lipolytica* produz vários metabólitos de interesse, como: ácido cítrico, proteases, lipases e lactonas. Vários trabalhos são realizados com essa levedura para a produção do composto γ -decalactona (ZINJARDE, 2014; MORADI; ASADOLLAHI; NAHVI, 2013; GOMES et al., 2013; BRAGA; BELO, 2013; KRZYCZKOWSKA, 2012).

Lindnera saturnus é uma espécie de levedura recentemente descrita, e por esse motivo poucos são os trabalhos publicados com ela. No entanto, Yilmaztekin e Tay (2013) publicaram um trabalho no qual utilizaram a levedura *Lindnera saturnus* para realizar biotransformação e produzir acetato de isoamila natural (composto caracterizado por apresentar sabor de banana).

Produtos obtidos através de processos enzimáticos ou microbiológicos são preferidos por serem considerados naturais ou idênticos aos naturais, e muito mais fáceis de serem biodegradados (PINHEIRO; BELO; MOTA, 2002). O termo “aroma natural” designado para aromas produzidos a partir de fontes biológicas, células vivas, inclusive pelos fungos e suas enzimas tem sido incorporado às legislações na União Europeia e dos Estados Unidos, assim o rótulo de “natural”, é dado à síntese de aromas via ação microbiana,

promovendo maior aceitabilidade no mercado e não resistência pelos consumidores (PINHEIRO; BELO; MOTA, 1999).

Respondendo à demanda dos consumidores por produtos naturais, a biotecnologia está constantemente em busca de novos biocatalisadores.

A busca por novos microrganismos é de suma importância para substituir os processos químicos pela biotransformação, sejam elas enzimáticas ou com a utilização de células microbianas (SCHMID et al., 2001).

2.3 γ - Decalactona

Lactonas são compostos aromatizantes amplamente utilizados na indústria de alimentos e cosméticos, são industrialmente importantes por apresentar aroma frutado muito característico (ROMERO-GUIDO et al., 2011). Suas moléculas são constituídas por um ciclo carbonado com um átomo de oxigênio, que resultam de uma esterificação intramolecular (ou ciclização) de um ácido hidroxilado.

Dentre as lactonas, a γ -decalactona ($C_{10}H_{18}O_2$) é a que mais se destaca, apresentando aroma e sabor de pêssego, extraordinariamente persistentes que movimentam centenas de toneladas do produto por ano no mercado mundial (SCHRADER et al., 2004).

Estes compostos, como a γ -decalactona podem ser obtidos diretamente a partir de frutas ou por síntese química, porém esses métodos acarretam maior custo do produto (EUA \$ 10.000 kg⁻¹) e também desvantagens. Sendo assim, a produção de γ -decalactona por processos microbianos vem como alternativa biotecnológica muito interessante, pois além de reduzir significativamente o seu preço (EUA \$ 300 kg⁻¹) é considerada como um aditivo alimentar GRAS (Generally Recognized As Safe) pela organização US Food and Drug Administration (NETO; PASTORE; MACEDO, 2004; SCHRADER et al.,

2004; GOPINATH et al., 2008; LONGO; SANROMÁN, 2006). Esses fatores corroboram para a crescente demanda de compostos aromatizantes naturais por parte dos consumidores, uma vez que a produção microbiana de lactonas resulta na mesma configuração enantiomérica das lactonas encontradas em pêssegos e noutros frutos (SCHRADER et al., 2004).

A produção biotecnológica de γ -decalactona utiliza na sua maioria o ácido ricinoleico (ácido 12-hidroxi-octadec-9-enoico) como substrato, um ácido graxo hidroxilado (C_{18}) que, na forma esterificada, é o maior constituinte (cerca de 80%) do óleo de rícino. Esta pode ser obtida através da biotransformação desse ácido hidroxilado pela via β -oxidação peroxissomal por diversas espécies de microrganismos, principalmente por leveduras. O processo envolve a biodegradação do substrato formando o ácido 4-hidroxi-decanóico, o qual cicliza (lactoniza) formando a γ -decalactona (Figura 1) (PUTHLI; RATHOD; PANDIT, 2006; ALCHIHAB et al., 2010a; BLIN-PERRIN et al., 2000; WACHÉ et al., 2006; GOMES; TEIXEIRA; BELO, 2010).

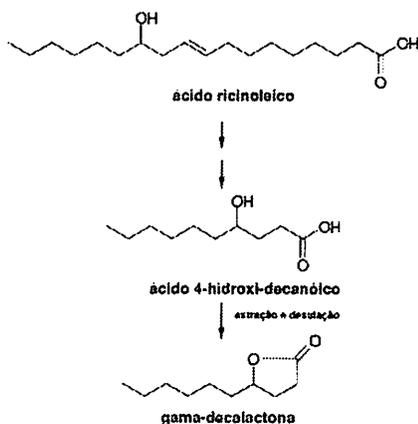


Figura 1 Biotransformação do ácido ricinoleico em γ -decalactona (PINHEIRO, 2003).

Inicialmente a produção de γ -decalactona a partir do ácido ricinoleico foi observada por Okui et al. (1963) em leveduras do gênero *Candida*.

Apesar de vários microrganismos serem capazes de produzir lactonas, as leveduras tem sido as mais estudadas como, por exemplo, os gêneros *Sporidiobolus*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Candida*, e *Yarrowia*. Os processos que envolvem a levedura *Yarrowia lipolytica* são os que obtêm maiores concentrações de produto (WACHÉ et al., 2001).

Muitas cepas de leveduras são capazes de produzir vários miligramas por litro de γ -decalactona, mas apenas algumas produzem quantidades na ordem grama por litro (LE DO et al., 2013).

Ao utilizar uma cepa geneticamente modificada de *Yarrowia lipolytica*, auxotrófica em relação à uracila, Nicaud et al. (1996) obtiveram uma produção elevada de γ -decalactona a partir de ricinoleato de metila. Depois de 75 horas no meio de biotransformação com concentração limitada de uracila, foi obtido 9.5 g/L de γ -decalactona. *Monilia fructicola*, *Sporobolomyces odoros* e *Rhodotorula glutinis* realizam o mesmo processo, porém com rendimentos de produto muito menores (WINK et al., 1988; CHEETHAM; MAUME; ROOJI, 1988).

Haarmann e Reimer, na Alemanha, reportaram a obtenção de 11 g/L de γ -decalactona em 55 horas, com óleo de rícino bruto como substrato, e sem utilizar uma estirpe geneticamente modificada (RABENHORST; GATFIELD 2000).

Gomes et al. (2013), utilizando lipases comerciais para realizar a hidrólise enzimática do óleo de rícino, observaram que o processo de produção de γ -decalactona é mais rápido, porém a concentração do produto é semelhante aqueles sem o uso de lipases. A utilização do óleo hidrolisado na produção do aroma permitiu a diminuição na fase de latência para a secreção de γ -decalactona. Em um processo semelhante, Braga, Gomes e Belo (2012) também avaliaram lipases e os seus resultados mostraram que a maior produtividade de

aroma (1,6 g/L) foi obtida sem indutor da lipase, porém com o passo de pré-indução de produção de lipase o tempo necessário para a produção máxima de γ -decalactona foi reduzido, resultando em produtividades semelhantes.

Nem Chua é uma salsicha tradicional vietnamita fermentada, naturalmente rica em compostos, de cadeia com comprimento médio, derivados de lipídeos aromatizantes. O ecossistema de leveduras presentes foi investigado a fim de selecionar biocatalisadores capazes de produzir o composto γ -decalactona. Seis cepas foram selecionadas, das quais três cepas de *Yarrowia lipolytica* foram capazes de produzir entre 1 e 2 g/L do composto (LE DO et al., 2013).

Braga e Belo (2013) estudaram o uso de células imobilizadas de *Y. lipolytica* para produção de γ -decalactona, a fim de impedir o efeito tóxico tanto do substrato óleo de rícino como do produto sobre as células. A maior concentração de aroma foi obtido com células imobilizadas em DupUM®, onde o consumo do aroma produzido pelas células foi evitado, ao contrário do que acontece com as células livres.

De acordo com Gomes, Teixeira e Belo (2012) a produtividade de γ -decalactona foi maior (168 mg/L.h) no modo em batelada, embora a conversão do substrato tenha sido mais elevada no modo de batelada alimentada, com alimentação intermitente dando 6,8 g γ -decalactona por litro.

Alchihab et al. (2010c) observaram baixo desenvolvimento da levedura *R. aurantiaca* e associaram esse problema com o acúmulo de γ -decalactona no meio e sua toxicidade. Para solucionar o problema perceberam que ao adicionar uma goma adragante natural no meio de biotransformação, a mesma protegia as células das leveduras e aumentava a produção de γ -decalactona desempenhando papel de agente tenso-ativo.

Uma estirpe de levedura *Yarrowia lipolytica* TA1 com alto rendimento de γ -decalactona foi construída por meio da integração do gene *CRF1*, que

confere resistência, com o locus do gene *POX3* da *Yarrowia lipolytica*. Depois de ser cultivada em frasco agitado a 28°C durante 90 h, a TA1 alcançou rendimento de 0,531 g/L γ -decalactona, sendo 2,9 vezes mais elevada do que a de *Yarrowia lipolytica* As2.1045 (0,194 g/L) (GUO et al., 2011).

A observação de que a enzima *Aox3* (produto do gene *POX3*) degrada a γ -decalactona foi recentemente confirmado em outra estirpe CGMCC 2,1405 (GUO et al., 2012).

Uma maior concentração de γ -decalactona (220 mg/L) foi obtida na fermentação batelada alimentada com oxigênio puro, que foi 3 vezes mais em comparação com o cultivo descontínuo. Utilizar oxigênio puro em vez de ar atmosférico na fermentação semi-contínua, também resultou em aumento de 60% na produção de γ -decalactona (MORADI; ASADOLLAHI; NAHVI, 2013).

O trabalho realizado por Gomes et al. (2011) mostrou que a caracterização granulométrica das emulsões está relacionada com o perfil de acumulação da γ -decalactona e permitiu concluir que as gotas de óleo maiores favorecem a produção do aroma, o que sugere neste caso, que o acesso das células ao substrato ocorre pela sua aderência ao redor das maiores gotas de óleo. A estirpe psicrotrófica *Rhodotorula aurantiaca* A19 foi selecionada pela sua capacidade de crescimento e de produção de γ -decalactona a baixas temperaturas. A maior produção de γ -decalactona em frascos (5,8 g/L) foi obtida com a estirpe A19 de 14°C e o pH inicial de 7,0, em meio contendo óleo de rícino a 20 g/L. No fermentador, uma concentração de 6,6 g/L foi alcançada com a estirpe A19, ao passo que, no máximo, 0,1 g/L foi obtida com a estirpe mesófila da mesma levedura (ALCHIHAB et al., 2009).

2.3.1 Via de produção de γ -decalactona: β -oxidação peroxisomal

Poucos estudos têm sido descritos em relação à via metabólica envolvida na formação de lactonas insaturadas derivadas de ácidos graxos.

A possibilidade de produzir lactona a partir de microrganismos foi descoberta na década de 1960, quando o grupo de Okui (OKUI; UCHIYAMA; MIZUGAKI, 1963) estava estudando o catabolismo de hidroxiácidos em vários organismos. Eles propuseram a via metabólica da levedura envolvida no processo de biotransformação (*Candida*), identificando a presença de intermediários que comportavam 8 a 18 carbonos, derivados do catabolismo do ácido ricinoleico.

Os hidroxiácidos são precursores diretos de lactonas e podem ser sintetizados por microrganismos a partir de ácidos graxos. Hidroxiácidos naturais como o ácido ricinoleico podem ser transformados e convertidos em γ -decalactona por microrganismos através da via β -oxidação (ENDRIZZI et al., 1996). Nessa via a levedura metaboliza o óleo de mamona liberando ácido ricinoleico, subsequentemente este é metabolizado e convertido em ácido 4-hidroxi-decanóico, que é lactonizado a γ -decalactona (Figura 2) (GATFIELD, 1999). A degradação do ácido ricinoleico pelas leveduras acontece através da ação das enzimas envolvidas na via da β -oxidação peroxisomal (AGUEDO et al., 2004).

