



**KARLA SILVA TEIXEIRA**

**PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS E ÁCIDO CÍTRICO  
POR LEVEDURA SELVAGEM CRESCIDA EM  
GLICEROL**

**LAVRAS – MG**

**2013**

**KARLA SILVA TEIXEIRA**

**PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS E ÁCIDO CÍTRICO POR LEVEDURA  
SELVAGEM CRESCIDA EM GLICEROL**

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

Orientador

Dr. Disney Ribeiro Dias

Coorientadora

Dra. Rosane Freitas Schwan

**LAVRAS – MG**

**2013**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Teixeira, Karla Silva.

Produção de lipídeos e ácido cítrico por leveduras crescidas em glicerol / Karla Silva Teixeira. – Lavras : UFLA, 2013.

87 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Disney Ribeiro Dias.

Bibliografia.

1. Biodiesel. 2. Biodiesel - subproduto. 3. Microorganismos oleaginosos. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 576

**KARLA SILVA TEIXEIRA**

**PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS E ÁCIDO CÍTRICO POR LEVEDURA  
SELVAGEM CRESCIDA EM GLICEROL**

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

APROVADA em 17 de Abril de 2013.

Dra. Rosane Freitas Schwan      UFLA

Dra. Carla Ávila                      UFLA

Prof. Diogo Teixeira Carvalho      UNIFAL

Dr. Disney Ribeiro Dias  
Orientador

**LAVRAS – MG**

**2013**

Aos meus pais, João e Neuza;

A minha irmã, Franciane;

Aos meus sobrinhos, Álvaro e Daniel;

E ao meu marido Thiago...

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela grandiosa oportunidade de realizar um sonho, por todo amor, cuidado, carinho pela minha vida e também por me conceder sabedoria, força, entendimento e fé em todos os momentos;

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Biologia;

Ao Professor Dr. Disney Ribeiro Dias, pela orientação, confiança, paciência e todos os ensinamentos;

À Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan, pelos ensinamentos e apoio para a concretização deste trabalho;

Ao Professor Dr. Whasley Duarte, pelos ensinamentos, apoio e ajuda nas análises cromatográficas;

Aos Profs. Drs., Cristina, Eustáquio e Patrícia, pelos valiosos ensinamentos;

À Juliana, pela valiosa ajuda e a Cidinha, pela confiança, suporte de fé, carinho e também por todo apoio nas análises cromatográficas;

À FAPEMIG, pela concessão da bolsa de estudos;

À Carla Ávila, pela amizade;

Aos pós-doutorandos, Gabriela, Simone, Karina e Cíntia;

À Rose, pela paciência e amizade;

Aos colegas de laboratório Kelly, Vanessa Mesquita, Mariana Dias, Igor, Bia, Cláudia Auler, Cláudia Puerari, Ana Luiza, Carol, Mariana Rabelo, Bárbara, Débora, Noelly, Elaine, Ivani, Paulinho, Pedro, Luciana, Ana Paula, Monique, Anayara e Juliana (as meninas do vinagre) pelos momentos de descontração e lazer;

As minhas amigas, Alenir, Fernanda, Suzana e Angélica, pela fundamental ajuda, pelos conselhos, pelos valiosos ensinamentos e por fazerem os meus dias de trabalhos mais felizes e agradáveis;

A minha distante, mas sempre presente amiga Allana;

Aos meus amigos; Elen e Juninho, Thaísa e Gustavo, Glenda e Mário Henrique, Debynha e Jessé, Tati e Alex, Marcinha e Nado, entre outros, que fizeram os meus momentos de folga mais divertidos;

A minha irmã Franciane, meu cunhado Gelésio e sobrinhos Álvaro e Daniel (que está por vir), que mesmo distantes nunca deixaram de me sustentar com palavras e orações;

A minha vó D. Elza, pelo carinho, amor e incentivo;

Ao meu marido Thiago, pela compreensão, pela ausência nas muitas noites e madrugadas, pelas noites e finais de semana em que me fez companhia no laboratório, pela paciência, pelo amor, carinho, cuidado e incentivo;

Aos meus pais; João e Neuza, por não terem deixado, em nenhum momento, de medir forças para ajudar e me apoiar em tudo que foi necessário. Pelo incentivo, educação, amor, companheirismo, carinho, pela criação, por estarem sempre ao meu lado. Esta conquista é mais de vocês do que minha!

E a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para realização e conclusão deste trabalho.

Muito Obrigada!

“Porque estou certo de que nem a morte, nem a vida, nem os anjos, nem os principados, nem as potestades, nem o presente, nem o porvir, nem a altura, nem a profundidade, nem alguma outra criatura nos poderá separar do amor de Deus, que está em Cristo Jesus, nosso Senhor!”

**Romanos 8:38-39**



## RESUMO GERAL

O aumento rápido nos valores do petróleo bruto, e a diminuição na oferta têm despertado o interesse pelos biocombustíveis nos últimos anos. Alternativas de combustíveis renováveis estão recebendo considerável atenção, sendo o biodiesel um dos mais proeminentes recursos. Glicerol é o principal subproduto obtido a partir da produção do biodiesel, e é responsável por aproximadamente 10% do volume total do biodiesel produzido. Tendo em vista o crescimento de leveduras em meio contendo glicerol como fonte de carbono, o objetivo com este trabalho foi utilizar o glicerol bruto, obtido a partir da produção de biodiesel, para o cultivo de leveduras selvagens, visando à produção de lipídeos microbianos contribuindo para a produção de biodiesel e ácido cítrico. Quarenta leveduras foram testadas quanto ao crescimento em glicerol bruto e comercial. Quatro leveduras (*Lidnera saturnus* UFLA CES-Y677, *Yarrowia lipolytica* UFLA 9.4, *Rhodotorula glutinis* NCYC 2439 e *Cryptococcus curvatus* NCYC 476) foram então selecionadas para testes em concentrações elevadas de glicerol bruto e comercial (10 20 e 30%). A levedura *Y. lipolytica* UFLA 9.4 foi selecionada devido sua capacidade em se manter viável em concentrações de 30% de glicerol bruto e seu alto consumo de glicerol ao longo da fermentação. Esta levedura foi então submetida a testes para produção de lipídeos, onde em concentrações de 30 g/L de glicerol bruto obteve-se 63,4% de lipídeos microbianos. No perfil de ácidos graxos houve o predomínio dos ácidos esteárico e palmítico. Na otimização dos parâmetros para a produção de ácido cítrico e foi observado uma produção de 0,19 g/L nas condições de 30 °C, 184 rpm de agitação e 38,4 g/L de glicerol bruto. Concluindo que a levedura *Yarrowia lipolytica* UFLA 9.4 em condições adequadas apresenta capacidade em produzir quantidades consideráveis de lipídeos e ácido cítrico.

Palavras-chave: Biodiesel. Microorganismos oleaginosos. Subproduto.

## GENERAL ABSTRACT

The rapid increase in the value of crude petroleum and the decrease in the supply have awakened the interest biofuels in recent years. Alternatives for renewable fuels have been receiving a considerable amount of attention, with biodiesel being one of the most prominent resources. Glycerol is the main byproduct obtained in the production of biodiesel and is responsible for approximately 10% of the total volume of biodiesel produced. Bearing in mind the growth of yeast in a medium containing glycerol as a source of carbon, the objective of this work was to use crude glycerol, obtained from the production of biodiesel, to cultivate wild yeast, aiming at the production of microbial lipids contributing for the production of biodiesel and citric acid. Forty yeasts were tested in regard to growth in crude and commercial glycerol. Four yeasts (*Lidnera saturnus* UFLA CES-Y677, *Yarrowia lipolytica* UFLA 9.4, *Rhodotorula glutinis* NCYC 2439 and *Cryptococcus curvatus* NCYC 476) were selected for testing in elevated crude and commercial glycerol concentrations (10, 20 and 30%). The *Y. lipolytica* yeast UFLA 9.4 was selected due to its capacity of maintaining viable in concentrations of 30% of crude glycerol and its high glycerol intake along the fermentation. This yeast was then submitted to lipid production tests which, in concentrations of 30 g/L of crude glycerol, obtained 63.4% of microbial lipids. In the fatty acid profile, occurred the predominance of the acids stearic and palmitic. We observed the production of 0.19 g/L in the parameter optimization for the formation of citric acid, in conditions of 30 °C, agitation of 184 rpm and 38.4 g/L of crude glycerol. We concluded that the *Yarrowia lipolytica* UFLA 9.4 yeast, in adequate conditions, presents the capacity of producing considerable amounts of lipids and citric acid.

Keywords: Biodiesel. Oleaginous microorganisms. Byproduct.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

Figura 1	Transesterificação para a produção de biodiesel .....	18
Figura 2	Estrutura do glicerol .....	20
Figura 3	Geração de glicerol residual durante a produção de biodiesel .....	26
Figura 4	Via de degradação do glicerol para formação de lipídeos .....	33
Figura 5	Estrutura química dos ácidos linoleico e linolênico .....	36

### CAPÍTULO 2

Figura 1	O efeito das concentrações de 10, 20 e 30% de glicerol puro no crescimento das leveduras <i>Lidnerasaturnus</i> UFLA CES-Y677 (a), <i>Yarrowialipolytica</i> UFLA CM-Y9. 4 (b), <i>Rhodotorulaglutinis</i> NCYC 2439 (c) e <i>Cryptococcuscurvatus</i> NCYC 476 (d) .....	66
Figura 2	Efeito das concentrações de 10, 20 e 30% de glicerol bruto no crescimento das leveduras <i>Lidnerasaturnus</i> UFLA CES-Y677 (a), <i>Yarrowialipolytica</i> UFLA CM-Y9. 4 (b), <i>Rhodotorulaglutinis</i> NCYC 2439 (c) e <i>Cryptococcuscurvatus</i> NCYC 476 (d). Conjunto que gráficos que representam o crescimento das leveduras em glicerol puro e bruto .....	67
Figura 3	Crescimento em YEPG (meio sem glicerol) das leveduras <i>Lidnera saturnus</i> UFLA CES-Y677 (a), <i>Yarrowia lipolytica</i> UFLA CM-Y9. 4 (b), <i>Rhodotorula glutinis</i> NCYC 2439 (c) e <i>Cryptococcus curvatus</i> NCYC 476 (d) .....	68

Figura 4	Produção de lipídeos nas concentrações de 15, 25, 30 e 35 g/L de glicerol bruto pela levedura <i>Y. lipolytica</i> UFLA CM-Y9. 4 estão indicadas no eixo primário, relacionando-se a população da levedura <i>Y. lipolytica</i> UFLA CM-Y9. 4 expressa em Log UFC/mL, no eixo secundário .....	69
Figura 5	Produção de lipídeos por <i>Y. lipolytica</i> UFLA CM-Y9. 4 nas concentrações iniciais de 15, 25, 30 e 35 g/L de glicerol bruto no meio de cultivo durante 48 horas sob agitação de 150 rpm e temperatura de 30±2 °C, relacionado ao glicerol consumido pela levedura nas diferentes concentrações.....	70
Figura 6	Valores experimentais <i>versus</i> valores estatisticamente significativos previstos pelo modelo para produção de ácido cítrico.....	75
Figura 7	Gráficos de superfície de resposta da produção de ácido cítrico. (I) Produção em função da concentração de glicerol e temperatura. (II) Produção de ácido cítrico em função da agitação e concentração de glicerol e (III) Produção de ácido cítrico em função da agitação e temperatura .....	76

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

Tabela 1	Matérias-primas utilizadas na produção do biodiesel e composição de seus respectivos óleos.....	23
Tabela 2	Composição lipídica em % de alguns microrganismos.....	28
Tabela 3	Teor de óleo presentes em alguns microrganismos .....	30

### CAPÍTULO 2

Tabela 1	Leveduras obtidas da coleção de microrganismos do laboratório de Fisiologia e Genética de Microrganismos da Universidade Federal de Lavras utilizadas no teste para crescimento em glicerol bruto e glicerol comercial.....	52
Tabela 2	Valores das variáveis independentes e seus códigos utilizados nesse experimento .....	56
Tabela 3	Valores codificados das variáveis independentes, e suas combinações, utilizados na avaliação da produção de ácido cítrico por leveduras.....	56
Tabela 4	Composição química do glicerol bruto .....	60
Tabela 5	Valores de absorvância em Abs (600 nm).....	62
Tabela 6	Glicerol consumido pelas leveduras <i>Y. lipolytica</i> UFLA CM-Y9, 4, <i>C. curvatus</i> NCYC 476 e <i>R. glutinis</i> NCYC 2439 ao longo de 120 horas de crescimento, em meio de cultivo contendo contendo 100 g/L de glicerol bruto, mantido sob agitação de 150 rpm e temperatura de 28±2 °C;.....	65
Tabela 7	Percentual do perfil de ácidos graxos a partir dos lipídeos encontrados nas concentrações de 15, 25, 30 e 35 g/L de glicerol bruto produzido por <i>Y. lipolytica</i> UFLA CM-Y9. 4.....	71

Tabela 8	Matriz apresentando os valores reais e os codificados com os valores experimentais e a produção de ácido cítrico e população....	72
Tabela 9	Coefficiente de regressão para resposta Ácida cítrico .....	74
Tabela 10	Resultados da produção de ácido cítrico no meio inicial* e ideal** .....	77

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO .....	17
2.1	Biodiesel .....	17
2.2	Glicerol: principal resíduo do processo de transesterificação .....	19
2.3	Biodiesel – Glicerol – Biodiesel .....	23
2.4	Metabólitos Microbianos .....	27
2.5	Microrganismos oleaginosos .....	28
2.6	Lipídeos Microbianos .....	30
2.7	Ácidos graxos .....	34
2.8	Produção de Ácido cítrico .....	36
2.9	Produção de lipídeos por leveduras do gênero <i>Yarrowia</i> .....	39
2.9.1	<i>Cryptococcus</i> .....	41
2.9.2	<i>Rhodotorula</i> .....	41
	REFERÊNCIAS .....	43
	Capítulo 2 Produção de lipídeos e ácido cítrico por levedura selvagem crescida em glicerol .....	48
1	INTRODUÇÃO .....	50
2	MATERIAL E MÉTODOS .....	52
2.1	Microrganismos .....	52
2.2	Glicerol .....	54
2.3	Pré-seleção de leveduras capazes de crescer em glicerol .....	54
2.4	Meio de cultivo, condições e preparo do inóculo .....	54
2.5	Seleção de leveduras em cultivos submersos .....	55
2.6	Produção de ácido cítrico - Desenho experimental .....	55
2.7	Determinação da produção de ácido cítrico e consumo de glicerol ..	57
2.8	Produção de lipídeos .....	58
2.9	Extração e determinação de lipídeos .....	58
2.10	Determinação de ácidos graxos .....	59
3	RESULTADOS .....	60
3.1	Seleção de leveduras capazes de crescer em glicerol .....	60
3.2	Produção de lipídeos .....	68
3.3	Consumo de glicerol .....	70
3.4	Perfil dos ácidos graxos .....	71
3.5	Otimização na produção de ácido cítrico .....	72
4	DISCUSSÃO .....	79
5	CONCLUSÃO .....	84
	REFERÊNCIAS .....	85

## **CAPÍTULO 1**

### **1 INTRODUÇÃO**

Com o rápido aumento nos valores do petróleo bruto, e a diminuição na oferta têm despertado o interesse pelos biocombustíveis nos últimos anos. Para lidar com esses problemas, alternativas de combustíveis renováveis estão recebendo considerável atenção, sendo um dos mais proeminentes recursos o biodiesel (MENG et al., 2009).

A crescente produção de biodiesel libera grandes quantidades de glicerol residual, aparecendo como o principal subproduto de processos de transesterificação aplicada na produção do biodiesel (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2009). Devido o grande acúmulo de glicerol no ambiente e a crescente busca por combustíveis renováveis, surgiu o interesse pela produção de biocombustíveis por microrganismos utilizando o glicerol como fonte de carbono, sendo uma das formas biotecnológicas de valorização do glicerol bruto sua conversão em lipídeo microbiano e ácido cítrico (CHATZIFRAGKOU et al., 2011).

Dentre os lipídeos, os triacilgliceróis ou triglicerídeos são os de estruturas mais simples e seus precursores e derivados em células eucarióticas estão sendo cada vez mais reconhecidos devido ao progresso da engenharia genética e avanços tecnológicos. Isso vem atraindo cada vez mais o interesse para o estudo do metabolismo lipídico em vários organismos, destacando-se os microrganismos oleaginosos, direcionados para a produção de biodiesel, construindo um campo biotecnológico emergente com muitas aplicações promissoras (BEOPOULOS; NICAUD; GAILLARDIN, 2011; NELSON; COX, 2011; NIELSEN, 2009; PENZ JÚNIOR; SILVA; RODRIGUES, 1993).



Na produção de ácido cítrico por fermentação submersa, uma grande variedade de substratos pode ser utilizada, principalmente os subprodutos e resíduos da agroindústria, sendo estes economicamente importantes do ponto de vista ambiental, pois além de reduzir o impacto que causam sobre a natureza valorizam os resíduos agrícolas e agroindustriais (SILVA et al., 2006).

Este trabalho foi realizado com os principais objetivos de: utilizar o glicerol bruto residual da produção de biodiesel, para o cultivo de leveduras selvagens, visando à produção de lipídeos microbianos contribuindo para a produção de biodiesel e ácido cítrico; selecionar leveduras capazes de crescer em meios contendo diferentes concentrações de glicerol puro (comercial e de alto grau analítico) e glicerol bruto (resíduo da produção de biodiesel); selecionar a melhor levedura para posterior produção de lipídeos e ácido cítrico e avaliar a influência dos parâmetros que influenciam a produção de ácido cítrico.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Biodiesel**

O uso comercial do biodiesel começou no Brasil para atingir as metas estabelecidas em janeiro de 2005 pelo Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel sob o número da Lei 11.097. Por meio de incentivos governamentais, esse biocombustível foi introduzido na matriz energética brasileira, com adição obrigatória de pelo menos 2% (B2) até 2008 e de 5% (B5) em 2013, em mistura com o diesel convencional. Devido a este programa de sucesso, ainda em 2011, o nível do biodiesel aumentou para 5% na nova legislação (CUNHA et al., 2012).

Biodiesel pode ser definido principalmente como éster metílico, ou em menor medida como éster etílico ou butílico, resultante da transesterificação de óleos e gorduras naturais (PAPANIKOLAOU et al., 2002). O biodiesel representa uma alternativa de combustível para vários motores a diesel e aquecimento de sistemas (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2009). A maior parte do biodiesel atualmente produzido no mundo deriva do óleo de soja, utilizando metanol e catalisador alcalino, porém, todos os óleos vegetais enquadrados na categoria de óleos fixos ou triglicerídeos, podem ser transformados em biodiesel (FERRARI; OLIVEIRA; SCABIO, 2004). Para avaliar o potencial do biodiesel como um substituto do combustível convencional, são determinadas características como densidade, viscosidade, ponto de inflamação e ponto de solidificação. Um critério importante para o biodiesel é o glicerol que funciona como quantidade residual de triglicerídeos e glicerídeos parciais no biodiesel (MENG et al., 2009). Os processos atuais de produção de biodiesel estão concentrados na reação de transesterificação (Figura 1) de um óleo vegetal ou gordura animal, com álcool, metanol ou etanol, na presença de catalisadores,

como hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio (PAPANIKOLAOU et al., 2002).

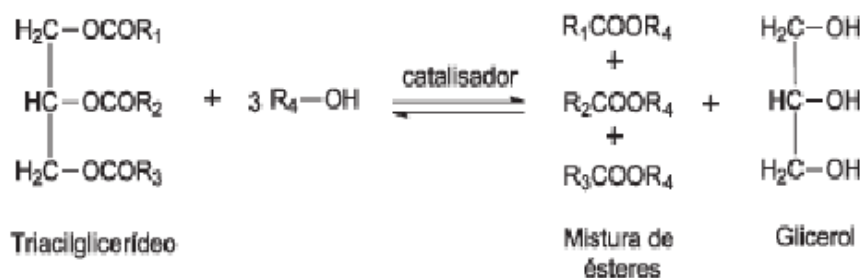


Figura 1 Transesterificação para a produção de biodiesel

Fonte: Modificado (LI; ZHAO; BAI, 2007).

O biodiesel tem apresentado vantagens sobre o diesel do petróleo, pois não é tóxico e é proveniente de fontes renováveis, além da melhor qualidade das emissões durante o processo de combustão (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2009). Embora o biodiesel forneça uma quantidade de energia cerca de 10% menor que o diesel do petróleo, seu desempenho no motor é praticamente o mesmo no que diz respeito à potência e ao torque. Por apresentar maior viscosidade, o biodiesel proporciona maior lubricidade que o diesel mineral, logo, tem-se observado redução no desgaste das partes móveis do motor (LÔBO; FERREIRA; CRUZ, 2009).

A utilização de biodiesel como combustível apresenta um potencial promissor no mundo inteiro, sendo um mercado que cresce aceleradamente devido, em primeiro lugar, a sua enorme contribuição ao meio ambiente, com a redução dos níveis de poluição ambiental, principalmente nos grandes centros urbanos (FERRARI; OLIVEIRA; SCABIO, 2004). Em segundo lugar, como fonte estratégica de energia renovável em substituição ao óleo diesel e outros

derivados do petróleo. Assim, a rápida expansão na capacidade de produção do biodiesel é observada não somente em países desenvolvidos, mas também em países em desenvolvimento como China, Brasil, Argentina, Indonésia e Malásia (LI; ZHAO; BAI, 2007). No Brasil, esta é uma tecnologia bastante adequada, devido à disponibilidade de óleo de soja e álcool etílico derivados da cana-de-açúcar (FERRARI; OLIVEIRA; SCABIO, 2004).

O Brasil consome cerca de 35 milhões de t/ano de óleo diesel, assim, com a ampliação desse mercado, a redução nas importações seria expressiva, podendo inclusive minimizar o déficit de nossa balança comercial. Além disso, o processo de transesterificação tem como resultado a glicerina, e seu aproveitamento se apresenta como outro aspecto importante na viabilização do processo de produção do biodiesel, fazendo com que ele se torne competitivo no mercado de combustíveis (FERRARI; OLIVEIRA; SCABIO, 2004). O biodiesel ainda quando comparado a outros combustíveis fósseis, apresenta uma absorção muito maior no meio ambiente, e por essa razão é susceptível para a síntese de oxidação e degradação microbiana (WAZILEWSKI et al., 2013).

## **2.2 Glicerol: principal resíduo do processo de transesterificação**

Glicerol é o nome comum do composto orgânico 1,2,3-propanotriol, descoberto por Carl W. Scheele em 1779 durante a separação de uma mistura aquecida de PbO preparada com óleo de oliva (Figura 2). Os seus sinônimos são glicerina, trihidroxipropano, glicil álcool, gliceril e 1,2,3-trihidroxipropano. Na natureza, o glicerol existe em vegetais (soja, mamona, babaçu, girassol, palma, algodão, coco, dendê, pinhão manso) e animais em formas combinadas de glicerina com ácidos graxos (LAGES; SILVA-GRAÇA; LUCAS, 1999).

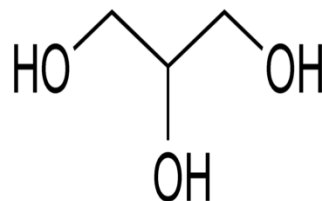


Figura 2 Estrutura do glicerol

O glicerol pode ser produzido por fermentação microbiana ou ainda quimicamente sintetizado a partir de matéria-prima petroquímica. A crescente produção de biodiesel fez com que houvesse grandes quantidades de águas concentradas com glicerol residual, aparecendo como o principal subproduto de processos de transesterificação aplicada na produção do biodiesel. O glicerol puro apresenta diversas aplicações como tintas, cosméticos, alimentos, fármacos, papel entre outras. No entanto, o glicerol residual de processos da produção do biodiesel necessita da purificação desses resíduos, tornando o custo muito elevado, trazendo desvantagem econômica. Entretanto, a utilização do glicerol bruto como matéria-prima para o estabelecimento de bio-refinarias pode representar uma alternativa com o objetivo de melhorar a economia da indústria de biodiesel (CHATZIFRAGKOU et al., 2011).

O glicerol bruto apresenta-se na forma de líquido viscoso pardo escuro, que contém quantidades variáveis de sabão, álcool (metanol ou etanol), monoacilglicerol, diacilglicerol, oligômeros de glicerol, polímeros e água. A porcentagem de glicerol na mistura varia entre 65 a 70% (p/p), sendo a maior parte das impurezas o sabão formado pela reação dos ácidos graxos livres com excesso de catalisador (saponificação). Dessa forma, o aspecto do glicerol bruto encontra-se estreitamente relacionado ao conteúdo de sabão, que proporciona aparência de viscoso escuro (OOI et al., 2004).

O glicerol constitui também uma fonte de carbono versátil com possíveis aplicações em fermentações industriais devido principalmente ao seu baixo custo e ampla disponibilidade. Estudos continuamente crescentes são apresentados na literatura relacionados com a valorização da matéria-prima glicerol, usando processos de fermentação microbiana (CHATZIFRAGKOU et al., 2011), a sua utilização na produção de ácidos orgânicos e ácidos graxos por leveduras (MAKRI; FAKAS; AGGELIS, 2010), e ainda, estratégias químicas e biotecnológicas têm sido desenvolvidas para obter produtos de valor acrescentado, utilizando glicerol bruto como substrato na tentativa de alcançar uma valorização biotecnológica do mesmo em processos industriais (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2009).

Uma das principais formas biotecnológicas de valorização do glicerol bruto é a sua conversão em lipídio microbiano (“single celloil-SCO”) e ácido cítrico. A produção desses compostos a partir do glicerol é comparável à produção a partir da glicose (CHATZIFRAGKOU et al., 2011; MAKRI; FAKAS; AGGELIS, 2010; PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2009; RYMOWICZ; RYWINSKA; GLADKOWSKI, 2007). A forma mais valorizada do glicerol refere-se ao seu derivado 1,3-propanodiol, um composto de importância significativa na indústria química e têxtil. Além disso, o glicerol tem sido empregado como substrato para a produção de outros metabólitos microbianos, tais como, ácidos orgânicos, lipídeos em fermentações realizadas por leveduras, fungos filamentosos e algas. Durante o catabolismo aeróbico, o glicerol entra na célula microbiana por meio da difusão facilitada e/ou transporte ativo. Então, é fosforilado em glicerol 3-P, seguido por oxidação a dihidroxiacetona 3-P, que é convertido em gliceraldeído 3-P. Este último entra na via glicolítica, transformando em ácido pirúvico e depois em acetil-CoA, precursor de uma variedade de produtos metabólicos (CHATZIFRAGKOU et al., 2011). A glicerina também pode ser utilizada como matéria-prima para produzir cetais e

acetais, em reações com acetona e formaldeído, bem como ésteres t-butílicos em reações com isobuteno (MIESIAC; ROGALINSKI; JOZWIAK, 2013).

Ao final do processo da produção de biodiesel, a separação da glicerina do biodiesel metílico ocorre por decantação, facilitando o processo de purificação. Na transesterificação, como o metanol é adicionado em excesso, forma-se duas fases: uma rica em metanol e outra rica em biodiesel. A glicerina distribui-se entre essas duas fases, predominando, porém, na fase metanólica. No entanto, quando se utiliza o etanol, a separação das fases dos produtos finais é complicada (BEATRIZ; ARAÚJO; LIMA, 2011).

O glicerol bruto como um subproduto da produção de biodiesel foi recuperado de sete diferentes óleos vegetais no intuito de avaliar a sua composição química e propriedades físicas (Tabela 1) (THOMPSON; HE, 2006). O glicerol após ser refinado é um valioso subproduto do biodiesel com centenas de aplicações na indústria, no entanto, este processo é muito dispendioso e fora do alcance econômico. Por esse motivo é que usos alternativos do glicerol bruto devem ser explorados para fazer o biodiesel mais competitivo no mercado global (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2009).

Tabela 1 Matérias-primas utilizadas na produção do biodiesel e composição de seus respectivos óleos

<b>Composição</b>	<b>Mostarda IdaGold</b>	<b>Mostarda PacGold</b>	<b>Colza</b>	<b>Canola</b>	<b>Soja</b>	<b>Crambe</b>	<b>Óleo de fritura</b>
<b>Cálcio (ppm)</b>	11,7	23	24,0	19,7	11,0	163,3	ND*
<b>Potássio (ppm)</b>	ND	ND	ND	ND	ND	216,7	ND
<b>Magnésio (ppm)</b>	3,9	6,6	4,0	5,4	6,8	126,7	0,4
<b>Fósforo (ppm)</b>	25,3	48,0	65,0	58,7	53,0	136,7	12,0
<b>Enxofre (ppm)</b>	21,0	16,0	21,0	14,0	ND	128,0	19,0
<b>Sódio(%)</b>	1,17	1,23	1,06	1,07	1,20	1,10	1,40
<b>Carbono(%)</b>	24,0	24,3	25,3	26,3	26,0	24,0	37,7
<b>Nitrogênio(%)</b>	0,04	0,04	0,05	0,05	0,04	0,06	0,12
<b>Gordura(%)</b>	2,03	1,11	9,74	13,1	7,98	8,08	60,1
<b>Carboidrato(%)</b>	82,8	83,8	75,5	75,2	76,2	78,6	26,9
<b>Proteína(%)</b>	0,14	0,18	0,07	0,06	0,05	0,44	0,23
<b>Caloria (kJ/kg)</b>	14,6	14,5	16,3	17,5	15,8	16,3	27,2
<b>Cinzas (%)</b>	2,8	1,9	0,7	0,65	2,73	0,25	5,5

Fonte: adaptado de Thompson e He (2006).