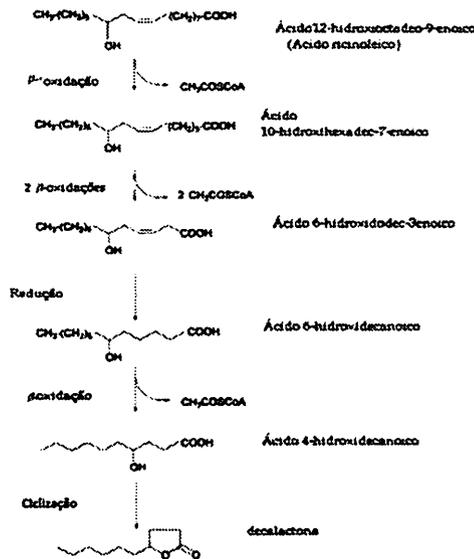


Figura 2 Bioconversão do ácido ricinoleico em γ -decalactona por *Yarrowia lipolytica* (SCHRADER et al., 2004)

A β -oxidação é um sistema de oxidação cíclica de ácidos graxos que consiste numa sequência de quatro importantes reações: 1) desidrogenação, liberação de trans 2,3 enoil-CoA; 2) hidratação da instauração, liberação de 3-hidroxiacil-CoA; 3) oxidação; formação de 3-cetoacil-CoA; 4) liberação de acetil-CoA e acil-CoA sem dois carbonos (WANG; THORPE, 1991; BERNINGER et al., 1993; WANG et al., 1999; ALCHIHAB et al., 2010b). Nas células eucarióticas, como dos fungos filamentosos e leveduras, dois compartimentos subcelulares, mitocôndria e peroxissomos, são hábeis em realizar a β -oxidação de ácidos graxos (OSMUNDSEN; BREMER; PEDERSEN, 1991).

Pela ação de uma acetil-CoA sintetase, os ácidos graxos antes de entrarem nos peroxissomos, são ativados no citoplasma em ésteres de coenzima A. Nos peroxissomos das leveduras, a β -oxidação é catalisada pela enzima acil-CoA oxidase e em seguida por duas atividades de uma enzima multifuncional, 2-

enoil-CoA hidratase e 3-hidroxiacetil-CoA desidrogenase, e pela 3-cetoacetil-CoA tiolase. O ciclo de β -oxidação de um ácido graxo termina com a diminuição da molécula de 2 carbonos da posição β e com a libertação de uma acetil-CoA (Figura 3) (WANG et al., 1999; WACHÉ et al., 2003; ALCHIHAB et al., 2010a).

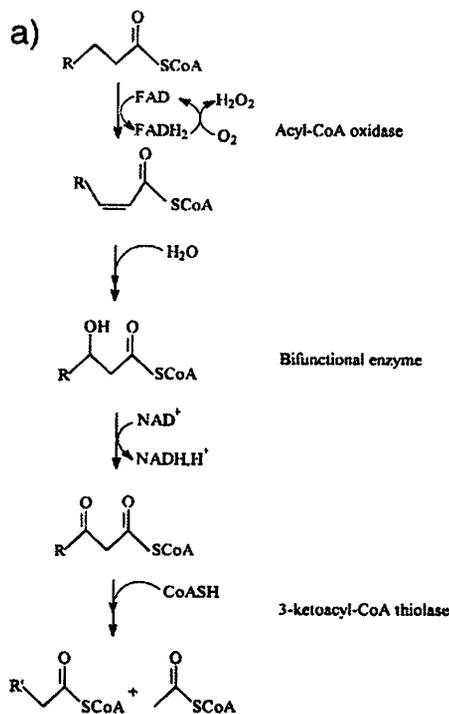


Figura 3 Reações e enzimas envolvidas na β -oxidação peroxissomal (WACHÉ et al., 1998).

Inicia-se a formação do sabor quando os ácidos graxos livres são liberados dos lipídeos através de lipases e quando ligações duplas específicas são peroxidadas por lipoxigenases a fim de produzir hidroperóxidos. A clivagem β -oxidativa e as descarboxilações dos ácidos graxos formam compostos como as lactonas e ésteres voláteis (MARASCO; DANNERT, 2007). Esse fato pode ser comprovado com muitos trabalhos realizados com a levedura *Yarrowia*

lipolytica (ZINJARDE, 2014) e mais recentemente com a levedura *Lindnera saturnus* (YILMAZTEKIN; TAY, 2013).

O acúmulo de lactonas no meio de cultura é um dos problemas principais para sua produção, pois sua toxicidade é limitante para as células produtoras (AGUEDO et al., 2003). Esse acúmulo de γ -decalactona no meio depende das taxas de produção e de degradação do composto pelas células. A partir do precursor direto de γ -decalactona (4-hidroxicaproico) vários compostos implícitos (3-hidroxi- γ -decalactona, dec-2-en-4-olido e dec-3-en-4-olido) presentes na via β -oxidativa podem ser detectados no meio (GATFIELD et al., 1993; WACHÉ et al., 2003). O acúmulo dessas diferentes decalactonas no meio indica as diversas atividades das enzimas da via. O acúmulo de γ -decalactona, por exemplo, aumenta quando a atividade acil-CoA-oxidase diminui (WACHÉ et al., 2001). No entanto, em sua maior parte, a regulação desta via em leveduras permanece incompreendida.

Assim, torna-se necessário manter a concentração de compostos voláteis no meio de fermentação abaixo de certo nível, devido ao seu efeito inibitório sobre o crescimento microbiano. Com isso, é importante definir constantemente as condições mais adequadas para produção de γ -decalactona em meio de bioconversão. Controle de temperatura, agitação, pH, aeração e composição do meio de bioconversão permanecem os fatores críticos que regem a produção de γ -decalactona (ALCHIHAB et al., 2009).

O desenvolvimento de um método de cultura para a produção do produto de interesse, que permita altas concentrações e curto ciclo de fermentação, torna-se de grande valor para a produção rentável (GOMES; TEIXEIRA; BELO, 2011).

4.4 Óleo de rícino

A mamoneira (*Ricinus Comunnis L.*), também conhecida como carrapateira, mamona, rícino, palma-cristo, bafureira e baga, é uma planta xerófila de origem afro-asiática, podendo ser cultivada em todos os países de clima temperado do mundo (CAVALCANTI et al., 2005; SCHOLZ; SILVA, 2008).

Todo o processamento da mamona é industrializado, obtendo-se como principal produto o óleo, extraído a partir de suas sementes pelo método de prensagem a frio. A Índia é o maior exportador do mundo, sendo que Brasil e China também são grandes produtores (OGUNNIYI, 2006).

O teor de óleo das sementes de mamona varia de 35 a 55%, sendo o triacilglicerol do ácido ricinoleico (Figura 4) o principal constituinte, cerca de 90% dos ácidos graxos totais na fração lipídica do óleo (ROCHA et al., 2008). Os outros ácidos graxos presentes são linoleico (4,2%), oleico (3,0%), esteárico (1%), ácido palmítico (1%) entre outros (OGUNNIYI, 2006).

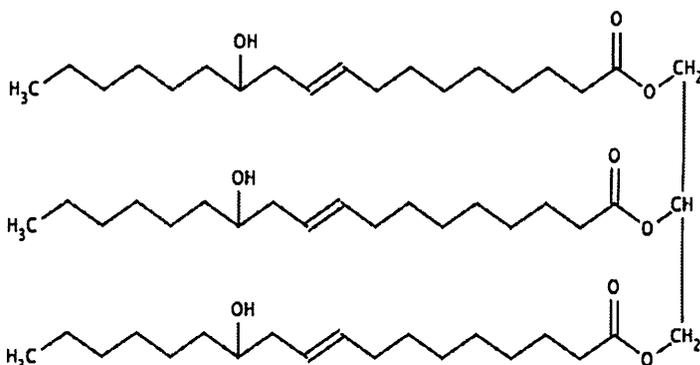


Figura 4 Molécula do triacilglicerol do ácido ricinoleico (AZEVEDO et al., 2009).

O ácido ricinoleico é um ácido graxo incomum, que apresenta 18 carbonos na sua estrutura, com uma insaturação cis no carbono 9 e uma hidroxila no carbono 12. Diferentemente da maioria dos óleos vegetais, existem três sítios passíveis de sofrerem modificações: a hidroxila, a insaturação e a carboxila (NUNES; MARTINELLI; PEDROSO, 2008).

Devido à sua composição e privilegiada estrutura, o óleo de rícino é o melhor óleo para fins industriais (BELTRÃO, 2003).

O óleo de rícino possui características particulares como a elevada viscosidade, além de ser um líquido estável, não tóxico e não secante. Apresenta coloração amarela clara ou quase incolor, com sabor e odor característicos, fraco e suave (SCHOLZ; SILVA, 2008).

Industrialmente possui inúmeras aplicações como a produção de tintas, corantes, anilinas, desinfetantes, germicidas, óleos lubrificantes, colas, aderentes, náilon, e materiais plásticos. Porém, as aplicações mais importantes do óleo de mamona são a utilização na produção de biodiesel e na indústria de cosméticos e fármacos (TAKANO et al., 2007).

O óleo de mamona tem sido utilizado como substrato de baixo custo econômico em estudos de bioconversão do ácido ricinoleico no composto aromatizante γ -decalactona.

Gomes et al. (2013) utilizaram as concentrações de 10, 30 e 50 g/L de óleo de rícino para a produção de γ -decalactona pela levedura *Y. lipolytica*, fazendo o uso de diferentes lipases comerciais de outras fontes microbianas para induzir a hidrólise do óleo.

A fim de estudar o cultivo da levedura *Y. lipolytica* em batelada alimentada para a produção de γ -decalactona, Moradi, Asadollahi e Nahvi (2013) utilizaram um meio de biotransformação composto por 6 g/L de peptona, 3 g/L de extrato de levedura e 25 g/L de óleo de rícino.

O meio de biotransformação composto por 100 g/L de óleo de rícino, 20 g/L de peptona e tween 80 foi usado para avaliar a produção de γ -decalactona pela cepa de *Y. lipolytica* KKP 379 (KRZYCZKOWSKA, 2012).

Um estudo feito por Braga, Gomes e Belo (2012) sobre a indução de lipase produzida pela *Y. lipolytica* para hidrólise do óleo de rícino e os efeitos na produção de γ -decalactona utilizou 30 g/L de óleo de rícino como substrato.

A variação da concentração de óleo de rícino foi de 0 a 60 g/L em trabalho sobre a produção de γ -decalactona sobre cepas psicrótróficas e mesófilas da levedura *Rhodotorula aurantiaca* (ALCHIHAB et al., 2009).

Também em outro trabalho realizado por Alchihab et al. (2010c) o substrato utilizado foi óleo de rícino, porém em uma concentração fixa de 20 g/L.

4.5 Glicerol

A produção de biodiesel é dada por meio do processo de transesterificação de lipídeo com álcool simples, metanol ou etanol na presença de catalisadores. Nessa reação são gerados como produto principal ésteres e como principal subproduto grandes quantidades de glicerol. A cada 10 kg de biodiesel produzido, cerca de 1 kg de glicerol bruto é gerado (RYWINSKA et al., 2013).

O glicerol 1,2,3-propanotriol (Figura 5), é um álcool que possui características como viscosidade, sabor doce, além de ser inodoro e incolor. É abundante na natureza, sendo sua estrutura encontrada na forma de lipídeos.

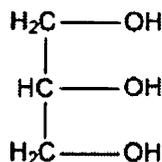


Figura 5 Fórmula estrutural do glicerol (DUARTE, 2011).

O glicerol, na forma pura, possui inúmeras aplicações na indústria de alimentos, química e farmacêutica, devido às suas características como a não toxicidade (FAIRBANKS, 2009; SILVEIRA, 2012). Por outro lado, o glicerol bruto apresenta características desagradáveis e impurezas que lhe conferem um baixo valor (BORSCHIVER, 2006; EASTERLING et al., 2009). Sua composição varia de acordo com a matéria prima utilizada no processo de produção do biodiesel, o que dificulta a sua purificação e recuperação, além disso, esse tratamento apresenta um alto valor de custo (RYWINSKA et al., 2013). Sendo assim, poderá ser descartada no meio ambiente uma grande quantidade de efluentes contendo glicerol sem nenhum tratamento, trazendo riscos e problemas ambientais (RIVALDI et al., 2008).

Atualmente o mercado não consegue absorver a totalidade da sua produção, pensando os produtores em até diminuir a produção do biodiesel por não saberem como dispor adequadamente deste coproduto o glicerol. Na tentativa de dar um destino a esse resíduo, vem crescendo o interesse e a necessidade por alternativas biotecnológicas que aproveitam esse glicerol residual (SILVEIRA, 2012).

Entre essas alternativas biotecnológicas a que mais se destaca é a bioconversão, utilizando microrganismos capazes de metabolizar o glicerol através de processos fermentativos com o intuito de produzir produtos de alto valor agregado (SILVA; MACK; CONTIERO, 2009).

O glicerol bruto além de conter elementos nutricionais, como fósforo, enxofre, magnésio, cálcio, nitrogênio e sódio, que são fáceis de serem metabolizados por microrganismos (THOMPSON; HE, 2006), atua como precursor de numerosos compostos, e regulador de vários mecanismos bioquímicos intracelulares (LAGES; SILVA-GRAÇA; LUCAS, 1999).

Devido à ampla ocorrência do glicerol na natureza, muitos microrganismos conhecidos podem utilizar naturalmente o glicerol como fonte de carbono e energia, substituindo assim tradicionais carboidratos, como sacarose, glicose e amido, em processos fermentativos (SILVA; MACK; CONTIERO, 2009).

A principal forma de valorização biotecnológica do glicerol bruto é a sua conversão em lipídios microbianos ("lipídeos de célula única ou - SCO, single cell oil, em inglês") e ácido cítrico (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2009). De acordo com Papanikolaou e Aggelis (2009) a *Y. lipolytica* ACA -DC 50109 converteu com êxito o glicerol bruto em SCO ou ácido cítrico.

Os lipídeos podem ser acumulados através de dois caminhos diferentes entre eles está o de síntese de novo que envolve a produção de precursores de ácidos graxos (como o acetil e malonil-CoA). Em um meio a base de glicerol e limitado a nitrogênio, os lipídeos produzidos ou acumulados pela levedura *Y. lipolytica* foram representados principalmente por ácidos oléico, linoléico, palmítico e ácido palmitoléico (MAKRI; FAKAS; AGGELIS, 2010; ANDRÉ et al., 2009; PAPANIKOLAOU et al., 2008; KAMZOLOVA, 2011). Observou-se também que o crescimento de *Y. lipolytica* em glicerol industrial produziu lipídeos ricos em cis-9-C18:1 e cis, cis-9, 12-C18:2 (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2009).

O glicerol bruto também tem sido empregado como substrato para a produção de produtos de alto valor agregado, como ácidos orgânicos, carotenoides e biomassa microbiana, realizadas por bactérias, leveduras, fungos e espécies de algas (TACCARI et al., 2012; RYWINSKA et al., 2013).

Entre as espécies de leveduras mais utilizadas para a conversão de glicerol bruto, estão *Yarrowia lipolytica*, *Rhodotorula* e *Candida sp.* (ANDRÉ et al., 2009; CHATZIFRAGKOU et al., 2011; EASTERLING et al., 2009; MAKRI; FAKAS; AGGELIS, 2010; SAENGE et al., 2011).

Em um trabalho realizado por Taccari et al. (2012), onde 45 cepas de leveduras pertencentes a 14 gêneros foram testadas em meio contendo glicerol bruto e glicose como fonte de carbono separadamente, confirmou-se que as impurezas do biodiesel não têm qualquer impacto significativo sobre o crescimento microbiano das mesmas, uma vez que 13 cepas apresentaram produção de biomassa em glicerol bruto maior do que a exibida em glicose, 12 cepas tiveram rendimentos comparáveis sobre as duas fontes de carbono e 14 cepas apresentaram menor produção de biomassa em glicerol bruto.

Gervais et al. (1992) observaram um aumento na produção do aroma específico (γ -decalactona) pela levedura *Sporidiobolus salmonicolor*, quando utilizou glicerol como fonte de carbono, comparado com o resultado obtido quando se utilizou glicose no meio.

Também em outro trabalho com *Sporidiobolus salmonicolor* Gervais et al. (1992) mostraram que as células cresceram em baixa atividade de água (0,97) na presença de altas concentrações de glicerol, acumulando elevadas quantidades de γ -decalactona.

Recentemente Teixeira (2013) selecionaram quatro leveduras que exibiram um melhor crescimento quando cultivadas em glicerol puro e bruto, dentre elas estavam a *Lindnera saturnus* e *Yarrowia lipolytica*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Leveduras e Substratos

Foram utilizadas neste trabalho duas cepas de leveduras, *Yarrowia lipolytica* UFLA CM-Y9.4 e *Lindnera saturnus* UFLA CES-Y677, ambas pertencentes à Coleção do Laboratório de Fisiologia e Genética de Microrganismos do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras – MG. Os substratos utilizados foram óleo de rícino e glicerol bruto. O óleo de rícino foi adquirido da empresa Sigma Aldrich (Castor oil 259853). O glicerol bruto foi cedido pelo laboratório de Biodiesel, Departamento de Agricultura, da Universidade Federal de Lavras.

3.1.1 Meio, condições de cultivo e preparo do inóculo

Os microrganismos foram inicialmente reativados em tubos de ensaio, contendo 2 mL de meio YEPG (10 g/L extrato de levedura; 20 g/L peptona de soja; 20 g/L glicose) mantidos em temperatura de 27°C e agitação de 140 rpm por 48 horas.

Para a produção da biomassa, 10% da cultura final foram reativados e transferidos para volumes maiores até atingirem um volume final de 200 mL. As condições de temperatura e agitação foram as mesmas do processo de reativação, porém o tempo de cultivo no volume final foi de 18 horas, até atingir o final da fase logarítmica e obtenção de 10^8 cél/mL. Quando este número foi alcançado, as células foram separadas do meio de cultivo por centrifugação a 4°C a 6000 g por 5 minutos, em seguida foram lavadas três vezes com água destilada estéril e centrifugadas novamente antes de serem colocadas no novo

meio (BRAGA; GOMES; BELO, 2012; GOMES; TEIXEIRA; BELO, 2010, 2011, 2012; KRZYCZKOWSKA, 2012).

3.1.2 Biotransformação

Após o processo descrito acima, as leveduras foram ressuspensas e transferidas para o meio de biotransformação YNB (Yeast Nitrogen Base) com aminoácidos (6,7 g/L), NH_4Cl (2,5 g/L) e Tween 80 (2 g/L), e verificou-se o pH inicial de todas as unidades experimentais. O experimento foi realizado em Erlenmeyer de 125 mL com 50 mL do meio de biotransformação acrescidos individualmente de óleo de rícino e glicerol bruto em diferentes concentrações (10, 20 e 30%). O cultivo foi realizado por 5 dias (120 horas) a temperatura de 27°C e agitação de 250 rpm. Foram retiradas amostras no tempo inicial e final. Esta metodologia foi adaptada de acordo com Gomes et al. (2011, 2013), Braga, Gomes e Belo (2012), Alchihab et al. (2009, 2010a) e Moradi, Asadollahi e Nahvi (2013).

3.2 Métodos analíticos

3.2.1 Contagem de células viáveis

Para contagem de células viáveis, 10 μl da amostra foram diluídos em 90 μl de água peptonada (0,1% m/v). Desta solução, 10 μL foram retirados e misturados em 10 μL de azul de metileno (azul de metileno, 0,01% m/v e citrato de sódio, 2% m/v). A contagem foi realizada com o auxílio de uma câmara de Neubauer em microscópio óptico com aumento de 400x. Foram contadas as células viáveis presentes em 5 dos 25 quadriculados do quadrante central da

câmara. O cálculo em cél/mL foi obtido pela seguinte equação (MOREIRA; HUISING; BIGNELL, 2010):

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

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

O crescimento das leveduras também foi avaliado pela medida da densidade óptica a 600 nm a cada 6 horas.

3.2.2 Análise de pH

A aferição do pH no meio de biotransformação foi realizada antes e após o processo fermentativo com medidor de pH calibrado no início do processo de análise com soluções tampões de pH 4 e 7.

3.2.3 Avaliação da produção de γ -decalactona

A metodologia descrita abaixo está de acordo com Gomes, Teixeira e Belo (2010, 2011), Braga, Gomes e Belo (2012) e Moradi, Asadollahi e Nahvi (2013) com modificações.

Após a biotransformação, foram retiradas do meio amostras de 1 mL de cada concentração analisada. Para a quantificação total de γ -decalactona nas

amostras, o pH foi ajustado para 2 com HCl concentrado para interromper o metabolismo das leveduras.

A γ -decalactona foi extraída do meio de biotransformação por éter dietílico (pureza 99,9%). Esta extração líquido/líquido foi realizada adicionando 1 mL de éter dietílico à amostra contida em frasco de 4 mL, sendo invertido 60 vezes seguidas, para promover uma eficiente mistura. Após a completa separação das fases líquidas, foi retirado 1 μ L da fase superior com a ajuda de seringa e injetado diretamente no cromatógrafo gasoso – GC, Shimadzu modelo 17A, equipado com detector de ionização de chama (FID) e coluna capilar de sílica DB-WAX (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m, J&W Scientific). As análises foram realizadas nas seguintes condições: temperatura do injetor 200°C, temperatura do detector 250°C, temperatura inicial da coluna 60°C, programação da temperatura 60°C até 195°C, numa razão de 20°C/m e depois até 270°C, numa razão de 10°C/m. A vazão do gás de arraste na coluna foi de 1 mL/min, razão de split 1:30.

Os dados foram analisados recorrendo ao programa de aquisição e integração, GC- class, versão 2.5 da SHIMADZU e comparadas com a curva padrão previamente obtida para o composto γ -decalactona.

3.2.4 Consumo de glicerol

O glicerol foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando cromatógrafo modelo LC-10Ai (Shimadzu Corp. Japan), equipado com sistema duplo de detecção constituído por detector UV (modelo SPD + 10Ai) e detector de índice de refração (modelo RID – 10A). A coluna utilizada foi de exclusão iônica, modelo Shim-pack SCR-101H (7,9 mm x 30 cm) Shimadzu, operando a temperatura de 30°C.

Para a fase móvel, foi utilizado como eluente água MilliQ acidificada (pH 2,1) com ácido perclórico (100 mM) com fluxo de 0,6 mL/min. O glicerol foi detectado através do detector de índice de refração RID e o volume de amostra injetado foi de 20µL. Antes de serem injetadas, as amostras foram centrifugadas (4°C, 10.000 rpm por 10 min) e filtradas (0,22 µm). A concentração do glicerol foi determinada a partir da curva de calibração obtida utilizando-se composto padrão (MIGUEL et al., 2012).

3.3 Delineamento experimental e análises estatísticas

O experimento foi conduzido obedecendo ao delineamento em blocos casualizados (DBC), onde os blocos foram os dias. Os tratamentos foram dispostos em um arranjo fatorial (2 x 2 x 3) x 3, sendo 2 leveduras (*Yarrowia lipolytica* UFLA CM-Y9.4 e *Lindnera saturnus* UFLA CES-Y677), 2 fontes de carbono (glicerol bruto e ácido ricinoleico), 3 concentrações (10, 20 e 30%) com 3 repetições, totalizando 36 unidades experimentais (Erlenmeyers).