\*ND=Não detectado

### 2.3 Biodiesel – Glicerol – Biodiesel

Tendo em vista que o biodiesel deriva da transesterificação de triacilgliceróis rendendo ambos os ésteres graxos e a produção de glicerol, a significativa expansão do biodiesel resultaria na geração de grandes quantidades de glicerol. Em 2007, um excesso de 66.105 toneladas de glicerol ocorreu na Europa, enquanto que no mesmo ano na Alemanha (um dos principais países produtores de biodiesel) foi tratado como um típico “resíduo industrial” (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2009). Em contrapartida, este subproduto pode ser transformado em produtos de valor agregado, antes, porém, precisa ser



caracterizado por suas propriedades físicas, químicas e nutricionais (RYWINSKA et al., 2013).

Como resíduo, o glicerol bruto é o maior subproduto da indústria do biodiesel. Em geral, cerca de 10 kg de glicerol bruto são produzidos a cada 100 kg de biodiesel (SANTIBÁNEZ; VARNERO; BUSTAMANTE, 2011). O glicerol bruto também possui valor muito baixo devido a presença de impurezas e variações na composição que pode ser de acordo com a matéria-prima e o processo de biodiesel utilizado (THOMPSON; HE, 2006).

Apesar das aplicações do glicerol puro nas indústrias alimentícias, farmacêutica e de cosméticos, o refino do glicerol bruto a um alto grau de pureza é muito caro, especialmente para pequenos e médios produtores de biodiesel. Para melhorar a viabilidade econômica, alternativas para utilizar o glicerol bruto vem sendo estudadas, tais como combustão, compostagem na alimentação animal, conversão termoquímica e conversão biológica. Entre essas opções, a conversão biológica tem sido a mais utilizada, já que grande variedade de microrganismos é capaz de utilizar o glicerol como fonte de carbono e convertê-lo em ácidos graxos e ácidos orgânicos (CHATZIFRAGKOU et al., 2011; MAKRI; FAKAS; AGGELIS, 2010; RYMOWICZ; RYWIŃSKA; GLADKOWSKI, 2007; SANTIBÁNEZ; VARNERO; BUSTAMANTE, 2011).

Estudos também demonstraram que o glicerol bruto é uma fonte de carbono potencialmente adequada para a produção de ácido cítrico, eritrol e biomassa. Algumas espécies de leveduras produzem maior quantidade de ácido cítrico quando em substratos com glicerol puro do que glicose, o mesmo acontece quanto à produção de biomassa. A produção em grande quantidade desses compostos a partir de uma fonte de carbono mais econômica, também é de grande interesse na indústria de alimentos (PAPANIKOLAOU et al., 2002; RYMOWICZ; RYWIŃSKA; GLADKOWSKI, 2007; TACCARI et al., 2012).

Os ácidos graxos C18: 1 (ácido oleico) e C16: 0 (ácido palmítico) produzidos pela levedura *Yarrowia lipolytica* a partir de glicerol bruto, podem ser perfeitamente usados como material inicial para a síntese de biodiesel de “segunda geração, uma vez que a demanda vem crescendo continuamente e a utilização de biodiesel de “primeira geração” foi aumentando o custo de vários alimentos para animais (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2009). Essa situação levou a necessidade de descobrir fontes inovadoras de óleos, que podem ser subsequentemente convertidos em biodiesel (CHATZIFRAGKOU et al., 2011). A produção de SCO (óleo de células únicas) por *Y. lipolytica* e outras espécies de leveduras, mostraram outra alternativa para a valorização do glicerol bruto, uma vez que o processo pode ser integrado à produção de biodiesel. Instalações que já produziram SCO podem ser diretamente transformadas em biodiesel com a reciclagem completa do subproduto glicerol, diminuindo assim o custo da produção e de todo o processo (Figura 3) (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2009).

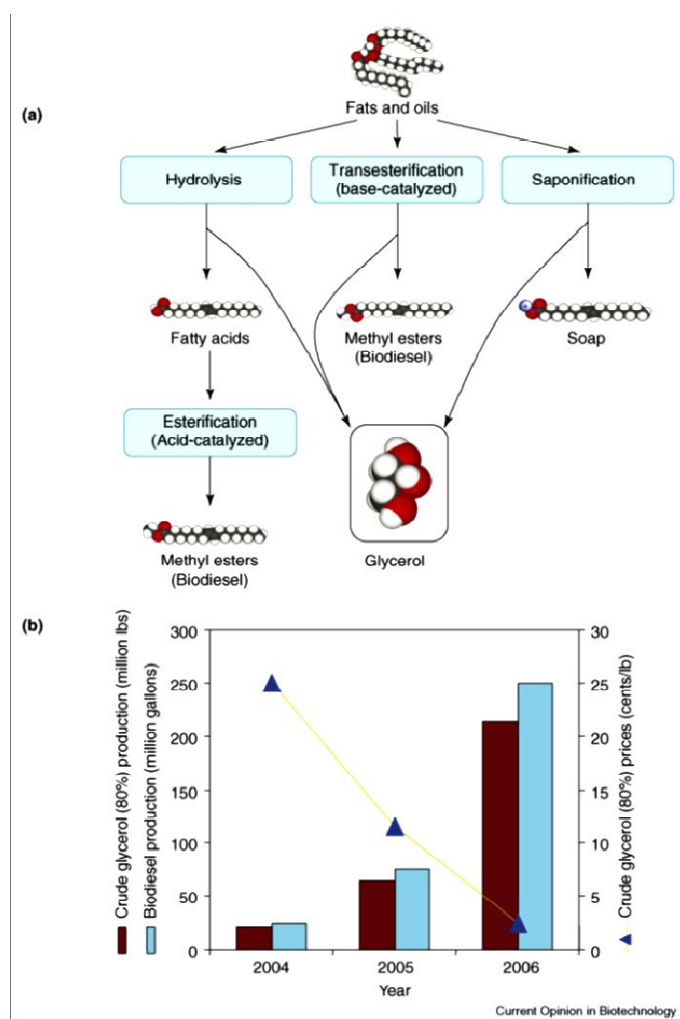


Figura 3 Geração de glicerol residual durante a produção de biodiesel

Fonte: (YAZDAN; GONZALEZ, 2007).

O glicerol bruto oriundo da produção de biodiesel tem se apresentado como uma alternativa a glicose como substrato para a produção de metabólitos microbianos. Além disso, ele tem sido valorizado por meio de tecnologia de fermentação pela sua biotransformação em 1,3-propanodiol, um composto de

importância significativa para a indústria têxtil e química (CHATZIFRAGKOU et al., 2011; PAPANIKOLAU; AGGELIS, 2009).

## **2.4 Metabólitos Microbianos**

Os microrganismos são rica fonte de produtos metabólicos úteis para as mais diversas indústrias. A maioria das reações bioquímicas necessárias para sintetizar uma nova célula foi elucidada, então o conhecimento do metabolismo primário está quase completo. Adicionalmente a estas reações essenciais, diretamente associadas ao crescimento celular balanceado, muitos microrganismos possuem capacidade de sintetizar uma grande variedade de metabólitos secundários. O foco atual é a procura de novos compostos que são produtos de metabolismo secundário. Os dois principais fatores que determinam a eficácia da seleção destes compostos são a avaliação do microrganismo produtor e o teste de seleção empregado (RYWINSKA et al., 2013).

Várias tendências estão impulsionando o desenvolvimento de bioprocessos e tecnologias, entre eles o aproveitamento da diversidade biológica para a produção econômica de biocombustível. No entanto, a capacidade de qualquer organismo deve ser modificada para a produtividade ou a eficiência de um bioprocessos. Neste sentido, os avanços na biologia podem ser usados para entender melhor a função celular e nortear futuros experimentos com a finalidade de desenvolver processos renováveis de biocombustível (GOWEN; FONG, 2011).

Os microrganismos oleaginosos também são caracterizados pela sua capacidade em usar o ácido cítrico como doador de acetil-CoA na via de anabolizantes, síntese de ácidos graxos. Quando os açúcares ou glicerol são usados como substratos, a produção de ácido cítrico é induzida pelo esgotamento das fontes de nitrogênio do meio. A limitação do nitrogênio provoca uma rápida

diminuição da concentração de AMP intracelular, devido a sua clivagem pela AMP-desaminase. Quando a concentração de ácido cítrico se torna maior do que um valor crítico, o ácido é secretado no citosol. No caso das leveduras oleaginosas, o ácido cítrico citosólico é clivado pela ATP-citratoliase (enzima chave no processo de acumulação de lipídios). Em contraste, microrganismos não-oleaginosos secretam o ácido cítrico acumulando em meios de cultura (PAPANIKOLAU; AGGELIS, 2009).

## 2.5 Microrganismos oleaginosos

Alguns microrganismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos são capazes de acumular grandes quantidades de lipídeos em sua célula, chegando a 70% do seu peso total, sendo, portanto, denominadas espécies oleaginosas, as quais têm atraído atenção para muitas pesquisas nos últimos anos (KARATAY; DONMEZ, 2010).

De acordo com os microrganismos e diferentes condições de cultura (tais como tempo, temperatura, pH etc.) o teor de lipídeos e sua composição podem ser diferentes (Tabela 2) (MENG et al., 2009).

Tabela 2 Composição lipídica em % de alguns microrganismos

<b>Microrganismos</b>	<b>C16:0</b>	<b>C16:1</b>	<b>C18:0</b>	<b>C18:1</b>	<b>C18:2</b>	<b>C18:3</b>
<b>Microalgas</b>	12-21	55-57	1-2	58-60	4-20	14-30
<b>Leveduras</b>	11-37	1-6	1-10	28-66	3-24	1-3
<b>Fungos</b>	7-23	1-6	2-6	19-81	8-40	4-42
<b>Bactérias</b>	8-10	10-11	11-12	25-28	14-17	-

Fonte: (MENG et al., 2009).

A investigação quanto à produção de metabólitos, dentre eles os lipídeos produzidos por microrganismos, é fundamental para obter uma visão nos detalhes da biossíntese lipídica e de sua regulação nos eucariotos. Além do seu interesse em pesquisas básicas, os lipídeos produzidos por leveduras representam fonte potencial de gordura comestível. As espécies oleaginosas, em particular, têm a capacidade de acumular grandes quantidades de lipídeos e são considerados como fontes alternativas para a produção de ácidos graxos poliinsaturados (FAKAS et al., 2006).

Leveduras e fungos são considerados microrganismos oleaginosos favoráveis. Algumas cepas de leveduras, tais como *Rhodopordium sp.*, *Rhodotorula sp.* e *Lipomyces sp.*, acumulam quantidades de lipídeos intracelulares que chegam a atingir 70% do peso da sua biomassa seca, enquanto que quando ela cresce sob condições limitantes de N, esses lipídeos consistem de 90% de triacilgliceróis, com uma porcentagem de ácidos graxos saturados de cerca de 44%, que é semelhante a muitos óleos de plantas. Embora haja muitos tipos de microrganismos que armazenam lipídeos, como microalgas, bacilos, fungos e leveduras (Tabela 3), nem todos eles são disponíveis para utilização na indústria, como para produção de biodiesel (MENG et al., 2009).

De acordo com Chatzifragkou et al. (2011), leveduras produzem ácido palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico e linoleico e pequenas quantidades de ácidos graxos de cadeia longa quando submetidas a fontes de glicerol em quantidades que variam de 30 a 90 g/L. Leveduras também 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. As melhores leveduras oleaginosas incluem os gêneros de *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* e *Yarrowia*. Estes microrganismos começam a acumular lipídeos quando um elemento do meio é limitante e a fonte de carbono (como a glicose) está em excesso. A limitação de

nitrogênio, por exemplo, é geralmente usado em estudos para acúmulos de lipídeos em microrganismos (BEOPOULOS et al., 2009; KIMURA; YAMAOKA; KAMISAKA, 2004).

Tabela 3 Teor de óleo presentes em alguns microrganismos

<b>Microrganismo</b>	<b>Teor de óleo (%)</b>	<b>Microrganismo</b>	<b>Teor de óleo (%)</b>
<u>Microalgas</u>		<u>Leveduras</u>	
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75	<i>Candida curvata</i>	58
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16-37	<i>Cryptococcus albidus</i>	65
<i>Nitzschia sp.</i>	45-47	<i>Lipomyces starkeyi</i>	64
<i>Schizochytrium sp.</i>	50-77	<i>Rhodotorula glutinis</i>	72
<u>Bactérias</u>		<u>Fungos</u>	
<i>Arthrobacter sp.</i>	>40	<i>Aspergillus oryzae</i>	57
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	27-38	<i>Mortierella isabellina</i>	86
<i>Rhodococcus opacus</i>	24-25	<i>Humicola lanuginosa</i>	75
<i>Bacillus alcalophilus</i>	18-24	<i>Mortierella vinacea</i>	66

Nota: (MENG et al., 2009).

## 2.6 Lipídeos Microbianos

Leveduras oleaginosas e microalgas têm sido relatadas na literatura pela significativa quantidade de lipídeos similares a óleos vegetais usados como fonte de carbono e energia. Os fungos filamentosos e leveduras são considerados como microrganismos oleaginosos favoráveis desde 1980. Nos recentes anos,

um grande número de lipídeos acumulados por microrganismos tem sido estudado como substratos para a produção de óleo de célula única (SCO), usadas especialmente na produção de biodiesel. Em microrganismos, a extensa acumulação de lipídeos é determinada pela constituição genética, onde o conteúdo de lipídeos pode variar de acordo com as espécies e cepas de indivíduos (MENG et al., 2009).

O papel dos lipídeos, os seus precursores e os seus derivados em células eucarióticas, está sendo cada vez mais reconhecido como campo emergente da 'lipidomics', impulsionado pelo progresso da engenharia genética e amplificado pelos avanços tecnológicos nas análises de lipídeos, está atraindo mais e mais interesse para o estudo do metabolismo dos lipídeos em vários organismos. Entre eles, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* oferece um número de vantagens devido à alta acessibilidade de sua genética clássica e molecular, a facilidade de cultivo e ainda seu curto tempo de geração. Consequentemente o aumento da gama de leveduras mutantes disponíveis oferece grandes oportunidades para modular o metabolismo dos lipídeos para estudar os efeitos produzidos em nível molecular e/ou celular (NIELSEN, 2009).