Os dados experimentais foram submetidos ao ANAVA e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott (FERREIRA, 2008).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise da viabilidade celular inicial e final no processo de biotransformação

Após a fase log (18 horas de cultivo), as células das leveduras *L. saturnus* UFLA CES-Y677 e *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9.4 foram lavadas, centrifugadas e transferidas para o meio de biotransformação para se promover a produção de γ -decalactona a partir do glicerol bruto e do óleo de rícino.

No início e no final (120 horas) do processo de biotransformação avaliou-se a viabilidade celular das leveduras.

A Tabela 1 mostra os resultados obtidos para as duas leveduras nos dois substratos utilizados, óleo de rícino e glicerol bruto em diferentes concentrações.

Tabela 1 Análise da viabilidade celular (cél/mL) das leveduras *L. saturnus* UFLA CES-Y677 e *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9.4 cultivadas em diferentes concentrações (10, 20 e 30%) de óleo de rícino e glicerol bruto no tempo inicial e final (120 horas)

Cepa	Tempo Inicial			Tempo Final (120 horas)		
	Óleo de Rícino					
	10%	20%	30%	10%	20%	30%
<i>L. saturnus</i> UFLA CES-Y677	8,93 ^{Aa}	8,89 ^{Aa}	8,81 ^{Aa}	8,07 ^{Aa}	9,05 ^{Ab}	8,18 ^{Aa}
<i>Y. lipolytica</i> UFLA CM-Y9.4	8,75 ^{Aa}	8,64 ^{Aa}	8,64 ^{Aa}	9,03 ^{Bb}	9,01 ^{Ab}	8,07 ^{Aa}
	Glicerol Bruto					
	10%	20%	30%	10%	20%	30%
	<i>L. saturnus</i> UFLA CES-Y677	8,93 ^{Aa}	8,89 ^{Aa}	8,81 ^{Aa}	9,08 ^{Aa}	9,88 ^{Bb}
<i>Y. lipolytica</i> UFLA CM-Y9.4	8,75 ^{Aa}	8,64 ^{Aa}	8,64 ^{Aa}	9,88 ^{Bb}	8,78 ^{Aa}	8,68 ^{Aa}

Médias com letras minúsculas para a mesma variável na mesma linha diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott. Médias com letras maiúsculas para a mesma variável na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott.

No início do processo de biotransformação tanto *L. saturnus* UFLA CES-Y677 quanto *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9.4 apresentaram estatisticamente o mesmo número de células perante a inoculação nos dois substratos e nas três concentrações, estando viavelmente ativas.

No tempo final de 120 horas as células de *L. saturnus* UFLA CES-Y677, quando cultivadas em óleo de rícino, apresentaram diferença significativa apenas na concentração de 20%, onde seu crescimento foi maior, alcançando o valor de 9,05 cél/mL. Nas outras duas concentrações, o número de células foi menor, 8,07 e 8,18 cél/mL, respectivamente, para 10 e 30%. Estes valores são menores até quando comparados ao número de células iniciais. Este último efeito do número de células em relação à população inicial também foi observado para a *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9.4, porém apenas na concentração de 30%. Nas concentrações de 10 e 20% de óleo de rícino o crescimento foi de 9,03 e 9,01 cél/mL respectivamente.

Ao comparar as leveduras, apenas na concentração de 10% de óleo de rícino após 120 horas de cultivo, é que se observou diferença significativa, sendo que a *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9.4 apresentou melhor crescimento do que a *L. saturnus* UFLA CES-Y677.

Na concentração de 10% de óleo de rícino, *L. saturnus* UFLA CES-Y677 alcançou um pequeno crescimento. Nesse caso, uma menor quantidade de substrato não sustentou um crescimento efetivo.

Tanto *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9.4 quanto *L. saturnus* UFLA CES-Y677 obtiveram baixo crescimento na concentração de 30% de óleo de rícino.

Analisando a viabilidade celular da *L. saturnus* UFLA CES-Y677 e da *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9.4 no meio de cultivo composto por glicerol bruto, nota-se diferença significativa nas concentrações de 20% e 10% respectivamente, onde obtiveram melhores resultados 9,88 que nas outras concentrações.

Estatisticamente houve diferença significativa entre as duas leveduras nas três concentrações. Embora a *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9.4 tenha tido resultado melhor do que a *L. saturnus* UFLA CES-Y677 na concentração de 10%, esta última apresentou maior crescimento no valor total das três concentrações.

Em comparação ao substrato óleo de rícino, o glicerol bruto obteve melhores resultados, não apresentando crescimento inferior em nenhuma das concentrações. Pelo contrário, onde o crescimento não foi elevado, o número de células se manteve estável comparado ao inóculo inicial.

No trabalho de Moradi, Asadollahi e Nahvi (2013) o crescimento da biomassa foi concomitante com acúmulo de γ -decalactona no meio onde atingiram o máximo quase no final da fase de crescimento exponencial. WACHÉ et al. (2000) relataram que a produção máxima de γ -decalactona ocorreu assim que a máxima produção da biomassa foi atingida.

Gervais e Battut (1989) notaram que após um período de tempo, dependendo das condições de cultivo, a produção de γ -decalactona no meio atingiu um nível que corresponde à produção cumulativa de células. Todos os valores medidos de produção de aroma foram relacionados a uma população constante de 10^{10} células de levedura por mL.

4.2 Análise do pH (inicial e final)

A variação de pH afeta a ionização do substrato e das lipases livres, além disso exerce efeito sobre a atividade lipolítica, uma vez que este atua sobre o complexo lipase-substrato (GOMES et al., 2013). Com isso, realizou-se a análise do pH no início e no final do processo de biotransformação.

Ao aferir o pH no início da fermentação (assim que as células de *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9.4 e de *L. Saturnus* UFLA CES-Y677 foram

ressuspendidas no meio de biotransformação) tanto o meio que continha glicerol quanto o que continha óleo de rícino como fonte de carbono apresentaram valor de pH 5 independente dos tratamentos (10, 20 e 30% de cada uma das fontes de carbono testadas). Os valores de pH inicial reportados por Braga (2009) e Endrizzi e Bellin (1995) corroboram com os valores encontrados neste presente estudo.

No final da fermentação (120 horas) o pH foi aferido novamente (Tabela 2).

Tabela 2 Análise do pH final (120 horas) das leveduras *L. saturnus* UFLA CES-Y677 e *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9.4 cultivadas em diferentes concentrações (10, 20 e 30%) de óleo de rícino e glicerol bruto

Cepa	Concentrações					
	Glicerol			Óleo de Rícino		
	10%	20%	30%	10%	20%	30%
<i>L. saturnus</i> UFLA CES-Y677	4,3 ^{Bb}	4,0 ^{Bb}	3,0 ^{Ba}	7,3 ^{Aa}	7,0 ^{Ba}	7,0 ^{Ba}
<i>Y. lipolytica</i> UFLA CM-Y9.4	2,0 ^{Aa}	2,0 ^{Aa}	2,3 ^{Aa}	7,0 ^{Ac}	4,0 ^{Aa}	6,3 ^{Ab}

Médias com letras minúsculas para a mesma variável na mesma linha diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott. Médias com letras maiúsculas para a mesma variável na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott.

No meio contendo glicerol o pH final variou de 2 a 4,3, sendo que para a levedura *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9.4 não houve diferença significativa entre os tratamentos e o pH médio foi 2,1. Nos testes com a levedura *L. saturnus* UFLA CES-Y677 cultivada em glicerol, houve diferença significativa do tratamento de 30% (pH 3) em relação aos de 10 e 20% (pH 4). Em relação às diferentes cepas houve diferença significativa nos 3 tratamentos, sendo *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9.4 responsável pela maior redução de pH quando comparada a *L. saturnus* UFLA CES-Y677.

De acordo com Silva (2002), algumas cepas de *Candida* não produzem γ -decalactona no meio não acidificado. Outros estudos mostram que a *Pichia*

guilliermondii produz a mesma quantidade de γ -decalactona no meio com ou sem acidificação (ENDRIZZI; BELLIN, 1995). Segundo esse mesmo autor, a proporção de lactonização depende da acidificação causada no meio de cultura pelas leveduras, porém este não é um fator limitante para a produção de γ -decalactona.

No trabalho de Endrizzi e Bellin (1995), variações no pH também foram encontradas quando *Candida intermedia* foi utilizada para a produção de γ -decalactona. Observou-se uma acidificação do meio que alcançou um pH 3,0 após 48 horas de incubação, quando o pH inicial foi de 5,6.

Segundo Santos (2009) o aumento de biomassa de *Yarrowia lipolytica* YB-423 quando cultivada em meio contendo 50 g/L de glicerol bruto, coincide com a diminuição do pH (inicial 5,5 e final 3,0) ao longo do cultivo (72 horas), provavelmente ocasionado pela produção de ácidos orgânicos, já que a levedura estudada é comumente utilizada para produção de ácidos orgânicos.

A variação de pH final apresentada pelas leveduras *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9.4 e *L. Saturnus* UFLA CES-Y677 quando cultivadas em glicerol, condiz com a encontrada na literatura citada no presente trabalho.

A variação de pH observada no meio adicionado de óleo de rícino foi bem distinta da apresentada no meio contendo glicerol. No cultivo com óleo de rícino, o pH final variou de 4 a 7. A levedura *L. saturnus* UFLA CES-Y677 não promoveu acidificação do meio, não havendo diferença significativa entre os tratamentos, os quais apresentaram valor médio de pH 7. *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9.4 comportou-se de forma distinta, apresentando diferenças significativas nos valores de pH em função da concentração de óleo de rícino adicionado ao meio. Os resultados observados nesse caso foram pH 7 no tratamento de 10%, pH 4 no de 20% e 6,33 no de 30%. Quando comparadas as leveduras testadas em meio adicionado de óleo de rícino, observou-se que nos tratamentos de 20 e 30% houve diferença significativa, tendo a *L. saturnus* UFLA CES-Y677

apresentado um valor de pH neutro, enquanto *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9.4 apresentou valores de pH 4 e 6,3, respectivamente, para as concentrações 20% e 30% de óleo de rícino no meio.

Braga (2009) monitorou o pH ao longo do tempo para os quatro meios utilizados na biotransformação do óleo de rícino em γ -decalactona pela levedura *Yarrowia lipolytica* W29. Para os ensaios em que se adicionou lipase extracelular (Lipase/OR e Lipase/ORH) e indutor da produção de lipase (MB/Azeite), observa-se uma diminuição do pH até 4,5 e 4,6 respectivamente. No caso em que se utilizou apenas óleo de rícino (MB) observou-se um maior aumento do pH até ser atingido pH 7,5 às 112 horas. A acidificação do meio pode estar relacionada com o aumento da quantidade de lipase, uma vez que haverá uma maior hidrólise dos triglicerídeos presentes, liberando os ácidos graxos, o que conduz a diminuição do pH. No caso do meio MB, como é necessário que a levedura produza as lipases para hidrolisar o óleo de rícino, o pH do meio atinge valores mais elevados.

Gomes et al. (2013) e Braga (2009) estudaram o efeito do pH (6, 7 e 8) na hidrólise do óleo de rícino com três enzimas comerciais. Para a enzima Lipozyme TL IM verificou-se que no pH 6,0 a reação é inicialmente mais rápida, obtendo-se uma maior percentagem de hidrólise num menor período de tempo (6 horas). O contrário foi constatado para Lipolase 100T, onde o pH 6,0 obteve menor percentagem de hidrólise, sendo os valores de pH 7,0 e 8,0 melhores. No caso da lipase CALB L, o mesmo grau de hidrólise é atingido para o pH 6,0 e 7,0, sendo que os menores graus de hidrólises foram encontrados no pH 8,0.

Gopinath et al. (2008) estudaram o efeito do pH na produção de biomassa e de γ -decalactona usando *Sporidiobolus salmonicolor* através de experiências de 120 horas a vários níveis de pH iniciais que variaram de 5,0 a 9,0. Verificou-se que o pH ótimo foi de 6,5, onde se obteve um valor máximo de

produção. Uma menor produção foi encontrada em valores extremos de pH (muito ácidos ou muito alcalinos), em relação à encontrada em pH mais neutro, explicou que esse fato pode ser devido à baixa atividade metabólica do microrganismo.

García et al. (2009) cultivaram células de *Yarrowia lipolytica* em 5g de metil ricinoleico e tampão citrato (100mM) a pH 3, 4,5 e 6. O máximo de conversão de 3-hidroxi- γ -decalactona atingido mais rapidamente foi depois de 40 horas no pH 6. Em seguida, as concentrações na cultura foram diminuindo rapidamente próximo de um pH neutro, mas lentamente em condições mais ácidas.

Quando Silva (2002) avaliou o comportamento do pH durante a fase de biotransformação, observou-se uma similaridade do pH inicial no cultivo da *Candida oleophila* (em torno de 6,2) utilizando como substrato tanto o ácido ricinoleico quanto o ricinoleato de metila, sendo que a variação de pH ocorrida ao longo da biotransformação foi desprezível. Já no ensaio envolvendo a *Pichia guilliermondii* utilizando os mesmos substratos, o primeiro inóculo iniciou com pH 6,7 e o segundo com pH 5,5, os pHs dos meios de biotransformação sofreram um ligeiro aumento, atingindo pH 7,0, não saindo da faixa de pH em que normalmente ocorre a biotransformação quando se utiliza leveduras.

As *Cândidas* estudadas por Okui, Uchiyama e Mizugaki (1963) mostraram uma variação no valor de pH do meio de 6,8 a 7,8 após 72 h de cultivo no meio de biotransformação.

Nos estudos de Maume e Cheetham, (1991) com os microrganismos *Rhodotorula glutinis* e *Sporobolomyces odoratus*, o crescimento celular ótimo foi a pH 6,5-7,0, mas para a produção de γ -decalactona, o melhor pH foi alcalino (7,5-8,5).

Alchihab et al. (2009) avaliaram os efeitos do pH inicial sobre o crescimento das cepas psicrotrófica e mesófila de *Rhodotorula aurantiaca* e

constatarem que o melhor crescimento e a maior concentração de γ -decalactona foi em pH 6,8 para a estirpe A19 e pH 6,7 para a estirpe mesófila. No entanto para esta última estirpe a produção foi baixa.

O modelo estatístico proposto por Gomes et al. (2011) apontou o pH 6,17 como melhor condição de otimizar a produção de γ -decalactona.

De acordo com todos esses autores, a faixa de pH para a produção de γ -decalactona está perto de pH 7. Neste trabalho, tanto a levedura *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9.4 quanto a *L. saturnus* UFLA CES-Y677 exibiram a faixa de pH que os autores dizem ser melhor para produção de γ -decalactona. Apenas a *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9.4 na concentração de 20% fugiu a regra. No entanto, existem estudos que mostram cepas de leveduras que produzem γ -decalactona em meios acidificados.

4.3 Análise da produção de γ -decalactona

A utilização de glicerol como substrato para a produção de γ -decalactona obteve melhores resultados do que quando se utilizou óleo de rícino (Tabela 3).

Tabela 3 Produção de γ -decalactona (g/L) por *L. saturnus* UFLA CES-Y677 e *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9.4 cultivadas em diferentes concentrações (10, 20 e 30%) de óleo de ricino e glicerol bruto

Cepa	Concentrações					
	Glicerol			Óleo de Rícino		
	10%	20%	30%	10%	20%	30%
<i>L. saturnus</i> UFLA CES-Y677	3,00 ^{Aa}	5,00 ^{Bb}	2,67 ^{Ba}	0,00 ^{Aa}	3,00 ^{Ab}	0,00 ^{Aa}
<i>Y. lipolytica</i> UFLA CM-Y9.4	5,00 ^{Bb}	1,00 ^{Aa}	1,00 ^{Aa}	3,00 ^{Bb}	2,67 ^{Ab}	0,00 ^{Aa}

Médias com letras minúsculas para a mesma variável na mesma linha diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott. Médias com letras maiúsculas para a mesma variável na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott.

A comparação entre as tabelas 1 e 3 mostra que as concentrações onde o crescimento celular foi baixo ou inferior ao inóculo inicial correspondem justamente às concentrações em que não houve produção de γ -decalactona.

A concentração de γ -decalactona é um dos fatores limitantes para a sua produção por *R. aurantiaca*, uma vez que afeta o crescimento da levedura no meio de biotransformação (ALCHIHAB et al., 2010c). A produção de γ -decalactona foi relatada por inibir o crescimento da levedura *Yarrowia lipolytica* (AGUEDO et al., 2003). A concentração de lactona reduz drasticamente quando as células entram na fase estacionária de crescimento. Isto é porque as células de levedura são capazes de reconsumir as lactonas produzidas (PAGOT et al, 1998; WACHÉ et al, 2001; GUO et al, 2011).

A fim de evitar este problema Gomes, Teixeira e Belo (2012) investigaram duas estratégias diferentes de batelada alimentada. Observaram que o crescimento foi baixo durante a biotransformação nos dois modos de operação. A viabilidade das células se manteve constante a 100% durante os experimentos.

Turki et al. (2010), também relataram esse baixo crescimento celular em substratos lipídicos, sendo responsável pela diminuição da concentração da massa celular no cultivo em batelada alimentada.

Depois de atingir seu pico, a concentração de aroma diminuiu progressivamente até o desaparecimento completo do meio no cultivo em batelada. Já no cultivo em batelada alimentada esse comportamento não foi observado. Após a alimentação de meio fresco, a concentração de aroma foi aumentada e mantida no meio de biotransformação durante toda a experiência. Isto reforça a hipótese de o consumo de lactona pelas leveduras ser apenas na ausência de óleo.

Nos experimentos de biotransformação Braga e Belo (2013), células livres e imobilizadas foram utilizadas. Na experiência com células livres, a produção de γ -decalactona aumentou até um valor máximo e depois diminuiu

até ser consumido completamente do meio. Esta diminuição é devido ao fato de que este metabolito é consumido por leveduras como uma fonte de carbono ou é retomado e utilizado para a produção de outros produtos da via β -oxidação. No entanto, este comportamento não foi observado com células imobilizadas e a concentração do aroma foi mantida no meio de biotransformação, durante todo o experimento.

Alchihab et al. (2010a) relataram anteriormente em um outro estudo a diminuição no crescimento de *R. aurantiaca* durante a biotransformação de óleo de rícino em γ -decalactona, e sugeriram que isto poderia ter ocorrido devido a um efeito tóxico de γ -decalactona ou do ácido 4-hidroxicanoico. Avaliando o efeito destas moléculas sobre o crescimento de *R. aurantiaca*, diferentes concentrações desses dois compostos foram adicionados a um meio contendo glicose como fonte de carbono. Na presença de 100 mg/L de γ -decalactona o crescimento de *R. aurantiaca* não foi alterado, já na concentração de 300 mg/L o crescimento foi significativamente reduzido. O crescimento foi totalmente inibido acima de 400 mg/L de γ -decalactona. Concluíram que, a concentração de γ -decalactona é um dos fatores limitantes para a sua produção por *R. aurantiaca*, uma vez que afeta o crescimento da levedura no meio de biotransformação.

Feron et al. (1996a) também obtiveram dados comparáveis para espécies *Sporidibolus*. Observaram que não houve multiplicação celular com concentrações de lactona acima de 100 mg/L para *S. salmonicolor* e com mais de 300 mg/L para *S. ruinenii*.

No presente estudo, verificou-se diferença significativa apenas na concentração de 20% de glicerol para a levedura *L. saturnus* UFLA CES-Y677, onde a produção de γ -decalactona foi 5 vezes maior. Para a *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9.4 a diferença também foi apenas em uma concentração (10%), onde a produção foi 1,7 vezes maior que a produção de γ -decalactona pela *L. saturnus*

UFLA CES-Y677. Quando foram comparadas as leveduras, observou diferença significativa nas 3 concentrações, sendo a *L. saturnus* UFLA CES-Y677 a que mais produziu γ -decalactona utilizando glicerol como substrato.

Em relação à utilização de *Y. lipolytica* para a produção de γ -decalactona, vários estudos sobre os rendimentos da produção do aroma já foram analisados (ZINJARDE, 2014). Quanto à utilização de *L. saturnus*, não foram encontrados outros estudos a respeito desse tema abordado neste presente trabalho.

Ao se tratar da capacidade dessas duas espécies *Y. lipolytica* e *L. saturnus* crescerem em meio contendo glicerol, dois trabalhos recentemente foram publicados Rywinska et al. (2013) (*Yarrowia lipolytica*) e Teixeira (2013) (*Lindnera saturnus*).

Os resultados experimentais de Gervais e Pécot (1991) mostraram que as células de *Sporidiobolus salmonicolor* cresceram na presença de altas concentrações de glicerol acumulando quantidades elevadas de γ -decalactona.

Em outro estudo, Gervais et al. (1992) mostraram que a produção de γ -decalactona foi grandemente aumentada no meio sem glicose. A produção do aroma específico foi 0,75 vezes mais elevada quando se utilizou glicerol do que quando se utilizou glicerol + glicose. Assim, a utilização de glicerol como fonte de carbono por *S. salmonicolor* conduziu a mudanças metabólicas.

Estes trabalhos citados corroboram com os resultados apresentados neste estudo onde o glicerol bruto foi utilizado pelas leveduras para a produção de γ -decalactona.

Do ponto de vista econômico, a levedura *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9.4 foi a que apresentou melhor resultado. Com apenas 10% de glicerol bruto, produziu 5 g/L de γ -decalactona. Do ponto de vista biotecnológico, a levedura *L. saturnus* UFLA CES-Y677 já se apresenta como a melhor, pois utilizou 20% desse resíduo para produzir a mesma quantidade de γ -decalactona. Este

resultado é muito satisfatório, pois a produção de biodiesel tem gerado crescentemente grandes quantidades desse resíduo, que além de levar uma queda no preço de venda (biodiesel), gera vários problemas ambientais se descartados no meio ambiente em grandes quantidades sem nenhum tratamento (RIVALDI et al., 2008). Portanto produtores de biodiesel estão à procura de novas aplicações para o glicerol bruto.

Atualmente, o mercado não consegue absorver a totalidade da sua produção, pois os produtores admitem até diminuir a produção do biodiesel por não saberem como dispor adequadamente deste coproduto (glicerol) (SILVEIRA, 2012).

Assim, os resultados obtidos neste trabalho vêm colaborar na tentativa de dar um destino a esse resíduo, através de alternativas biotecnológicas e potencialmente viáveis que aproveitam esse glicerol residual.

A produção de γ -decalactona a partir do óleo de rícino chamou a atenção para alguns detalhes como não apresentar a produção da mesma nas concentrações de 10 e 30% da levedura *L. saturnus* UFLA CES-Y677 e na concentração de 30% da *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9.4. Assim sendo, o tratamento que teve diferença significativa para a *L. saturnus* UFLA CES-Y677 foi o de 20% com maior produção do composto. Para a *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9.4 não houve diferença significativa entre os tratamentos 10 e 20%. Se tratando de diferenças observadas entre as leveduras, apenas na concentração de 10% constatou-se esse evento, sendo a *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9.4 melhor, uma vez que a *L. saturnus* UFLA CES-Y677 não apresentou produção nesta concentração.