Os bioprocessos para a produção de lipídeos podem ser designados com base no conhecimento do metabolismo de *Yarrowia lipolytica*, levando em consideração a sua capacidade em obter grandes quantidades de intermediários e acumular lipídeos utilizando glicerol como substrato. Nesse contexto, quatro estados metabólicos podem ser definidos com diferentes funções na relação carbono/nitrogênio para um fluxo constante de nitrogênio. O primeiro corresponde ao baixo fluxo de carbono requerido para o crescimento. O segundo estado corresponde à taxa de crescimento máxima obtida com um ótimo fluxo de carbono para o citosol. O terceiro estado corresponde ao excesso do influxo de carbono para o citosol com alta taxa de carbono/nitrogênio, resultando na diminuição da biomassa e altos níveis na produção de lipídeos. O quarto estado



resulta na maior relação C/N, levando a repressão e acumulação de lipídeos a favor de metabólitos secundários. Se o produto final desejado do processo são lipídeos, o processo deve ser concebido de modo a assegurar a conversão máxima do carbono absorvido em lipídeos, minimizando o subproduto da produção (ácido cítrico) e maximizar a síntese de lipídeos, mantendo a célula em estado de crescimento (BEOPOULOS et al., 2009).

Entre os microrganismos, leveduras sendo unicelulares desprovidas de endotoxinas, passíveis de melhoramento genético e adequadas para fermentação em larga escala, são particularmente atraentes para o desenvolvimento de abordagens biotecnológicas (BEOPOULOS; NICAUD; GAILLARDIN, 2011).

Todos os microrganismos são capazes de sintetizar lipídeos, embora apenas as estirpes oleaginosas possam acumular dentro de suas células quantidades significativas de lipídeos (ou seja, >20% do seu peso seco). Em uma série de estudos foi demonstrado que microrganismos oleaginosos não possuem um sistema hiper ativo de biossíntese de ácidos graxos, mas são capazes de produzir quantidades significativas de acetil-CoA, sendo esta a unidade básica de biossíntese de ácidos graxos. A bioquímica, portanto, da biossíntese lipídica *de novo*, pode ser dividida em duas partes distintas: o metabolismo celular intermediário e a biossíntese de triacilgliceróis (TAGs) (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2011).

A Figura 4 apresenta a via de degradação do glicerol para formação de lipídeos. O produto líquido da glicólise é o ácido pirúvico, o qual passa por meio da membrana mitocondrial para matriz da mitocôndria. Piruvato-desidrogenase catalisa a formação de acetil-CoA a partir de ácido pirúvico e acetil-CoA pode entrar no ciclo de Krebs ou pode ser transportado novamente para dentro do citoplasma a fim de melhorar a biossíntese de ácidos graxos celulares (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2011).

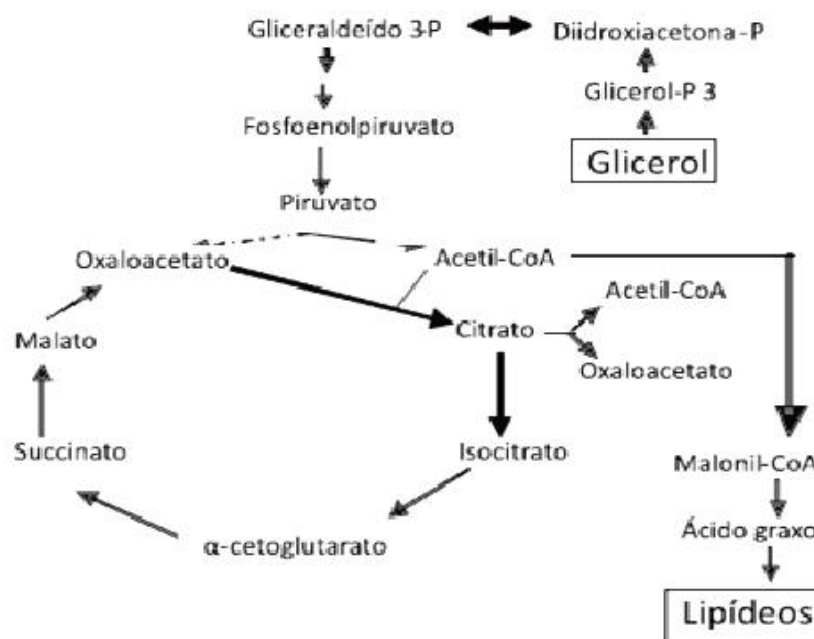


Figura 4 Via de degradação do glicerol para formação de lipídeos

Fonte: (WANG et al., 2001).

Ácido oleico é o ácido graxo predominante em leveduras oleaginosas, embora haja algumas exceções. Ácido palmítico é o segundo ácido graxo mais importante e o ácido linoleico o terceiro. O ácido linolênico pode ser detectado em quantidades menores. O triacilglicerol mais abundante encontrado em levedura é do tipo SUS (saturado, insaturado, saturado) e SUU (saturado, insaturado, insaturado). Os ácidos graxos encontrados são ácidos palmíticos e esteáricos em pequenas quantidades, o ácido insaturado mais encontrado é o oleico, embora possa encontrar algum ácido monoinsaturado ou poliinsaturado (RATLEDGE, 1982).

## 2.7 Ácidos graxos

Ácidos graxos, também classificados como ácidos orgânicos, são ácidos carboxílicos com cadeias hidrocarbonadas de comprimento variando de 4 a 36 carbonos. Em alguns ácidos graxos, essa cadeia é totalmente saturada (não contém ligações duplas) e não ramificada; em outros, a cadeia contém uma ou mais ligações duplas. Alguns poucos contêm anéis de três carbonos, grupos hidroxil ou ramificações de grupos metil. Os ácidos graxos são derivados de hidrocarbonetos, com estado de oxidação quase tão baixo quanto os hidrocarbonetos nos combustíveis fósseis (DIBNER; BUTTIN, 2002; NELSON; COX, 2011; PENZ JÚNIOR; SILVA; RODRIGUES, 1993).

Dentre os ácidos graxos atualmente estudados, os ácidos graxos poliinsaturados têm atraído considerável interesse, devido a sua aplicação farmacêutica e em compostos nutracêuticos. Estes podem ser definidos como sendo ácidos graxos de 18 ou mais carbonos, contendo duas ou mais ligações duplas, sendo essas ligações inseridas pela enzima dessaturase de ácidos graxos específicos que tem sido objeto de intensa pesquisa nas últimas décadas (BEAUDOIN et al., 2000). Os ácidos graxos poliinsaturados são classificados como  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6 com base na localização da última ligação dupla em relação ao grupo metil terminal da molécula (SCHMITZ; ECKER, 2008).

As famílias  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6 abrangem ácidos graxos que apresentam insaturações separadas apenas por um carbono metilênico, com a primeira insaturação no sexto e terceiro carbono, respectivamente enumerado a partir do grupo metil terminal. A cadeia dos ácidos graxos também é enumerada a partir da carboxila, de acordo com a designação delta, que é mais aplicada ao estudar as reações químicas que envolvem esses ácidos. Devido à diferença fisiológica entre as famílias  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 e à simplicidade da designação  $\omega$ , passou a ser mais

apropriado empregar esta designação ao estudar aspectos nutricionais envolvendo os ácidos graxos (MARTIN et al., 2006).

Os lipídeos constituídos de ácidos graxos mais simples esterificados ao glicerol são denominados triacilgliceróis, também chamados de triglicerídeos, gorduras ou gorduras neutras. Os triacilgliceróis são compostos por três ácidos graxos, cada um em ligação éster com o mesmo glicerol, nas posições 1, 2 e 3. Aqueles que contêm o mesmo tipo de ácido graxo em todas as três posições são chamados de triacilgliceróis simples, e sua nomenclatura é derivada do ácido graxo que contêm. Os triacilgliceróis simples de 16:0, 18:0 e 18:1, por exemplo, são tripalmitina, triestearina e trioleína, respectivamente. Para dar nome a esses compostos sem gerar ambiguidade, o nome e a posição de cada ácido graxo devem ser especificados (NELSON; COX, 2011).

No geral, os lipídeos podem ser gerados em duas vias diferentes nos microrganismos: (1) Síntese *de novo*, que envolve a produção, em condições definidas, de ácidos graxos a partir de precursores como acetil e malonil-CoA e sua integração na via Biosintética de estocagem de lipídeos na forma de triacilgliceróis; (2) via de acumulação *ex novo*, que está envolvida na absorção de ácidos graxos, óleos e triacilgliceróis (TAG) do meio de cultura e sua acumulação inalterada ou modificada na célula. Essa via requer hidrólise de substratos hidrofóbicos (HS) transporte de ácidos graxos para o interior da célula e sua remontagem em frações de TAG e SE (ésteres esterilicos) e são acumulados no corpo lipídico. O perfil lipídico também pode ser modificado pelo ajuste da temperatura, uma vez que a composição de ácidos graxos é dependente da temperatura da cultura, onde o grau de saturação geralmente diminui com o decréscimo da temperatura (BEOPOULOS et al., 2009).

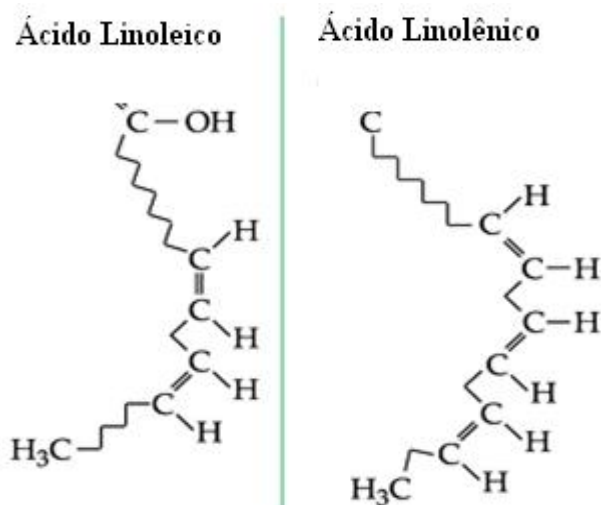


Figura 5 Estrutura química dos ácidos linoleico e linolênico

## 2.8 Produção de Ácido cítrico

O ácido cítrico (ácido 2-hidroxi-1, 2,3-propanotricarboxílico) possui fórmula molecular  $C_6H_8O_7$ , tem boa solubilidade em água a  $175\text{ }^\circ\text{C}$ , ponto de fusão de  $153\text{ }^\circ\text{C}$  e peso molecular de 192,12. É o principal componente ácido das frutas cítricas, constituindo um metabólito normal do organismo humano sendo completamente metabolizado. O ácido cítrico pode apresentar-se na forma de cristais translúcidos brancos, possui sabor ácido, não possui odor e é levemente higroscópico, e também está presente em todas as células vivas que necessitam de compostos de carbono como fonte de energia (RYWINSKA et al., 2013).

Com a descoberta da via glicolítica e do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) na década de 50, foi possível elucidar a biossíntese básica do ácido cítrico a partir da glicose. A base bioquímica do processo envolve três etapas: (a) quebra da glicose gerando piruvato e acetil-CoA por meio da glicólise, (b)

formação de oxaloacetato a partir do piruvato e CO<sub>2</sub> e (c) acúmulo do ácido cítrico no ciclo de Krebs (PANDEY et al., 2001).

Existem três processos diferentes para a produção do ácido cítrico: extração de frutas cítricas, síntese e fermentação. Desde 1920, a fermentação é o processo mais econômico e mais utilizado, representando mais de 90% da produção mundial de ácido cítrico por meio do cultivo de *Aspergillus niger*. O processo de obtenção do ácido cítrico por fermentação apresenta como vantagens operações simples, baixo consumo de energia e a não necessidade de um controle de sistema muito sofisticado (TIMEIS, 2012).

O ácido cítrico é classificado como sendo um produto microbiano com valor comercial, amplamente utilizado na indústria de alimentos, farmacêutica e de bebidas (IMANDI; KARANAN; GARAPATI, 2010). *Aspergillus niger* é o microrganismo mais comumente empregado para a produção desse ácido. Embora o ácido cítrico seja normalmente correlacionado ao ciclo do ácido cítrico, em determinados organismos como, como o *A. niger*, a excreção de grandes quantidades de ácido cítrico pode ser obtida porque o organismo utiliza o citrato como um quelante de ferro, a fim de ser internalizado na célula. A fermentação para obtenção de ácido cítrico é realizada aerobiamente em grandes fermentadores, sendo uma das necessidades básicas para um alto rendimento, o uso de meios deficientes em ferro. Assim, o meio utilizado na produção do ácido cítrico é tratado visando à remoção da maioria do ferro, e os fermentadores são confeccionados em aço inoxidável ou em vidro para impedir a lixiviação do ferro das paredes do fermentador nos baixos valores de pH resultantes do acúmulo do ácido cítrico (MADIGAN et al., 2010).

A levedura *Yarrowia lipolytica*, também apresenta capacidade de produzir ácido cítrico. Papanikolau et al. (2006) assumiram que a liase ATP-citrato é inativada quando em excesso de glicose, resultando nos baixos níveis de acumulação de lipídeos. Em algumas condições, como altas concentrações de

nitrogênio e baixas concentrações de carbono, a acumulação de lipídeos é sempre seguida pela produção de ácido cítrico (BEOPOULOS et al., 2009).

O processo de fermentação submersa tem sido o mais utilizado na produção de ácido cítrico em larga escala. Uma grande variedade de substratos pode ser utilizada na produção de ácido cítrico por fermentação submersa, principalmente os subprodutos e resíduos da agroindústria, sendo estes economicamente importantes do ponto de vista ambiental, pois além de reduzir o impacto que causam sobre a natureza valoriza os resíduos agrícolas e agroindustriais. Visando maior produtividade e baixo custo na geração de tecnologia de produção e aproveitamento de resíduos, têm-se estudado algumas alternativas de utilização de subprodutos da agroindústria, seleção de microrganismos mais competitivos e adaptados a processos fermentativos para a fermentação cítrica (RYWINSKA et al., 2013).

Por outro lado, as indústrias químicas, de alimentos e produtos farmacêuticos, utilizam o ácido cítrico devido ao seu reconhecimento de segurança e seu sabor ácido agradável, e competem diretamente no mercado de acidulantes com o ácido láctico, fumárico e fosfórico. O setor alimentício é responsável pelo consumo de 22%, refrigerantes carbonados por 15% e bebidas em pó por 10%. O setor de cosméticos responde por cerca de 8%. Ele é ainda, um dos compostos de fermentação mais produzidos no mundo, devido, entre outras características, a sua baixa toxicidade quando comparado a outros acidulantes utilizados pela indústria farmacêutica e de alimentos. A produção mundial de ácido cítrico em 2004 foi estimada em 1,4 milhões de toneladas de acordo com o Business Communications Co. (PAPANIKOLAU; AGGELIS, 2009; RYWINSKA et al., 2013).