O fato das duas leveduras *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9.4 e *L. saturnus* UFLA CES-Y677 não apresentarem produção de γ -decalactona na concentração de 30% de óleo de rícino, pode estar relacionado com a produção de lipases com baixo nível de atividade, o que limita a libertação do ácido ricinoleico presente

no óleo, e conseqüentemente a produção de γ -decalactona (GOMES et al., 2013). Segundo esse mesmo autor, 30 g/L de óleo de rícino (CO) foi a concentração ótima para a produção de γ -decalactona por *Yarrowia lipolytica* uma vez que as outras duas concentrações testadas (10 e 50 g/L) apresentaram resultados inferiores e semelhantes, sendo o processo cada vez mais lento quando usadas concentrações mais elevadas de óleo.

Outro fator importante que interfere no acúmulo de γ -decalactona é a forma como o substrato está disposto para a utilização das leveduras. Várias formas podem ser encontradas como óleo de rícino, metil ricinoleico e ácido ricinoleico propriamente dito.

A utilização do óleo hidrolisado feito a partir de um pré-tratamento realizado com enzimas comerciais foi sugerido por Gomes et al. (2013) a fim de diminuir a fase de latência para a secreção de γ -decalactona.

Testes preliminares foram realizados por Alchihab et al. (2010c) a fim de comparar a produção de γ -decalactona por *R. aurantiaca*, utilizando ácido ricinoleico puro e óleo de rícino. Nenhuma diferença significativa foi observada na produção γ -decalactona, que chegou a 5,2 g/L após 10 dias de cultura.

A fonte de ácido ricinoleico utilizada por Gomes, Teixeira e Belo (2010) foi metil ricinoleico (MR), em diferentes concentrações (10, 30 e 50 g/L). Uma produção máxima de γ -decalactona (471 mg/L) foi obtida com 50 g/L de MR. De acordo com esse estudo, maiores concentrações de MR melhorou a produção de γ -decalactona. Com relação à produtividade volumétrica, o valor mais elevado (14,9 mg/L) foi obtido com 30 g/L MR com células não lavadas.

O acúmulo de γ -decalactona está diretamente relacionado com a concentração de MR, ocorrendo maior produção de aroma quando a concentração do substrato foi mais elevada (GOMES et al., 2011).

Dufossé et al. (1998), mostraram que a concentração de γ -decalactona obtida no sobrenadante de *Sporidiobolus ruinenii* aumentou quase que

proporcionalmente com o aumento na concentração de ácido ricinoleico entre 0 e 160 g/L.

Observa-se, então, que na literatura apresentada em geral, as maiores concentrações de óleo de rícino foram as melhores para a produção de γ -decalactona. Outros autores, no entanto, relatam que concentrações baixas do substrato apresentam melhores resultados em relação à produção do aroma γ -decalactona.

A produção máxima de γ -decalactona foi conseguida, utilizando-se o metil ricinoleico como substrato com uma concentração de 10 g/L (GOMES et al., 2013).

O rendimento de 3-hidroxi- γ -decalactona foi alcançado em um tempo mais curto de incubação para as concentrações mais baixas do substrato metil ricinoleico (5 g/L em 30 horas, 15 g/L para 50 horas e 30 g/L para 80 horas) (GARCÍA et al., 2009).

Alchihab et al. (2009) avaliando os efeitos da concentração de óleo de mamona na produção de γ -decalactona pelas cepas psicotrófica e mesófilas de *Rhodotorula aurantiaca*, perceberam que a concentração de γ -decalactona obtida com a estirpe A19 não era proporcional à concentração do óleo de rícino adicionado. Com 10 dias de cultivo em frascos, o mais elevado rendimento de γ -decalactona (5,5 g/L) foi com 20 g/L de óleo de rícino, sendo a produção reduzida quando teores mais elevados do óleo de rícino foram utilizados (30, 40, 50, e 60 g/L).

Endrizzi, Awadé e Belin (1993) observaram resultados semelhantes, onde uma elevada concentração do ácido ricinoleico diminuiu o rendimento de γ -decalactona produzido por *Pichia guilliermondii*.

Divergências na literatura quanto à melhor concentração de óleo de rícino utilizada para a produção de γ -decalactona podem ser atribuídas a vários fatores como pH, temperatura, aeração, agitação, forma de cultivo, disposição do

substrato e também o tempo de cultivo (ALCHIHAB et al., 2010c; GOMES et al., 2013).

Mesmo com a influência de todos esses parâmetros sobre a produção de γ -decalactona, e mesmo este trabalho não sendo um processo de otimização para sua produção, as melhores condições para o crescimento e produção foram respeitadas e utilizadas de acordo com as referências encontradas na literatura. Assim sendo, os valores obtidos neste estudo para produção de γ -decalactona propriamente dita foram excelentes quando comparados com a literatura.

O valor máximo de γ -decalactona alcançado neste presente estudo pelas duas leveduras *Y. lipolytica* UFLA e *L. saturnus* UFLA CES-Y677 CM-Y9.4 foram nas concentrações de 10 e 20% tanto para o glicerol bruto (5 g/L) como para o óleo de rícino (3 g/L) em 120 horas de cultivo. No trabalho de Krzyczkowska (2012) a estirpe de *Yarrowia lipolytica* KKP 379 foi capaz de produzir 1,68 g/L de γ -decalactona em meio contendo 100 g/L de óleo de rícino com 168 horas de cultivo. Moradi, Asadollahi e Nahvi (2013) obtiveram rendimentos iniciais de 65 e 70 mg/L de γ -decalactona que aumentaram para 220 mg/L quando a fermentação ocorreu em batelada alimentada.

Usando as condições ideais (pH = 6,17 e DO = 44,4%) apontadas pelo modelo estatístico proposto por Gomes et al. (2011), a concentração máxima de γ -decalactona alcançada foi 680,9 mg/L.

Usando a estratégia de batelada alimentada, um máximo de 1867 mg/L de γ -decalactona foi obtido após 85 h e foi ligeiramente inferior a 1993 mg/L obtida no modo de batelada após 12 h de biotransformação (GOMES; TEIXEIRA; BELO, 2012).

Após 6 dias de cultura utilizando uma concentração de 20 g/L de óleo de rícino, 6,5 e 4,5 g/L de γ -decalactona foram obtidos em biorreatores de 20 e 100 L respectivamente (ALCHIHAB et al., 2010c).

Braga, Gomes e Belo (2012) relatam que a maior produção de γ -decalactona (1,600 mg/L) foi obtida sem um indutor da lipase.

Os valores máximos de γ -decalactona (6,6 g/L e 0,1 g/L) foram atingidos após 6 e 3 dias de cultivo pelas cepas psicrófila e mesófila de *R. aurantiaca* respectivamente (ALCHIHAB et al., 2009).

4.4 Análise do consumo de glicerol

Após a constatação de que a produção de γ -decalactona foi maior quando se utilizou glicerol bruto como substrato, foi avaliado o seu consumo pelas leveduras testadas *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9.4 e *L. saturnus* UFLA CES-Y677.

Avaliando o consumo de glicerol notou-se que os resultados obtidos foram bem expressivos, principalmente pela *L. saturnus* UFLA CES-Y677 entre 10 e 20 g/L de glicerol consumido (Tabela 4).

Tabela 4 Consumo de Glicerol bruto (g/L) pelas leveduras *L. saturnus* UFLA CES-Y677 e *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9.4 após 120 horas de cultivo em diferentes concentrações 10, 20 e 30%.

Cepa	Concentrações Glicerol bruto		
	10%	20%	30%
<i>L. saturnus</i> UFLA CES-Y677	10,00 ^{Aa}	20,00 ^{Bb}	11,33 ^{Ba}
<i>Y. lipolytica</i> UFLA CM-Y9.4	13,67 ^{Bc}	4,33 ^{Ab}	0,00 ^{Aa}

Médias com letras minúsculas para a mesma variável na mesma linha diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott. Médias com letras maiúsculas para a mesma variável na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott.

Estatisticamente, considerando-se a variação na concentração da fonte de carbono, essa levedura apresentou diferença significativa apenas na concentração de 20%, na qual foi observado maior consumo (20 g/L), diferente da *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9.4 que apresentou o menor consumo nesta mesma concentração (4,3 g/L). O consumo de glicerol por *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9.4

estatisticamente difere nas três concentrações testadas, sendo o maior consumo (13,7 g/L) observado no meio adicionado de 10% de glicerol. Em relação às leveduras testadas, houve diferença estatística nos três tratamentos, sendo que a *L. saturnus* UFLA CES-Y677 apresentou maior consumo de glicerol em todas as concentrações.

O glicerol bruto devido à sua ampla ocorrência na natureza e também aos elementos nutricionais presentes que são fáceis de serem metabolizados por microrganismos, tem sido utilizado com sucesso como uma única fonte de carbono e energia para a produção de alguns produtos de valor agregado por várias bactérias, leveduras, fungos e microalgas (SILVA; MACK; CONTIERO, 2009; THOMPSON; HE, 2006).

As leveduras em especial, são caracterizadas por sua capacidade de melhor assimilação de glicerol do que os fungos filamentosos e apresentam maior produção de biomassa em comparação a alguns zigomicetos (CHATZIFRAGKOU et al. 2011).

Uma variedade de espécies de leveduras foi testada quanto à sua capacidade de utilizar glicerol bruto como fonte única de carbono para a produção de biomassa. Em geral, as impurezas do glicerol bruto não têm qualquer impacto significativo sobre o crescimento microbiano das leveduras testadas e apenas seis delas não cresceram (TACCARI et al., 2012).

Teixeira (2013) testaram 40 leveduras quanto à capacidade de crescer em diferentes concentrações (10, 20 e 30%) de glicerol puro e bruto. Quatro leveduras foram selecionadas para posteriores testes, dentre as selecionadas estavam a *Yarrowia lipolytica* UFLA CM-Y9.4 e a *Lindnera saturnus* UFLA CES-Y677.

Sporidiobolus salmonicolor é capaz de crescer em altas concentrações de glicerol (GERVAIS; PÉCOT, 1991; GERVAIS et al., 1992).

Entre as espécies de leveduras mais utilizadas para a conversão de glicerol bruto, estão *Yarrowia lipolytica*, *Rhodotorula* e *Candida sp.* (ANDRÉ et al., 2009; CHATZIFRAGKOU et al., 2011; EASTERLING et al., 2009; MAKRI; FAKAS; AGGELIS, 2010; SAENGE et al., 2011).

Todas as revisões apresentadas em relação ao consumo de glicerol respaldam e confirmam o perfil comportamental das leveduras perante a fonte de carbono oferecida observado no presente trabalho.

Uma vez que o glicerol bruto não seja usado diretamente para a produção de γ -decalactona pelas leveduras, ao consumi-lo elas podem produzir outros metabólitos de interesse, e quando não, produzem intermediários para a síntese dos mesmos.

Rywinska et al. (2013) fazem uma revisão sobre a utilização do glicerol bruto (um substrato promissor) por *Y. lipolytica* e suas aplicações biotecnológicas. Relatam que o glicerol bruto tem sido utilizado com sucesso para a produção de vários metabólitos de *Y. lipolytica*.

Em condições limitadas de nitrogênio em meio à base de glicerol, os lipídeos produzidos por *Y. lipolytica* foram representados principalmente por ácidos oléico, linoléico, palmítico e ácido palmitoléico. Uma vez que esses lipídeos produzidos pelas leveduras oleaginosas como *Y. lipolytica* se tornem única fonte de carbono no meio de cultura, estas podem utilizá-los e produzir aromas como γ -decalactona (CHATZIFRAGKOU et al., 2011).

O ácido oléico pode ser convertido em ácido 10-hidroxiesteárico e conseqüentemente em γ -dodecalactone por *Sporobolomyces odorus* (HAFFNER; TRESSL, 1996). Assim, Na, Joo e Oh (2014) propuseram uma via metabólica do ácido 10-hidroxiesteárico para produzir γ -dodecalactone através da biotransformação por leveduras.

A bioconversão do glicerol adiciona significativamente valor à produtividade na indústria de biodiesel. Através deste papel, exemplos de

possíveis processos de produção biotecnológica baseados em glicerol demonstram que esta é uma nova fonte de carbono abundante e promissora para a indústria microbiológica (SILVA; MACK; CONTIERO, 2009). A bioconversão de glicerol através de processos biotecnológicos em produtos de maior valor agregado como biomassa e biomoléculas, é uma alternativa relevante para a maior valorização da produção de biodiesel (ITO et al., 2005).

5 CONCLUSÃO

A partir dos parâmetros analisados conclui-se que há uma correlação entre os mesmos, pois uma vez que um maior número de células foi obtido nas concentrações de 10 e 20% de glicerol bruto para *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9.4 e *L. saturnus* UFLA CES-Y677 respectivamente, também se obteve acidificação do meio, maior produção de γ -decalactona e para confirmar um maior consumo de glicerol, nessas mesmas concentrações.

Com relação ao óleo de rícino como substrato, não houve crescimento celular nas concentrações de 10 e 30% para *L. saturnus* UFLA CES-Y677 e na de 30% para *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9.4, conseqüentemente não houve acidificação do meio nem produção de γ -decalactona nessas concentrações. No entanto, a *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9.4 na concentração de 10 e 20% de óleo de rícino, se comportou de forma distinta, havendo maior crescimento celular, acidificação ou não do meio, e maior produção de γ -decalactona.

O máximo de γ -decalactona (3 g/L) produzido a partir da biotransformação do óleo de rícino foi pela *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9.4. O valor máximo alcançado de γ -decalactona pelas leveduras *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9.4 e *L. saturnus* UFLA CES-Y677 a partir da biotransformação do glicerol foi de 5 g/L, sendo que *L. saturnus* UFLA CES-Y677 apresentou, de modo geral, maior produção.

Neste estudo o glicerol bruto surge como um substrato alternativo bem sucedido para a produção de γ -decalactona apresentando melhores resultados em relação ao óleo de rícino, assim como a nova espécie *L. saturnus* UFLA CES-Y677 que mostrou ter elevado potencial para uma maior produção de γ -decalactona a partir do glicerol bruto, diminuindo o custo do processo e solucionando um problema ambiental.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, C. A. Chapter 10, Production of Antioxidants, Aromas, Colours, Flavours, and Vitamins by Yeasts. In: QUEROL, A.; FLEET, G. H. (Ed.). **The Yeast Handbook - Yeasts in Food and Beverages**. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, p. 285-334, 2006.
- AGUEDO, M. et al. Increased Electron Donor and Electron Acceptor Characters Enhance the Adhesion between Oil Droplets and Cells of *Yarrowia lipolytica* As Evaluated by a New Cytometric Assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 3007-3011, 2003.
- AGUEDO, M. et al. The use of enzymes and microorganisms of the production of aroma compounds from lipids. **Food Technology and Biotechnology**, v. 42, p. 327-336, 2004.
- ALBERTAZZI, E. et al. Biogenesis of 2 phenylethanol and 2-phenylethylacetate important aroma components. **Biotechnology Letters**, v. 5, p. 491- 496, 1994.
- ALCHIHAB, M. et al. Production of γ -decalactone by a Psychrophilic and a Mesophilic Strain of the Yeast *Rhodotorula aurantiaca*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 158, p. 41-50, 2009.
- ALCHIHAB, M. et al. Peroxisomal β -oxidation and Production of γ -decalactone by the Yeast *Rhodotorula aurantiaca*. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 38, n. 2, p. 68-72, 2010a.
- ALCHIHAB, M. et al. Production d'arômes de type lactone par des levures. **Biotechnology Agronomy Society and Environment**, v. 14, p. 681-691, 2010b.
- ALCHIHAB, M. et al. The utilization of gum tragacanth to improve the growth of *Rhodotorula aurantiaca* and the production of γ -decalactone in large scale. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 233-241, 2010c.
- AN, J. U.; JOO, Y. C.; OH, D. New Biotransformation Process for Production of the Fragrant Compound γ -dodecalactone from 10 Hydroxystearate by Permeabilized *Waltomyces lipofer* Cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 8, p. 2636, Feb. 2014.

ANDRE, A. et al. Biotechnological conversions of bio-diesel-derived crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* strains. **Engineering in Life Sciences**, New York, v. 9, n. 6, p. 468-478, 2009.

AZEVEDO, E. C. et al. Aplicação de Indentação Instrumentada na Caracterização Mecânica de Poliuretana Derivada de Óleo de Mamona. **Revista Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 19, nº 4, p. 336-343, 2009.

BELTRÃO, N. E. M. Informações sobre o biodiesel, em especial feito com o óleo de mamona. Comunicado Técnico 177. Campina Grande, PB. 2003. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/CNPA/16664> > Acesso em: 27 de agosto de 2012.

BERNINGER, G. et al. Structure and metabolic control of the *Yarrowia lipolytica* peroxisomal 3-oxoacyl-CoA-thiolase gene. **European Journal Biochemistry**, v. 216, p. 607-613, 1993.

BLIN-PERRIN, C. et al. Metabolism of ricinoleic acid into γ -decalactone : β -oxidation and long chain acyl intermediates of ricinoleic acid in the genus *Sporidiobolus* sp. **FEMS Microbiology Letters**, v. 188, n. 1, p. 69-74, 2000.

BORSCHIVER, S. Desafios da sustentabilidade. **Revista Brasileira de Engenharia Química**, v. 22, p. 24-25, 2006.

BRAGA, A. C. Biotransformação do óleo de rícino em aromas por *Yarrowia lipolytica*. 2009. 107 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biológica) - Universidade do Minho. Nov. 2009.

BRAGA, A.; GOMES, N.; BELO, I. Lipase Induction in *Yarrowia lipolytica* for Castor Oil Hydrolysis and Its Effect on γ -decalactone Production. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 89, p. 1041-1047, 2012.

BRAGA, A.; BELO, I. Immobilization of *Yarrowia lipolytica* for Aroma Production from Castor Oil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, p. 2202-2211, 2013.

BRUNS, T. D.; WHITE, T. J.; TAYLOR, J. W.; "Fungal Molecular Systematics", **Annual Review Ecology and Systematics**, v. 22, p.525-564, 1991.

CAVALCANTI, M. L. F. et al. Tolerância da mamoneira BRS 149 à salinidade: germinação e características de crescimento. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 9, suplemento, p. 57-61, 2005.

CHATZITRAGKOU, A. et al. Biotechnological conversions of derived biodiesel by yeast and fungal species. **Energy**, Oxford, v. 36, n. 2, p. 1097-1108, Feb. 2011.

CHEETHAM, P. S. J.; MAUME, K. A.; ROOJI, J. F. **Production of lactones**. Patent EP 0258 993, 1988.

CHEETHAM, P. S. J. Combining the technical push and the business pull for natural flavours. **Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology**, v. 55, p. 1-49, 1997.

DUARTE, S. H. **Utilização de glicerol proveniente da síntese do biodiesel para a produção de lipídeos por leveduras silvestres**. Campinas, SP: [s.n], 2011.

DUFOSSE, L. et al. Production of γ -decalactone and 4-hidroxy-decanoic acid in the genus *Sporodiobolus*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 86, n. 2, p. 169-173, 1998.

EASTERLING, E. R. et al. 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.

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

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

ENDRIZZI, A. et al. Production of lactones and peroxisomal β -oxidation in yeasts. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 16, p. 301-329, 1996.

FAIRBANKS, M. Glicerina. **Revista Química e Derivados**, n. 487, 12 p. 2009.

FAKAS, S. et al. Lipids of *Cunninghamella echinulata* with emphasis to γ -linolenic acid distribution among lipid classes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 73, n. 3, p. 676-683, July 2006.

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

FERON, G. et al. Prospects for the microbial production of food flavours. **Trends Food Sci Technol**, v. 7, p. 285-293, 1996b.

FERREIRA, D. F. Sisvar: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, v. 6, p. 36-41, 2008.

GARCÍA, E. E. et al. Production of 3-hydroxy- γ -decalactone, the precursor of two decenolides with flavouring properties, by the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 57, p. 22-26, 2009.

GATFIELD, I. L. et al. Some aspects of the microbiological production of flavour-active lactones with particular reference to γ -decalactone. **Chemie, Mikrobiologie, Technologie der Lebensm**, v. 15, p. 165-170, 1993.

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

GATFIELD, I. L. Enzymatic and microbial generation of flavours. **World Ingred**, v. 40, p. 31-35, 1996.

GATFIELD, I. L. Biotechnological production of natural flavor materials. In: TERANISHI, R.; WICK, E. L.; HORNSTEIN, I. (Eds.). **Flavor chemistry, thirty years of progress**. Kluwer Academic Publishers: New York, p. 211-227, 1999.

GERVAIS, P.; BATTUT, G. Influence of Water Potential on γ -decalactone Production by the Yeast *Sporidiobolus salmonicolor*. **Applied and Environmental Microbiology**, France, v. 55, n. 11, p. 2939-2943, Nov. 1989.

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

GERVAIS, P. et al. Osmoregulation Mechanisms of the Yeast *Sporidiobolus salmonicolor*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 1717-1721, 1992.

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

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

GOMES, N. et al. Oil-in-water emulsions characterization by laser granulometry and impact on γ -decalactone production in *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnology Letters**, v. 33, p. 1601-1606, 2011.

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

GOMES, N.; TEIXEIRA, J. A; BELO, I. Fed-batch versus batch cultures of *Yarrowia lipolytica* for γ -decalactone production from methyl ricinoleate. **Biotechnology Letters**, v. 34, n. 4, p. 649-54, Apr. 2012.

GOMES, N. et al. Impact of Lipase-Mediated Hydrolysis of Castor Oil on γ -decalactone Production by *Yarrowia lipolytica*. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 90, p. 1131-1137, 2013.

GOPINATH, M. et al. Optimization of environmental conditions and kinetics modeling for the production of γ -decalactone using *Sporidiobolus salmonicolor*. **International Journal of Biotechnology & Biochemistry**, v. 3, n. 2, p. 60-68, 2008.

GUO, Y. et al. Effect of POX3 gene disruption using self-cloning CRF1 cassette in *Yarrowia lipolytica* on the γ -decalactone production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 2807-2812, 2011.

GUO, Y. et al. Expression of POX2 gene and disruption of POX3 genes in the industrial *Yarrowia lipolytica* on the γ -decalactone production. **Microbiological Research**, v. 167, p. 246-252, 2012.

HAFFNER, T.; TRESSL, R. Biosynthesis of (R)- γ -decanolactone in the yeast *Sporobolomyces odorus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p.1218-1223, 1996.

ITO, T. et al. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, p. 260-265, 2005.

JANSSENS, L. et al. Production of flavours by microorganisms. **Process Biochemistry**, v. 27, p. 195-215, 1992.

KAMZOLOVA, S. V. Citric acid production by yeast grown on glycerol-containing waste from biodiesel industry. **Food Technology and Biotechnology**, v. 49, p. 65-74, 2011.

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

KRZYCZKOWSKA, J. The use of castor oil in the production of γ -decalactone by *Yarrowia lipolytica* KKP 379. **Cheminé Technologija**, v. 3, p. 1392-1231, 2012.

LAGES, F.; SILVA-GRAÇA, M.; LUCAS, C. Active glycerol uptake is a mechanism underlying halotolerance in yeasts: a study of 42 species. **Microbiology**, v. 145, p. 2577-2585, 1999.

LE DO, T. T. et al. Traditional fermented sausage 'Nem chua' as a source of yeast biocatalysts efficient for the production of the aroma compound γ -decalactone. **International Journal of Food Science and Technology**, 2013.

LEE, S.; LIN, S.; CHOU, C. Growth of and Production of γ -decalactone by *Sporobolomyces odorus* in Jar Fermentors as Affected by pH, Aeration and Fed-Batch Technique. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 80, n. 2, p. 195-199, 1995.

LEE, S. et al. Effect of physical factors on the production of γ -decalactone by immobilized cells of *Sporidiobolus salmonicolor*. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 8, p. 845-850, 1999.