## 2.9 Produção de lipídeos por leveduras do gênero *Yarrowia*

A levedura *Yarrowia lipolytica* apresenta como característica marcante a presença em seu genoma de várias famílias multigênicas, envolvidas nas vias metabólicas. A complexidade e multiplicidade destes genes permitem a *Y. lipolytica* usar e valorizar uma grande quantidade de substratos hidrofóbicos. Ao utilizar esses mecanismos, elas podem acumular níveis que excedem 50% do peso da célula (BEOPOULOS et al., 2009).

*Yarrowia lipolytica*, também apresenta como característica a capacidade de consumir uma quantidade notável de glicerol e convertê-los em ácidos orgânicos, por esse motivo é que elas são testadas em relação a sua habilidade de crescimento em meios contendo glicerol em concentrações aumentadas e uma constante inicial de nitrogênio (CHATZIFRAGKOU et al., 2011). Essa espécie converte glicerol puro em ácido cítrico ou SCO. Devido ao aumento contínuo da produção de biodiesel, o glicerol bruto é prontamente disponível e a produção de SCO a partir do glicerol pode ser interessante devido à possibilidade de usar cepas microbianas. Esta produção poderia levar à síntese de lipídeos específicos de alto valor agregado, tais como óleos contendo ácidos graxos poliinsaturados como o ácido  $\gamma$ -linolênico ou lipídeos mostrando uma composição semelhante à manteiga de cacau e outras gorduras exóticas. Além disso, mesmo se a composição não for particularmente valiosa, essa produção poderia ser potencialmente interessante, pois SCO poderia ser convertido diretamente em biodiesel (PAPANIKOLAU; AGGELIS, 2009).

Os principais ácidos graxos produzidos por *Y. lipolytica* são C18: 1 (ácido oleico) seguido pelo C16:0 (ácido palmítico), C16:1 (palmitoleico), C18:0 (estearico) e C18:2 (linoleico). A porcentagem de C18: 1 presente diminui durante a fermentação enquanto o oposto acontece para C18:2 (CHATZIFRAGKOU et al., 2011).



*Yarrowia lipolytica* (antigamente chamada de *Candida lipolytica*) também é conhecida por maximizar a produção de ácido cítrico assimilando carboidratos ou hidrocarbonetos dos substratos. No entanto, para que *Y. lipolytica* produza altas concentrações de ácido cítrico a partir de hidrocarbonetos existem três problemas, o primeiro diz respeito à demanda de oxigênio muito alta por unidade de massa celular e o segundo surge a partir da solubilidade limitada de hidrocarbonetos no meio. Também tem sido relatado que o óleo de hidrocarbonetos dissolvidos pode não ser a principal fonte do substrato, e que a absorção do substrato também ocorra pela adesão celular direta com gotas finas de óleo. A agitação também tem um importante papel a desempenhar na otimização da produção de ácido cítrico a partir de *Yarrowia lipolytica* (CROLLA; KENNEDY, 2004).

As características únicas da *Y. lipolytica*, juntamente com a disponibilidade de eficientes ferramentas genéticas para esta espécie, têm estimulado o interesse no uso dessa levedura como modelo para a produção de biocombustível, com grande potencial para aplicações biotecnológicas. As aplicações potenciais desses processos incluem a produção de lipídeos de reservas com estruturas particulares e produção de óleos não específicos para o uso como materiais renováveis de partida para a síntese de biocombustíveis (BEOPOULOS et al., 2009).

Várias estirpes de *Yarrowia lipolytica* já foram isoladas e podem ser cultivadas com eficiência em vários substratos, tais como glicose, alcoóis e acetato. O genoma da *Yarrowia lipolytica* compreende mais de 6000 genes em seis cromossomos. Além disso, muitas ferramentas de manipulação genética foram estabelecidas. Esta levedura também foi escolhida por muitos pesquisadores como microrganismo alvo para estudos dos mecanismos de regulação do acúmulo de lipídeos. No entanto, mesmo com ferramentas e conhecimentos existentes sobre *Y. lipolytica* foram feitos progressos lentos para

a compreensão da acumulação de lipídeos com clássicas abordagens da engenharia metabólica (PAN; HUA, 2012).

### **2.9.1 *Cryptococcus***

A espécie *Cryptococcus curvatus*, é uma levedura oleaginosa que assimila várias fontes de carbono, incluindo resíduos agrícolas de processamento de alimentos, glicose, xilose, lactose, glicerol e etanol, para produção de lipídeos (WU et al., 2010). Quando o glicerol é utilizado como fonte de carbono, geralmente é primeiro convertido em acetato. Assim, cepas que podem crescer em etanol geralmente também podem crescer em acetato (CHI et al., 2011).

Esta espécie demonstra ser também uma acumuladora de grandes quantidades de lipídeos intracelulares utilizando N-acetilglicosamina como fonte de carbono e nitrogênio, onde o acúmulo de lipídeos microbianos ocorre em uma cultura com baixa relação média de carbono/nitrogênio (WU et al., 2010).

*C. curvatus* e *C. albidus*, podem acumular lipídeos em níveis equivalentes a 58% e 65% de seu peso celular respectivamente, no entanto, os perfis de ácidos graxos podem variar. *C. curvatus*, por exemplo, acumula quantidades significativas de ácido palmítico (16:0), enquanto o ácido oleico (C18: 1, n-9) é acumulado preferencialmente por *C. albidus* (BEOPOULOS; NICAUD; GAILLARDIN, 2011).

### **2.9.2 *Rhodotorula***

Ao contrário de outros microrganismos, espécies diferentes de *Rhodotorula* apresentam diferenças significativas quanto à produção de lipídeos, mas a composição dos ácidos graxos permanece similar, no entanto, isso pode ser reconhecido pela produção de alguns ácidos graxos produzidos por leveduras

oleaginosas, como o mirístico (C14: 0), palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1, n-7), esteárico (C18:0), oleico (C18:1, n-9), linoleico (C18:2, n-6), e o ácido linolênico (C18:3). Também se tem sugerido a utilização das leveduras, bem como seus óleos como matérias-primas na produção de biodiesel, que exigem os ácidos graxos C16-C18 (BEOPOULOS; NICAUD; GAILLARDIN, 2011). Segundo Beopoulos, Nicaud e Gaillardin (2011), a espécie *R. glutinis* está entre as espécies que mais acumulam lipídeos, 72% do total da célula, no entanto ela não se destaca quanto à produção de ácidos graxos.

*Rhodotorula glutinis* é uma levedura conhecida por produzir  $\beta$ -caroteno, potencialmente importante para aplicação industrial. Além da produção de  $\beta$ -caroteno, o alto conteúdo de lipídeo microbiano acumulado para a produção de biodiesel também tem sido foco de pesquisas com esse microrganismo. *Rhodotorula* também produz grandes quantidades de gorduras e tem sido usada para a produção de proteínas a partir do etanol, ácido acético e acetaldeído (YEN; ZHANG, 2011).

Além de *R. glutinis* existe outra espécie capaz de produzir e estocar teores lipídicos, *Rhodotorula graminis*. No entanto trabalhos não têm sido realizados na utilização desta espécie para a produção de lipídeos destinados a produção de biodiesel (BEOPOULOS; NICAUD; GAILLARDIN, 2011).

## REFERÊNCIAS

BEATRIZ, A.; ARAÚJO, Y. J. K.; LIMA, D. P. de. Glicerol: um breve histórico e aplicação em sínteses estereosseletivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 306-319, dez. 2010.

BEAUDOIN, F. et al. Heterologous reconstitution yeast of the polyunsaturated fatty acid biosynthetic pathway. **National Academy Sciences**, Washington, v. 97, n. 12, p. 6421-6426, June 2000.

BEOPOULOS, A. et al. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. **Progress in Lipid Research**, Bethesda, v. 48, n. 6, p. 375-387, Nov. 2009.

BEOPOULOS, A.; NICAUD, J. M.; GAILLARDIN, C. An overview of lipid metabolism in yeast and its impact on biotechnological processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 90, p. 1193-1206, Mar. 2011.

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.

CHI, Z. et al. Oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* culture with dark fermentation hydrogen production effluent as feedstock for microbial lipid production. **International Journal of Hydrogen Energy**, Oxford, v. 36, n. 16, p. 9542-9550, Aug. 2011.

CROLLA, A.; KENNEDY, K. J. In-line mixing for production of citric acid by *Candida lipolytica* grown on n-paraffins. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, London, v. 79, n. 7, p. 720-728, July 2004.

CUNHA, A. et al. Synthesis and characterization of ethylic biodiesel from animal fat wastes. **Fuel**, London, v. 105, p. 228-234, June 2012.

DIBNER, J. J.; BUTTIN, P. Use of organic acids as a model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism. **Journal of Applied Poultry Research**, Athens, v. 11, n. 91, p. 453-463, Aug. 2002.

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

FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. S.; SCABIO, A. Biodiesel de soja: taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 19-23, nov. 2004.

GOWEN, C. M.; FONG, S. S. Applications of systems biology towards microbial fuel production. **Microbial Systems Biology**, Oxford, v. 19, n. 10, p. 516-524, Oct. 2011.

IMANDI, S. B.; KARANAN, S. K.; GARAPATI, H. R. Optimization of process parameters for the production of lipase in solid state fermentation by *Yarrowia lipolytica* from Niger seed oil cake (*Guizotia Abyssinica*). **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, Washington, v. 2, n. 1, p. 28-33, Feb. 2010.

KARATAY, S. E.; DONMEZ, G. Improving the lipid accumulation properties of the yeast cells for biodiesel production using molasses. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 20, p. 7988-7990, Oct. 2010.

KIMURA, K.; YAMAOKA, M.; KAMISAKA, Y. Rapid estimation of lipids in oleaginous fungi and yeast using Nile red fluorescence. **Journal of Microbiology Methods**, Essex, v. 56, p. 331-338, Mar. 2004.

LAGES, F.; SILVA-GRAÇA, M.; LUCAS, C. Active glycerol uptake is a mechanism underlying halotolerance in yeasts: a study of 42 species. **Microbiology**, New York, v. 145, n. 3155, p. 2577-2585, May 1999.

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

LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C.; CRUZ, R. S. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1596-1608, jul. 2009.

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.

MARTIN, C. A. et al. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 19, n. 6, p. 761-769, nov./dez. 2006.

MENG, X. et al. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable Energy**, New York, v. 34, n. 1, p. 1-5, Jan. 2009.

MIESIAC, I.; ROGALINSKI, A.; JOZWIAK, P. Transesterification of triglycerides with ethyl acetate. **Fuel**, London, v. 105, p. 169-175, Mar. 2013.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 1009 p.

NIELSE, J. Systems biology of lipid metabolism from yeast to human. **Federations European Biochemical Societies**, Geneva, v. 583, p. 3905-3913, Aug. 2009.

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

PAN, P.; HUA, Q. Reconstruction and *In Silico* analysis of metabolic network for an oleaginous yeast, *Yarrowia lipolytica*. **Plos One**, San Francisco, v. 7, n. 12, p. 1-11, Dec. 2012.

PANDEY, A. et al. Production of organic acids by solid state fermentation. In: \_\_\_\_\_. **Solid-state fermentation in biotechnology: fundamentals and applications**. Tucson: Asistech, 2001. p. 113-126.

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.

\_\_\_\_\_. Lipids of oleaginous yeasts: part I, biochemistry of single cell oil production. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 113, n. 8, p. 1-21, June 2011.

PAPANIKOLAOU, S. et al. Influence of glucose and saturated free-fatty acid mixture on citric acid and lipid production by *Yarrowia lipolytica*. **Current Microbiology**, New York, v. 52, n. 2, p. 134-142, Feb. 2006.

\_\_\_\_\_. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. **Applied Microbiology**, Oxford, v. 92, n. 4, p. 737-744, Apr. 2002.

PENZ JÚNIOR, A. M.; SILVA, A. B.; RODRIGUES, O. Ácidos orgânicos na alimentação de aves. In: CONFERÊNCIA APINCO'93 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIAS AVÍCOLAS, 13., 1993, Santos. **Anais...** Santos: FACTA, 1993. p. 111-119.

RATLEDGE, C. Microbial oils and fats: an assessment of their commercial potencial. **Progress in Industrial Microbiology**, Hampshire, v. 16, p. 119-206, 1982.

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.

RYMOWICZ, W.; RYWINSKA, A.; GLADKOWSKI, W. Simultaneous production of citric acid and erythritol from crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* Wratislavia K1. **Chemical Papers**, Bratislava, v. 62, n. 3, p. 239-246, Oct. 2007.

SANTIBÁNEZ, C.; VARNERO, M. T.; BUSTAMANTE, M. Residual glycerol from biodiesel manufacturing, waste or potential source of bioenergy: a review. **Chilean Journal of Agriculture Research**, Chillán, v. 7, n. 3, p. 469-475, July/Sept. 2011.

SCHMITZ, G.; ECKER, J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. **Progress in Lipid Research**, Bethesda, v. 47, n. 2, p. 147-155, Mar. 2008.

SILVA, L. da et al. Production of citric acid by *Yarrowia lipolytica*, in different crude glycerol concentrations and in different nitrogen source. **Chemical Engineering Transactions**, Milano, v. 27, p. 199-204, June 2006.

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.

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.

TIMEIS. **Technology innovation management and entrepreneurship information service**: citric acid. Disponível em:  
<<http://www.technopreneur.net/timeis/index.htm>>. Acesso em: 10 dez. 2012.

WANG, Z. X. et al. Glycerol production by microbial fermentation: a review. **Biotechnology Advances**, New York, v. 19, p. 201-223, June 2001.

WAZILEWSKI, W. T. et al. Study of the methyl crambe (*Crambe byssinica* Hochst) and soybean biodiesel oxidative stability. **Industrial Crops and Products**, London, v. 43, p. 207-212, May 2013.

WU, S. et al. Production of lipid from N-acetylglucosamine by *Cryptococcus curvatus*. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 112, n. 7, p. 727-733, July 2010.

YAZDANI, S. S.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 18, p. 213-219, May 2007.

YEN, H. W.; ZHANG, Z. Effects of dissolved oxygen level on cell growth and total lipid accumulation in the cultivation of *Rhodotorula glutinis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 112, n. 1, p. 71-74, July 2011.



## CAPÍTULO 2 Produção de lipídeos e ácido cítrico por levedura selvagem crescida em glicerol

### RESUMO

O biodiesel apresenta vantagens sobre o diesel de petróleo por não ser tóxico e ser proveniente de fontes renováveis, além da melhor qualidade das emissões durante o processo de combustão. Juntamente com o aumento na produção de biodiesel, aumentou-se também a quantidade de glicerol, resíduo desse processo. Uma das principais formas biotecnológica de valorização do glicerol bruto é sua conversão em lipídeo microbiano e ácido cítrico. Foi utilizado o glicerol bruto para o cultivo de leveduras selvagens visando à produção de lipídeos microbianos e ácido cítrico contribuindo para a produção de biodiesel. Quarenta leveduras de origens diferentes foram testadas quanto ao crescimento em glicerol bruto e comercial. Quatro leveduras (*Lidnera saturnus* UFLA CES-Y677, *Yarrowia lipolytica* UFLA CM-Y9. 4, *Rhodotorula glutinis* NCYC 2439 e *Cryptococcus curvatus* NCYC 476) foram então selecionadas por apresentarem maior crescimento em glicerol puro (2,133 ηm, 1,633 ηm, 2,055 ηm e 2,049 ηm respectivamente) e bruto (2,354 ηm, 1,753 ηm, 2,316 ηm e 2,281 ηm respectivamente) para testes em concentrações elevadas de glicerol bruto e comercial (10, 20 e 30%). A levedura *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9. 4 foi selecionada devido à capacidade em se manter viável em concentrações de 30% de glicerol bruto e alto consumo de glicerol (18,907 g/L) ao longo da fermentação. A levedura foi então submetida a testes para produção de lipídeos, onde em concentrações de 30 g/L de glicerol bruto obteve-se 63,4% de lipídeos microbianos. No perfil de ácidos graxos houve o predomínio dos ácidos esteárico (C18: 0) e palmítico (C16:0) nas concentrações de 87,64% e 74,67%, respectivamente. Foi realizado também a otimização dos parâmetros para a produção de ácido cítrico, que nas condições ótimas (38,4 g/L de glicerol bruto, agitação de 184 rpm e temperatura de 30 °C) foi observada uma produção de 0,19 g/L de ácido cítrico. *Yarrowia lipolytica* UFLA CM-Y9. 4 se mostrou boa produtora de lipídeos quando na concentração de 30 g/L de glicerol, estes dados podem ser utilizados para produção de grandes quantidades para aplicação na indústria de biodiesel. A concentração de ácido cítrico encontrada não foi significativamente alto sendo necessário ajuste nas condições para melhor produção.

Palavras-chave: Biodiesel. Glicerol. Lipídeos microbianos. Ácido cítrico.

## CHAPTER 2 Production of lipids and citric acid by wild yeast grown in glycerol

### ABSTRACT

Biodiesel presents advantages over petroleum diesel for not being toxic and for deriving from renewable sources, in addition to improving emission quality during the combustion process. Along with the increase in the production of biodiesel, an increase also occurred in the amount of glycerol, byproduct of this process. One of the main biotechnological forms of crude glycerol appreciation is its conversion into microbial lipids and citric acid. We used crude glycerol in the cultivation of wild yeasts aiming at producing microbial yeasts and citric acid, contributing to the production of biodiesel. Forty yeasts of different origins were tested in regard to its growth in crude and commercial glycerol. Four yeasts (*Lidnera saturnus* UFLA CES-Y677, *Yarrowia lipolytica* UFLA CM-Y9.4, *Rhodotorula glutinis* NCYC 2439 and *Cryptococcus curvatus* NCYC 476) were then selected for presenting a larger growth in pure (2.133  $\eta$ m, 1.633  $\eta$ m, 2.055  $\eta$ m and 2.049  $\eta$ m, respectively) and crude (2.354  $\eta$ m, 1.753  $\eta$ m, 2.316  $\eta$ m and 2.281  $\eta$ m, respectively) glycerol for tests in elevated concentrations of crude and commercial glycerol (10, 20 and 30%). The *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9.4 yeast was selected due to its capacity in maintaining viable in concentrations of 30% of crude glycerol and high glycerol intake (18.907 g/L) along the fermentation. The yeast was then submitted to lipid production testing which, in concentrations of 30 g/L of crude glycerol, obtained 63.4% of microbial lipids. In the fatty acid profile, occurred the predominance of acids stearic (C18:0) and palmitic (C16:0) in the concentrations of 87.64% and 74.67%, respectively. We also performed the optimization of the parameters for the production of citric acid, which in optimum conditions (38.4 g/L of crude glycerol, agitation of 184 rpm and temperature of 30°C), obtained a production of 0.19 g/L of citric acid. *Yarrowia lipolytica* UFLA CM-Y9.4 presented good lipid production when in the concentration of 30 g/L of glycerol. These data may be used for production in large quantities for biodiesel industrial application. The citric acid concentration found was not significantly high, demanding adjustments in the conditions for a better production.

Keywords: Biodiesel. Glycerol. Microbial lipids. Citric acid.

## 1 INTRODUÇÃO

A escassez dos combustíveis fósseis, o aumento das emissões de poluentes gerados pela combustão, e os seus crescentes custos fizeram do biodiesel uma fonte de combustível atraente para o consumidor. O biodiesel (éster metílico de ácidos graxos) é produzido pelo processo de transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais com o metanol, sendo potenciais substitutos para os combustíveis à base de petróleo. Comparado com o diesel convencional, o biodiesel apresenta vantagens por ser biodegradável, renovável, não tóxico e de baixa emissão de poluentes (CHEN et al., 2011).

O uso do biodiesel na matriz energética brasileira traz várias vantagens sociais, econômicas e principalmente ambientais. Na área social, proporciona ganhos na geração de postos de trabalho no campo. Em termos econômicos a produção de biodiesel, especificamente no Brasil, possibilita a redução nas importações de petróleo e diesel refinado (GUARIEIRO; VASCONCELLOS; SOLCI, 2011).

O glicerol é subproduto não apenas do processo químico da produção de biodiesel, mas também de sua síntese enzimática e durante a produção de bioetanol. O glicerol também é considerado uma fonte de carbono altamente assimilável por bactérias e leveduras em condições aeróbias e anaeróbias para a obtenção de energia metabólica, como regulador do potencial redox e na reciclagem de fosfato inorgânico dentro da célula (RIVALDI et al., 2008).

Os microrganismos são capazes de produzir lipídeos de composição semelhante a óleos vegetais e podem ser utilizados na produção de biodiesel (MAKRI; FAKAS; AGGELIS, 2010). Bactérias, leveduras e fungos filamentosos podem acumular grandes quantidades de lipídeos em suas células, chegando a 70% do seu peso total, sendo denominadas espécies oleaginosas (KARATAY; DONMEZ, 2010).

Leveduras também apresentam capacidade de produzir ácido cítrico em concentrações diferentes de glicerol bruto. Uma vez que sua concentração inicial de carbono/nitrogênio molar é alta, o crescimento da célula pode ser seguido pela significativa produção de ácido cítrico, com baixos níveis de acumulação de lipídeos na célula (BEOPOULOS et al., 2009).

O objetivo com este trabalho foi avaliar o crescimento de leveduras em meio contendo glicerol oriundo da produção de biodiesel e glicerol comercial, bem como a utilização de levedura para produção de lipídeos e a otimização das condições para produção de ácido cítrico.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Microrganismos

Trinta e sete leveduras da coleção de microrganismos do laboratório de Fisiologia e Genética de Microrganismos da Universidade Federal de Lavras, e três leveduras procedentes da National Collection of Yeast Cultures (Norwich, United Kingdom) foram utilizadas neste trabalho (Tabela 1).

Tabela 1 Leveduras obtidas da coleção de microrganismos do laboratório de Fisiologia e Genética de Microrganismos da Universidade Federal de Lavras utilizadas no teste para crescimento em glicerol bruto e glicerol comercial

Código	Espécie	Origem
UFLA CES-Y758	<i>Candida railenensis/oleophila</i>	Solo cerrado
UFLA FW-Y62	<i>Pichia guilliermondii</i>	Fermentado de cagaita
UFLA CES-Y660	<i>Debaromyces varinjiniae</i>	Solo cerrado
UFLA CA-11	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cana de açúcar
UFLA CES-Y777	<i>Candida sojae</i>	Solo cerrado
UFLA CES-Y649	<i>Debaromyces pseudopolymorphus</i>	Solo cerrado
UFLA CES-Y678	<i>Debaromyces hansenii</i>	Solo cerrado
UFLA CES-Y839	<i>Kazachistania sp.</i>	Solo cerrado
UFLA CES-Y775	<i>Torulaspota maleae</i>	Solo cerrado
UFLA CES-Y631	<i>Trichosporon sp.</i>	Solo cerrado
UFLA FW-Y33	<i>Saccharomyces paradoxus</i>	Fermentado de cagaita
UFLA FW-Y46	<i>Debaromyces fabryi</i>	Fermentado de cagaita
UFLA CF-Y383	<i>Candida fermentati</i>	Café
UFLA FFCX-Y100.7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Caxiri
UFLA CES-Y64	<i>Torulaspota globosa</i>	Solo cerrado
UFLA CES-Y270	<i>Candida neerlandica</i>	Solo cerrado
UFLA CES-Y542	<i>Pichia kudriavzuri</i>	Solo cerrado
UFLA CES-Y608	<i>Candida ortolopsis</i>	Solo cerrado
UFLA CES-Y648	<i>Kodameae ohmeri</i>	Solo cerrado
UFLA CES-Y677	<i>Lidnera saturnus</i>	Solo cerrado

“Tabela 1, conclusão”

Código	Espécie	Origem
UFLA CES-Y818	<i>Candida frijolensis</i>	Solo cerrado
UFLA NCYC	<i>Pichia metanolica</i>	Silagem
UFLA KF-Y25	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Kefir (água)
UFLA 120	<i>Candida parapsilosis</i>	Kefir (leite)
UFLA 111	<i>Pichia membranifaciens</i>	Kefir (água)
UFLA 200	<i>Galactomyces geotrichum</i>	Kefir (leite)
UFLA CES-Y60	<i>Candida tropicalis</i>	Solo cerrado
NCYC 476	<i>Cryptococcus curvatus</i>	NCYC
UFLA CES-Y557	<i>Candida glabrata</i>	Solo cerrado
UFLA CES-Y682	<i>Cryptococcus humicola</i>	Solo cerrado
UFLA CM-Y9.4	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Solo Amazônia
UFLA CH-Y21.1	<i>Candida intermédia</i>	Cacau
UFLA CH-YBM14.3	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	Cacau
UFLA CH-YDM31.7	<i>Pichia fermentans/kluuyveri</i>	Cacau
UFLA CH-YBM15.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cacau
UFLA CH-YEM5.69	<i>Issatchenkia orientalis</i>	Cacau
NCYC 2439	<i>Rhodotorula glutinis</i>	NCYC
UFLA CH-YEM5.71	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Cacau
UFLA CH-YDM 25.1	<i>Pichia sp</i>	Cacau
UFLA CES-Y523	<i>Cryptococcus laurentii</i>	Solo cerrado

Todos os microrganismos foram inicialmente reativados em tubos de ensaio contendo 2 mL de meio de cultivo YEPG por 24 horas em temperatura de 28 °C e agitação de 120 rpm.

## **2.2 Glicerol**

Os testes de crescimento de leveduras foram realizados com glicerol puro (Êxodo Científica) e glicerol bruto, oriundo da produção de biodiesel. O glicerol bruto foi gentilmente cedido pelo laboratório de Biodiesel, Departamento de Agricultura, da Universidade Federal de Lavras. O glicerol bruto foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para determinação da composição (Condições cromatográficas descritas no item 2.7).

## **2.3 Pré-seleção de leveduras capazes de crescer em glicerol**

As leveduras foram avaliadas quanto à capacidade de crescer em meio de cultura contendo glicerol puro e bruto. O crescimento das leveduras foi monitorado pela medida da densidade óptica a 595 nm a cada três horas. O experimento foi conduzido em microplacas de ELISA contendo 180 µL do meio de cultura G-1 (item 2.4) e 20 µL do inóculo que foi crescido durante 24 horas em meio YEPG (item 2.4). A temperatura de incubação foi de 28 °C durante 24 horas com agitação média (KIMURA; YAMAOKA; KAMISAKA, 2004).

## **2.4 Meio de cultivo, condições e preparo do inóculo**

Na seleção de leveduras capazes de crescer em meio contendo glicerol como fonte de carbono foi utilizado o meio G1 composto em g/L por: glicerol (comercial ou bruto), 20; peptona, 20; extrato de levedura, 20, este mesmo meio de cultivo foi também utilizado sem o glicerol como controle no crescimento (KIMURA; YAMAOKA; KAMISAKA, 2004).

As leveduras que apresentaram melhor crescimento foram submetidas a novos testes de crescimento em cultivo submerso em um novo meio de cultivo –

G2, com agitação de 150 rpm e  $28 \pm 2$  °C por 120 horas. A composição do meio G-2 foi adaptada de Papanikolaou et al. (2002), em g/L:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 7,0;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,5;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,15;  $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,02;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,06;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,5; extrato de levedura, 0,5, glicose, 5,0. Glicerol puro e bruto foi utilizado nas concentrações de 10, 20 e 30%.

O inóculo foi inicialmente crescido em tubos com 2 mL de YEPG (g/L: extrato de levedura, 10; peptona, 20 e glicose, 20) por 24 horas, e 10% do inóculo inicial foi transferidos para volumes maiores até que se pudesse obter um volume de 620 mL e uma população de  $10^8$  cél/mL. Quando este número foi obtido, todo o conteúdo foi centrifugado a 4 °C a 5000 rpm por 15 minutos. Posteriormente as células foram lavadas duas vezes com água destilada estéril e centrifugada nas mesmas condições descritas acima.

## 2.5 Seleção de leveduras em cultivos submersos

As leveduras que apresentaram melhor crescimento foram posteriormente submetidas a testes em frascos em agitação de 150 rpm a 28 °C por 120 horas. Para este teste foi utilizado o meio de cultivo G-2 (item 2.2) onde  $10^8$  cél/mL foram inoculadas no meio G-2 nas concentrações de 10, 20 e 30% (PAPANIKOLAOU et al., 2002).

Amostras foram retiradas a cada 24 horas para contagem de células viáveis.

## 2.6 Produção de ácido cítrico - Desenho experimental

O desenho experimental composto central rotacionado (DCCR) com três repetições para o ponto central ( $n_0 = 3$ ) e  $\alpha = 1.68$  foi utilizado. Foram realizados 17 ensaios (Tabela 3) sendo as três variáveis independentes, temperatura ( $X_1$ ),



concentração de glicerol ( $X_2$ ) e agitação ( $X_3$ ) (Tabela 2). As variáveis respostas foram produção de ácido cítrico ( $Y_1$ ), glicerol consumido ( $Y_2$ ) e população ( $Y_3$ ). Após a definição das condições ótimas, a validação foi realizada com a repetição do experimento nas condições previstas.