- LONGO, M. A.; SANROMÁN, M. A. Production of Food Aroma Compounds : Microbial and Enzymatic Methodologies. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 3, p. 335-353, 2006.
- MADIGAN, M. et al. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1128 p.
- MAKRI, A.; FAKAS, S.; AGGELIS, G. Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeated batch cultures. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 7, p. 2351-2358, Apr. 2010.
- MARASCO, E. K.; DANNERT, C. S. Biosynthesis of plant natural products and characterization of plant biosynthetic pathways in recombinant microorganisms. In: VERPOORTE, R. et al. **Applications of Plant Metabolic Engineering**, Springer, p. 1-43, 2007.
- MAUME, K. A.; CHEETHAM, P. S. J. The production of γ -decalactone fermentation of castor oil. **Biocatalysis**, v. 5, p. 79-97, 1991.
- MIGUEL, M. G. C. P. et al. Physico-chemical and microbiological characterization of corn and rice 'calugi' produced by Brazilian Amerindian people. **Food Research International**, v. 49, p. 524-532, 2012.
- MORADI, H.; ASADOLLAHI, M. A.; NAHVI, I. Improved γ -decalactone production from castor oil by fed-batch cultivation of *Yarrowia lipolytica*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 64-68, jan. 2013.
- MOREIRA, F. M. S.; HUISING, E. J. E.; BIGNELL D. E. **Manual de Biologia dos Solos Tropicais: Amostragem e caracterização da biodiversidade**. Lavras: Ed. UFLA, 2010. 367 p.
- NETO, R.; PASTORE, G.; MACEDO, G. Biocatalysis and Biotransformation Producing γ -decalactone. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 9, p. 677-680, 2004.
- NGUYEN, Q. et al. Metabolomics methods for the synthetic biology of secondary metabolism. **FEBS Letters**, v. 586, n. 15, p. 2177-2183, 2012.
- NICAUD, J. M. et al. **Bioconversion of substrate with microbe auxotrophic for compound in medium deficient in this compound**. FR 2734843, 1996.

NUNES, M. R. S.; MARTINELLI, M.; PEDROSO, M. M. Epoxidação do óleo de mamona e derivados empregando o sistema catalítico $vo(acac)_2/TBHP^{\#}$. **Química Nova**, v. 31, n. 4, p. 818-821, 2008.

OGUNNIYI, D. Castor oil: a vital industrial raw material. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1086-1091, 2006.

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

OMELIANSKI, V. L. Aroma-producing microorganisms. **Journal of Bacteriology**, v. 8, p. 393-419, 1923.

OSMUNDSSEN, H.; BREMER, J.; PEDERSEN, J. I. Metabolic aspects of peroxisomal β -oxidation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1085, p. 141-158, 1991.

PAGOT, Y. et al. Utilization of an auxotrophic strain of the yeast *Yarrowia lipolytica* to improve γ -decalactone production yields. **Letters in Applied Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 113-6, ago. 1997.

PAGOT, Y. et al. Peroxisomal β -oxidation activities and γ -decalactone production by the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 49, p. 295-300, 1998.

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

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Biotechnological valorization of biodiesel derived glycerol waste through production of single cell oil and acid citric by *Yarrowia lipolytica*. **Lipid Technology**, Oxford, v. 21, n. 4, p. 83-87, Apr. 2009.

PASTORE, G. M. et al. Production of fruity aroma by newly isolated yeast. **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 4, p. 389-392, 1994.

PINHEIRO, R.; BELO, I.; MOTA, M. Air pressure effects on biomass yield of two different *Kluyveromyces* strains. **Enzyme and Microbial Technology**, 1999.

- PINHEIRO, R.; BELO, I.; MOTA, M. Oxidative stress response of *Kluyveromyces marxianus* to hydrogen peroxide, paraquat and pressure. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, p. 842-847, 2002.
- PINHEIRO, D. M. **Biotransformação de terpenos em compostos de aroma**. Campinas SP, [s.n.], 2003.
- PUTHLI, M. S.; RATHOD, V. K.; PANDIT, A. B. Enzymatic hydrolysis of castor oil : Process intensification studies. **Biochemical Engineering Journal**, v. 31, n. 1, p. 31-41, 2006.
- RABENHORST, J.; GATFIELD, I. **Method of producing γ -decalactone**. Patent WO 0024920, 2000.
- RIVALDI, J. D. et al. Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção do biodiesel. **Biociência, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 37, p. 44-51, mar. 2008.
- ROCHA, D. Q. et al. Determinação da matéria-prima utilizada na produção do biodiesel adicionado ao diesel mineral através de monitoramento seletivo de íons. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1062-1066, 2008.
- ROMERO-GUIDO, C. et al. Biochemistry of lactone formation in yeast and fungi and its utilisation for the production of flavour and fragrance compounds. **Applied microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 3, p. 535-47, feb. 2011.
- RYWINSKA, A. et al. Glycerol as a promising substrate for *Yarrowia lipolytica* biotechnological applications. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 48, p.148-166, Jan. 2013.
- SAENGE, C. et al. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 210-8, 2011.
- SANTOS, E. O. Aproveitamento do glicerol gerado na síntese de biodiesel para produção de biomassa de leveduras. 2009. 90 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande. 2009.
- SCHMID, A. et al. Industrial biocatalysis today and tomorrow. **Nature**, v. 109, p. 258-268, 2001.

SCHOLLER, C. E. G. et al. Volatile metabolites from actinomycetes. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 50, p. 2615-2621, 2002.

SCHOLZ, V.; SILVA, J. N. Prospects and risks of the use of castor oil as a fuel. **Biomass and Bioenergy**, v.32, p. 95-100, 2008.

SCHRADER, J. et al. Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavor compounds current industrial processes and future prospects. **Biotechnology**, v. 26, p. 463-472, 2004.

SILVA, A. R. D. Biotransformação do ácido ricinoleico e do ricinoleato de metila na presença de leveduras *Candida oleophila* e *Candida Guilliermondii*. 2002. 124 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina. Dez. 2002.

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.

SILVEIRA, L. Glicerina gerada na produção do biodiesel terá novos usos. Biodieselbr online. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com>> Acesso em dezembro de 2012.

SPINNLER, H. E. C. et al. Analysis of metabolic pathways by the growth of cells in the presence of organic solvents. **Proceedings of the National Academy Sciences, USA**, v. 93, p. 373-3376, 1996.

STEELE, D. B.; STOWER, M. D. Techniques for selection of industrially important microorganisms. **Annual Review Microbiology**, v. 45, p. 89-106, 1991.

TACCARI, M. et al. Screening of yeasts for growth on crude glycerol and optimization of biomass production. **Bioresource Technology**, Essex, v. 110, p. 488-495, Feb. 2012.

TAKANO, E. H. et al. Inibição do desenvolvimento de fungos fitopatogênicos por detergente derivado de óleo da mamona (*Ricinus communis*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.5, p. 1235-1240, set-out, 2007.

TEIXEIRA, K. S. Produção de lipídeos e ácido cítrico por levedura selvagem crescida em glicerol. 2013. 87 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, Abr. 2013.

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

TURKI, S. et al. An enhanced process for the production of a highly purified extracellular lipase in the non conventional yeast *Yarrowia lipolytica*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 1371-1385, 2010.

TYRRELL, M. N. Evolution of natural flavor development with the assistance of modern technologies. **Food Technology**, v. 44, n. 1, p. 68-72, 1990.

TYRRELL, M. N. Advances in natural flavors and materials. **Perfect Flavor**, v. 20, p. 13-21, 1995.

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

WACHÉ, Y. et al. Involvement of acyl coenzyme A oxidase isozymes in biotransformation of methyl ricinoleate into γ -decalactone by *Yarrowia lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 1233-1236, 2000.

WACHÉ, Y. et al. Role of β -Oxidation Enzymes in γ -decalactone Production by the Yeast *Yarrowia lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 12, p. 5700-5704, 2001.

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

WACHÉ, Y. et al. Yeast as an efficient biocatalyst for the production of lipid-derived flavours and fragrances. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 89, p. 405-416, 2006.

WANG, R.; THORPE, C. The reductive half-reaction in acyl-CoA oxidase from *Candida tropicalis*: interaction with acyl-CoA analogues and an unusual thioesterase activity. **Archives Biochemistry and Biophysics**, v. 286, p. 504-510, 1991.

WANG, H. J. et al. Evaluation of Acyl Coenzyme A Oxidase (Aox) Isozyme Function in the n -Alkane-Assimilating Yeast *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 17, p. 5140-5148, 1999.

WINK, J. et al. **Pfirsich Aroma, Verfahren zur Herstellung und seine Verwendung**. Patent EP 286 950, 1988.

YILMAZTEKIN, M.; TAY, S. Enhanced production of isoamyl acetate via biotransformation with *Lindnera saturnus* by in situ product removal with macroporous adsorption resins. **European Yeast Flavour**, July. 2013.

ZINJARDE, S. S. Food-related applications of *Yarrowia lipolytica*. **Food Chemistry**, v. 152, p. 1-10, 2014.

APÊNDICE

Ao analisar a Figura 6, pode-se observar que as curvas de crescimento para as duas leveduras foram semelhantes. Apresentaram uma fase lag relativamente curta, observada no período de aproximadamente 6 horas de cultivo. A partir desse tempo (6 horas), foi observada a fase exponencial ou fase log. Nessa fase a reprodução celular encontra-se extremamente ativa, sendo um período de intensa atividade metabólica, o que justifica também o aumento acentuado da DO. A fase log ou fase exponencial de crescimento durou até as 18 horas de cultivo para as duas leveduras. Após esse tempo iniciou-se a fase estacionária.

Apêndice A Padronização do Inóculo

Previamente ao estudo do processo de biotransformação, promoveu-se o crescimento das duas leveduras testadas, *Lindnera saturnus* UFLA CES-Y677 e *Yarrowia lipolytica* UFLA CM-Y9.4, em meio YEPG (Figura 6), a fim de verificar o final da fase exponencial de crescimento de cada uma, para posteriormente inoculá-las no meio de biotransformação. As condições de operação usadas neste crescimento foram de 140 rpm e 28°C durante 48 horas.

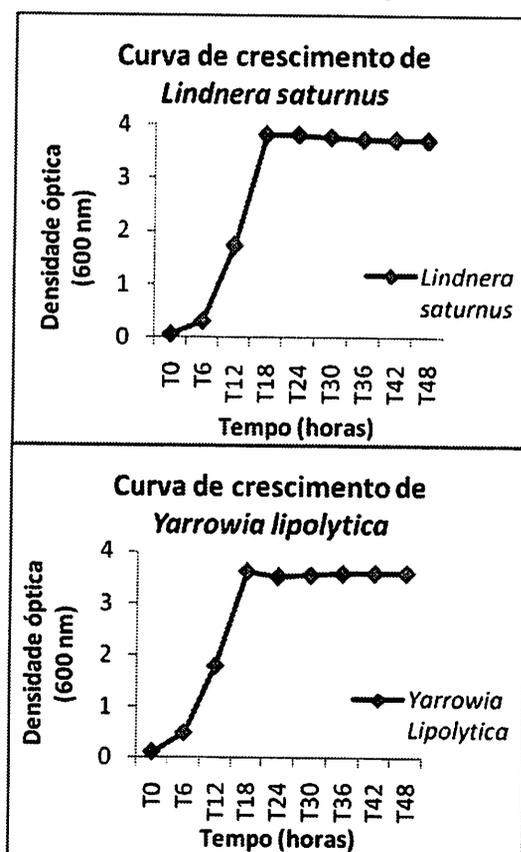


Figura 6 Curva de crescimento da *Lindnera saturnus* UFLA CES-Y677 e da *Yarrowia lipolytica* UFLA CM-Y9.4 obtida a partir da densidade óptica (600 nm) ao longo de 48 horas de cultivo.