Tabela 2 Valores das variáveis independentes e seus códigos utilizados nesse experimento

Variáveis	código	-1,68	-1	0	1	1,68
Temperatura	$x_1$	26,6	28	30	32	33,4
Concentração Glicerol (g/L)	$x_2$	21,6	25	30	35	38,4
Agitação	$x_3$	116	130	150	170	184

Tabela 3 Valores codificados das variáveis independentes, e suas combinações, utilizados na avaliação da produção de ácido cítrico por leveduras

Ensaio	$x_1$	$x_2$	$x_3$	Ácido cítrico	Glicerol consumido	População final
1	-1	-1	-1			
2	+1	-1	-1			
3	-1	+1	-1			
4	+1	+1	-1			
5	-1	-1	+1			
6	+1	-1	+1			
7	-1	+1	+1			
8	+1	+1	+1			

“Tabela 3, conclusão”

Ensaio	$x_1$	$x_2$	$x_3$	Ácido cítrico	Glicerol consumido	População final
9	-1,68	0	0			
10	+1,68	0	0			
11	0	-1,68	0			
12	0	+1,68	0			
13	0	0	-1,68			
14	0	0	+1,68			
15	0	0	0			
16	0	0	0			
17	0	0	0			

### 2.7 Determinação da produção de ácido cítrico e consumo de glicerol

As amostras do cultivo foram centrifugadas e filtradas a 0,22  $\mu\text{m}$ . A análise de ácido cítrico foi realizada em HPLC – Shimadzu, modelo LC-10Ai (Shimadzu Corp, Japan), equipado com sistema duplo de detecção constituído por detector UV (SPD + 10Ai) e detector de índice de refração (RID – 10A). A coluna SCR 101H com respectiva pré-coluna e fase móvel de água MilliQ com pH ajustado para 2,1 com ácido perclórico (Merck) foi utilizada. Foram injetados 20  $\mu\text{L}$  da amostra com fluxo de 0,6 mL/min, e detecção feita por UV visível 210 nm e temperatura do forno a 30 °C. A quantificação da amostra foi obtida pelas curvas padrões com ácido cítrico P.A e Glicerol (PAPANIKOLAOU et al., 2002).

## 2.8 Produção de lipídeos

A produção de lipídeos foi avaliada pelos testes em cultivo submerso utilizando as concentrações de 15, 25, 30 e 35 g/L de glicerol bruto que foram mantidos em shaker com agitação de  $150 \pm 10$  rpm e temperatura de  $30 \pm 2$  °C. O experimento foi conduzido durante 48 horas, adaptado de Papanikolaou et al. (2002).

## 2.9 Extração e determinação de lipídeos

A extração de lipídeos contidos na biomassa das leveduras foi realizada utilizando a metodologia proposta por Bligh e Dyer (1959) com algumas modificações. Inicialmente a biomassa foi seca em estufa durante 12 horas em temperatura de 70 °C. A biomassa seca foi então passada pela fase da digestão ácida para rompimento da parede celular da levedura. Nesta etapa, 300 mg da biomassa seca foi finamente triturada e em um tubo adicionados 5 mL de HCl 2M e digerido em banho maria a 80 °C por 1 hora. Logo após, a biomassa resultante foi resfriada e centrifugada a 2000 rpm por 15 minutos. O ácido utilizado foi descartado em local apropriado.

A extração dos lipídeos foi realizada pela solução de clorofórmio/metanol na proporção de 2:1. Em seguida a mistura foi centrifugada e verificou-se a formação de um sistema trifásico, composto de uma fase inferior líquida (clorofórmio) um sólido interfacial (biomassa) e uma fase líquida superior (metanol e água). A fase inferior do centrifugado foi retirada. Este procedimento foi repetido duas vezes para a extração dos lipídeos remanescentes da amostra. Ao final, um sistema trifásico foi formado e os lipídeos encontravam-se na parte inferior dissolvidos no clorofórmio que foi evaporado e os lipídeos medidos em peso seco.

## 2.10 Determinação de ácidos graxos

Os lipídeos extraídos foram esterificados para obtenção dos metil-ésteres dos ácidos graxos, segundo a metodologia proposta por Metcalfe, Schimitz e Pelka (1966). A quantificação dos ácidos graxos foi realizada por cromatógrafo gasoso – GC, Shimadzu modelo 17A, equipado com um FID (detector de ionização de chama) e coluna capilar de sílica DB Wac (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) J&W Scientific, com injetor automático. As análises foram realizadas nas seguintes condições: temperatura do injetor 240 °C, temperatura do detector 240 °C, temperatura inicial da coluna 140 °C, programação da temperatura, 140 °C por 20 minutos, 2,5 °C/min até 220 °C e 10 min em 220 °C. A vazão do gás de arraste na coluna foi de 1,2 mL/min, razão de split 1:10 e gás de arraste, nitrogênio (FAKAS et al., 2006).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Seleção de leveduras capazes de crescer em glicerol

O glicerol bruto utilizado foi caracterizado quimicamente (Tabela 4). Este resíduo da produção de biodiesel apresentou concentrações de metanol na sua composição, o que em alguns casos, pode prejudicar o crescimento de espécies de leveduras. Concentração de 0,8% de glicose também foi detectada no resíduo de biodiesel. Este glicerol foi utilizado na composição dos meios de cultivo G1 e G2 para avaliar o crescimento das leveduras e produção de ácido cítrico e lipídeos.

Tabela 4 Composição química do glicerol bruto

Composição	Glicerol bruto g/L
Metanol	2,716
Etanol	3,171
Sacarose	0,21
Glicose	7,63
Glicerol	729,67

Após 24 horas de incubação em meio G1 com glicerol comercial, bruto e sem glicerol as leveduras apresentaram padrões distintos de crescimento. A cepa *Issatchenkia orientalis* UFLA CH-YEM5.69 apresentou o menor crescimento quando cultivada em meio contendo glicerol puro (0,110), porém em meio sem glicerol apresentou crescimento 85,12% maior, enquanto *Pichia fermentans* UFLA CH-YDM31.7 apresentou crescimento 93,27% menor em glicerol bruto (0,156) e sem glicerol (0,101). A produção de biomassa em glicerol bruto foi em algumas leveduras maior do que quando cultivadas em

glicerol puro, como por exemplo, a *Candida railenensis/oleophila* UFLA CES-Y758 que apresentou biomassa aproximadamente 50% maior em glicerol bruto do que em glicerol comercial (Tabela 5). *Kazachistania sp.* UFLA CES-Y839, *Pichia metanolica* NCYC 1381, *Hanseniaspora opuntiae* UFLA CH-YBM14. 3, *Pichia fermentans* UFLA CH-YDM31.7 e *Issatechenkia orientalis* UFLA CH-YEM5.69 não apresentaram crescimento em meio de cultivo contendo glicerol comercial no entanto, com exceção da *Pichia fermentans* UFLA CH-YDM31.7, estas últimas espécies citadas apresentaram crescimento em meio sem glicerol (Tabela 5). Valores inferiores a 0, 200 foram considerados como ausência de crescimento. A média de crescimento de todas as leveduras em meio de cultivo contendo glicerol bruto, puro e sem glicerol são respectivamente, 1, 538, 1, 290 e 1, 359, onde as espécies apresentaram menor produção de biomassa em cultivo com glicerol puro.

Nesta etapa objetivamos selecionar leveduras que apresentassem maiores crescimentos, para isto as espécies que apresentaram crescimento maior que 2,00 em absorvância nos dois tipos de glicerol testados, foram selecionadas. Assim, dentre as leveduras avaliadas, quatro foram selecionadas para o cultivo submerso em frascos nas concentrações de 10, 20 e 30% de glicerol bruto e comercial: *Lidnera saturnus* UFLA CES-Y677, *Yarrowia lipolytica* UFLA CM-Y9. 4, *Rhodotorula glutinis* NCYC 2439 e *Cryptococcus curvatus* NCYC 476 (Tabela 5).

Tabela 5 Valores de absorvância em Abs (600 nm)

<b>Espécies</b>	<b>Códigos</b>	<b>Glicerol bruto</b>	<b>Glicerol puro</b>	<b>Sem glicerol</b>
<i>Candida railenensis/oleophila</i>	UFLA CES-Y758	1, 753	0, 927	1, 809
<i>Pichia guilliermondii</i>	UFLA FW-Y62	1, 669	1, 758	0, 798
<i>Debaromyces varinjiniae</i>	UFLA CES-Y660	1, 933	1, 715	1, 656
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	UFLA CA-11	1, 032	0, 609	0,46
<i>Candida sojae</i>	UFLA CES-Y777	1, 756	1, 428	1, 708
<i>Debaromyces pseudopolymorphus</i>	UFLA CES-Y649	1, 815	1, 676	1, 749
<i>Debaromyces hansenii</i>	UFLA CES-Y678	1, 639	1, 262	1, 328
<i>Kazachistania sp.</i>	UFLA CES-Y839	0, 992	0, 161	1, 157
<i>Torulaspora maleae</i>	UFLA CES-Y775	0, 777	0, 543	0, 255
<i>Trichosporon sp.</i>	UFLA CES-Y631	1, 836	1, 786	1, 827
<i>Saccharomyces paradoxos</i>	UFLA FW-Y33	1, 358	1, 561	1, 571
<i>Debaromyces fabryi</i>	UFLA FW-Y46	1, 881	1, 790	1, 659
<i>Candida fermentati</i>	UFLA CF-Y383	2, 339	1, 872	1, 816
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	UFLA FFCX-Y100. 7	1, 358	1, 356	1, 016
<i>Torulaspora globosa</i>	UFLA CES-Y64	1, 744	1, 645	1, 162

“Tabela 5, continuação”

Espécies	Códigos	Glicerol bruto	Glicerol puro	Sem glicerol
<i>Candida neerlandica</i>	UFLA CES- Y270	1, 314	1, 191	1, 432
<i>Pichia kudriavzuri</i>	UFLA CES- Y542	1, 453	1, 185	1, 42
<i>Candida ortolopsis</i>	UFLA CES- Y608	1, 707	1, 233	1, 629
<i>Kodameae ohmeri</i>	UFLA CES- Y648	1, 795	1, 613	1, 798
<i>Lidnera saturnus</i>	<b>UFLA CES- Y677</b>	<b>2, 354</b>	<b>2, 133</b>	<b>1, 058</b>
<i>Candida frijolensis</i>	UFLA CES- Y818	1, 187	0, 932	1, 321
<i>Pichia metanolica</i>	NCYC 1381	0, 624	0, 141	0, 936
<i>Yarrowia lipolytica</i>	UFLA KF-Y25	1, 851	1, 46	1, 829
<i>Candida parapsilosis</i>	UFLA 120	2, 008	1, 43	0, 102
<i>Pichia membranifaciens</i>	UFLA 111	1, 925	1, 717	1, 612
<i>Galactomyces geotrichum</i>	UFLA 200	1, 684	1, 809	1, 726
<i>Candida tropicalis</i>	UFLA CES- Y60	1, 655	1, 323	1, 59
<i>Cryptococcus curvatus</i>	NCYC 476	<b>2, 281</b>	<b>2, 049</b>	<b>2, 563</b>
<i>Candida glabrata</i>	UFLA CES- Y557	1, 021	1, 403	0, 765
<i>Cryptococcus humicola</i>	UFLA CES- Y682	2, 418	1, 592	1, 667
<i>Yarrowia lipolytica</i>	<b>UFLA CM- Y9. 4</b>	<b>1, 753</b>	<b>1, 633</b>	<b>1, 841</b>



“Tabela 5, conclusão”

Espécies	Códigos	Glicerol bruto	Glicerol puro	Sem glicerol
<i>Candida intermédia</i>	UFLA CH- Y21.1	2,018	1,693	1,74
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	UFLA CH- YBM 14.3	1,207	0,326	1,113
<i>Pichia fermentans/kluveri</i>	UFLA CH- YDM 31.7	0,156	0,120	0,101
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	UFLA CH- YBM 15.1	0,748	0,819	1,359
<i>Issatchenkia orientalis</i>	UFLA CH- YEM 5.69	0,183	0,110	0,984
<i>Rhodotorula glutinis</i>	<b>NCYC 2439</b>	<b>2,316</b>	<b>2,055</b>	<b>2,062</b>
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	UFLA CH- YEM 5.71	1,176	0,793	0,783
<i>Pichia sp</i>	UFLA CH- YDM 25.1	1,259	1,210	1,474
<i>Cryptococcus laurentii</i>	UFLA CES- Y523	1,582	1,565	1,497

\* As leveduras foram incubadas por 24 horas em meio de cultivo contendo 2% de glicerol bruto e comercial. Melhores produtoras de biomassa em ambos meios de cultivo estão destacadas em negrito.

Tanto o glicerol bruto quanto o comercial possibilitaram o crescimento celular das leveduras ao longo do período de incubação, atingindo a fase estacionária após 24 horas para a maioria das leveduras (Figura 1). No entanto, observou-se um comportamento diferenciado das leveduras quando inoculadas em meio de cultivo com concentração de 30% de glicerol bruto. *Lidnera saturnus* UFLA CES-Y677 apresentou crescimento lento atingindo  $8 \times 10^7$  UFC/ml em 24 horas, após este período apresentou declínio da viabilidade, chegando a valores mínimos de viabilidade celular (Figura 2). *Yarrowia lipolytica* UFLA CM-Y9.4e *Cryptococcus curvatus* NCYC 476 cessaram o crescimento após 96 horas. A espécie *Rhodotorula glutinis* NCYC 2439 se

manteve viável na fase estacionária durante as 120 horas, nas concentrações mais elevadas de glicerol bruto, 20 e 30%.

As leveduras também foram testadas em meio com glicose durante o mesmo intervalo de tempo com o objetivo de analisar o crescimento em meio em que o glicerol não estivesse presente (Figura 3). Neste caso, todas as quatro leveduras apresentaram um crescimento semelhante aos seus respectivos valores no glicerol bruto na concentração de 10% e glicerol puro, este fato demonstra que o glicerol não influenciou negativamente o crescimento das mesmas.

A levedura *Lidnera saturnus* UFLA CES – Y677 não foi selecionada por ter apresentado capacidade de crescimento 40% menor.

Tabela 6 Glicerol consumido pelas leveduras *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9. 4, *C. curvatus* NCYC 476 e *R. glutinis* NCYC 2439 ao longo de 120 horas de crescimento, em meio de cultivo contendo 100 g/L de glicerol bruto, mantido sob agitação de 150 rpm e temperatura de 28±2 °C;

	<i>R. glutinis</i> (NCYC 2439)	<i>C. curvatus</i> (NCYC 476)	<i>Y. lipolytica</i> (UFLA CM-Y9. 4)
Glicerol consumido g/L	2, 225	0, 309	18, 907

Os testes com a concentração de 10% de glicerol bruto foram selecionados, uma vez que *Yarrowia lipolytica* UFLA CM-Y9. 4 perdeu toda a sua viabilidade após o quarto dia de incubação nas concentrações mais altas de glicerol bruto (Figura 2) e todas as três leveduras testadas apresentaram viabilidade em meio contendo 10% de glicerol *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9. 4 foi a levedura que apresentou maior consumo de glicerol ao longo do cultivo (Tabela 6), sendo então selecionada para avaliação da produção de lipídeos e ácido cítrico.

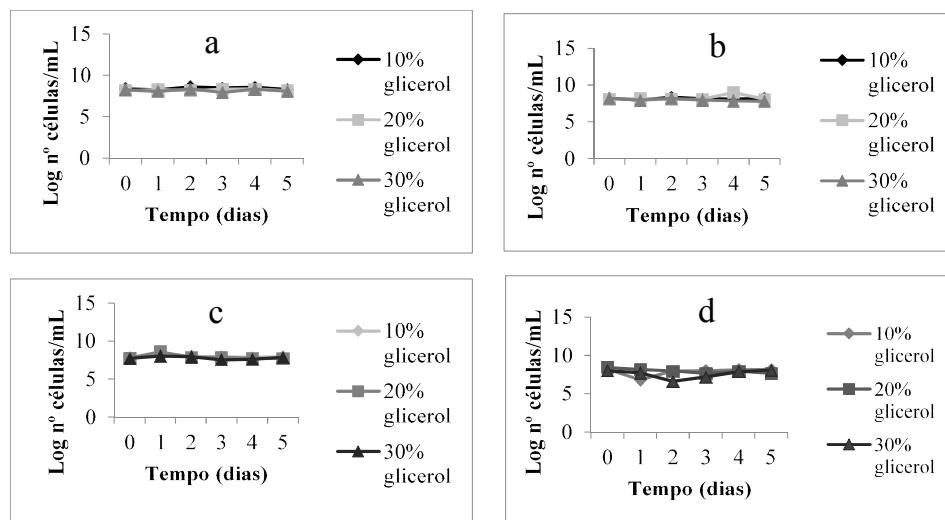


Figura 1 O efeito das concentrações de 10, 20 e 30% de glicerol puro no crescimento das leveduras *Lidnera saturnus* UFLA CES-Y677 (a), *Yarrowia lipolytica* UFLA CM-Y9. 4 (b), *Rhodotorula glutinis* NCYC 2439 (c) e *Cryptococcus curvatus* NCYC 476 (d)

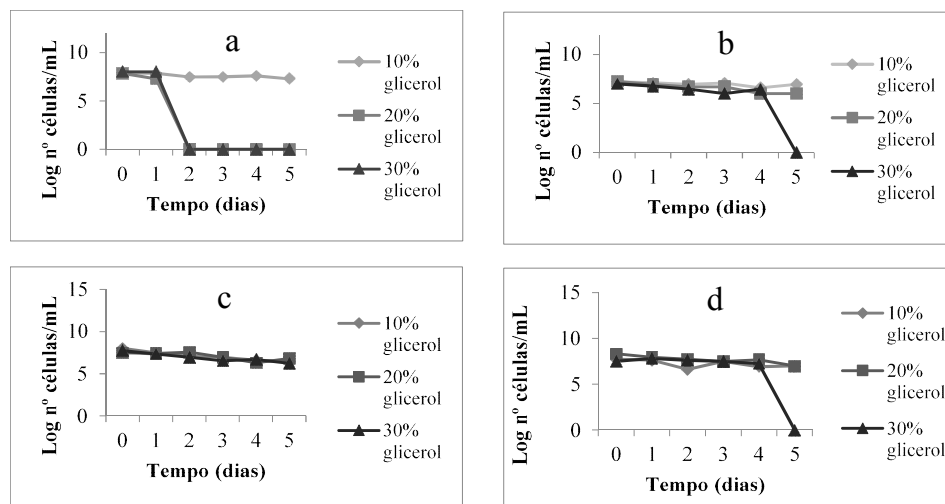


Figura 2 Efeito das concentrações de 10, 20 e 30% de glicerol bruto no crescimento das leveduras *Lidnera saturnus* UFLA CES-Y677 (a), *Yarrowia lipolytica* UFLA CM-Y9. 4 (b), *Rhodotorula glutinis* NCCY 2439 (c) e *Cryptococcus curvatus* NCCY 476 (d). Conjunto que gráficos que representam o crescimento das leveduras em glicerol puro e bruto

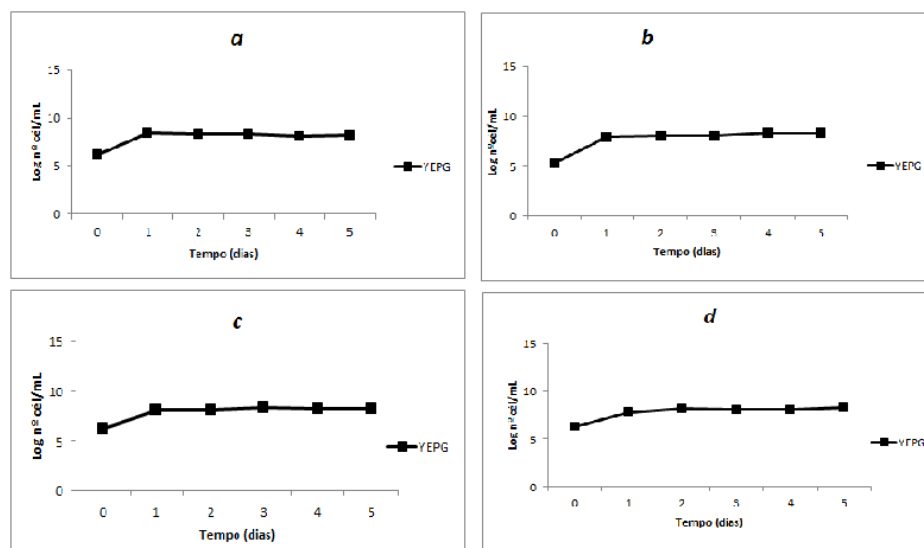


Figura 3 Crescimento em YEPG (meio sem glicerol) das leveduras *Lidnera saturnus* UFLA CES-Y677 (a), *Yarrowia lipolytica* UFLA CM-Y9.4 (b), *Rhodotorula glutinis* NCYC 2439 (c) e *Cryptococcus curvatus* NCYC 476 (d)

### 3.2 Produção de lipídeos

A maior produção de lipídeos foi observada na biomassa de *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9.4 cultivada nas concentrações intermediárias de glicerol, 30 e 25 g/L, respectivamente (63,4 e 46,16%) (Figura 4). Na concentração de 15 g/L de glicerol bruto a produção de lipídeos ao final de 48 horas foi de 37,9% e na concentração de 35 g/L gerou cerca de 38,2% de lipídeos microbianos. Pode-se observar que as concentrações extremas (15 e 35 g/L), não foram ideais para produção de biomassa e nem para produção de lipídeos por *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9.4 (Figuras 4).

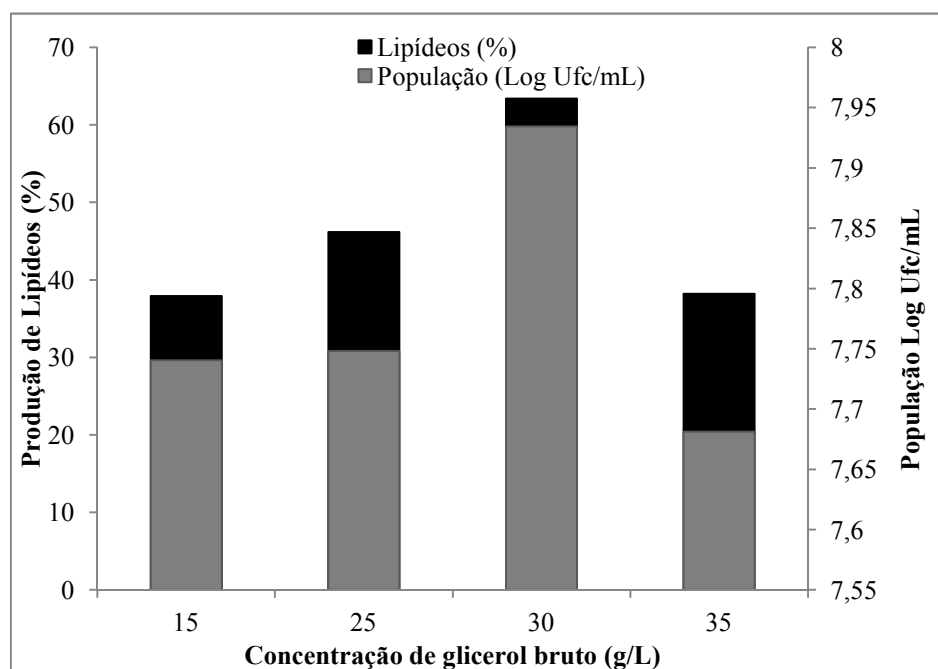


Figura 4 Produção de lipídeos nas concentrações de 15, 25, 30 e 35 g/L de glicerol bruto pela levedura *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9. 4 estão indicadas no eixo primário, relacionando-se a população da levedura *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9. 4 expressa em Log UFC/mL, no eixo secundário

A maior população da levedura *Yarrowia lipolytica* UFLA CM-Y9. 4 foi de  $8,6 \times 10^7$  cél/mL observada na concentração de 30 g/L de glicerol. Com isso pode-se relacionar o tamanho da população com as quantidades de lipídeos produzidos, uma vez que a maior produção de lipídeos foi encontrada na maior população de leveduras. Na menor população também foi encontrado menor quantidade de lipídeos.

### 3.3 Consumo de glicerol

A levedura *Yarrowia lipolytica* UFLA CM-Y9. 4 apresentou maior consumo de glicerol (5,72 g/L) onde houve maior produção de lipídeos (63,4%), ambos foram observados em meio de cultivo contendo concentração de 30 g/L de glicerol bruto (Figura 5).

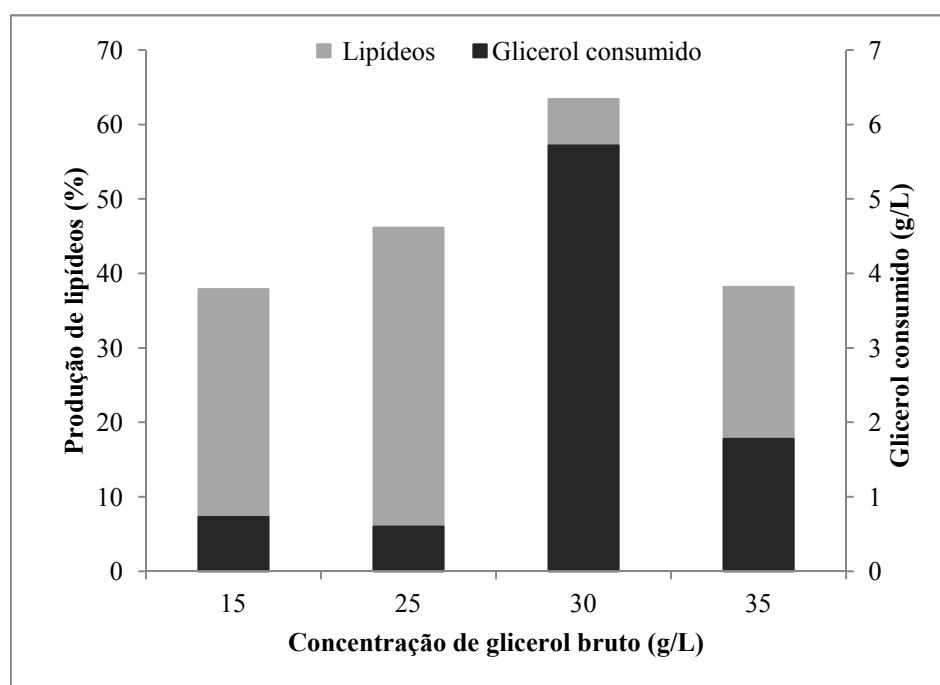


Figura 5 Produção de lipídeos por *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9. 4 nas concentrações iniciais de 15, 25, 30 e 35 g/L de glicerol bruto no meio de cultivo durante 48 horas sob agitação de 150 rpm e temperatura de  $30 \pm 2$  °C, relacionado ao glicerol consumido pela levedura nas diferentes concentrações

No meio de cultivo que continha 25 g/L de glicerol bruto foram consumidos 1,78 g/L de glicerol. Nas concentrações de glicerol bruto em que se

observou menor produção de lipídeos, 37,9 e 38,2%, houve também menor consumo de glicerol 0,73 e 0,60 respectivamente.

### 3.4 Perfil dos ácidos graxos

O perfil de ácidos graxos foi analisado e os resultados detalhados na Tabela 7.

Tabela 7 Percentual do perfil de ácidos graxos a partir dos lipídeos encontrados nas concentrações de 15, 25, 30 e 35 g/L de glicerol bruto produzido por *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9. 4

Ácidos graxos	Concentrações de glicerol bruto			
	15 g/L	25 g/L	30 g/L	35 g/L
C16: 0	6,16	24,15	26,13	18,23
C17: 0	-	5,57	-	10,42
C18: 0	4,56	28,87	24,73	29,48
C16: 1	8,04	2,65	15,67	-
C18: 1	8,64	15,92	20,92	-
C18: 2	-	-	-	-

C16: 0 (Ácido palmítico), C17:0 (Ácido heptadecanoico), C18:0 (Ácido esteárico), C16:1 (Ácido palmitoleico), C18:1 (Ácido oleico) e C18:2 (Ácido Linolênico).

A composição e a quantidade de ácidos graxos foi 60% maior quando a levedura foi cultivada em 30 g/L do que na concentração de 15 g/L, isto se deve ao fato de no teste de 30 g/L se ter encontrado maior produção de lipídeos (63,4% de lipídeos microbianos) (Tabela 7). O segundo melhor meio de cultivo foi o que continha 25 g/L de glicerol bruto em que apresentou 49,7% a mais de ácidos graxos do que a concentração de 15 g/L (Tabela 7).

Os ácidos palmítico (16:0) e esteárico (18:0) foram encontrados em proporções de 74,67 e 87,64% respectivamente, somando todas as concentrações



de glicerol bruto utilizadas. O ácido linolênico (18:2), um ácido graxo poliinsaturado, não foi encontrado em nenhuma das amostras analisadas. No cultivo em glicerol bruto, os ácidos graxos saturados apresentaram proporção de 71,28% e os monoinsaturados de 28,71%

### 3.5 Otimização na produção de ácido cítrico

As três variáveis independentes que podem influenciar a produção do ácido cítrico são temperatura de incubação, concentração de glicerol e agitação.

Tabela 8 Matriz apresentando os valores reais e os codificados com os valores experimentais e a produção de ácido cítrico e população

Ensaio	$x_1$	$x_2$	$x_3$	Ácido cítrico (g/L)	População (Ufc/mL)	Glicerol Consumido (g/L)
1	-1(28)	-1(25)	-1(130)	0,006	4,6X10 <sup>7</sup>	2,11
2	+1(32)	-1(25)	-1(130)	0,006	5,6X10 <sup>7</sup>	1,78
3	-1(28)	+1(35)	-1(130)	0	5,5X10 <sup>7</sup>	0
4	+1(32)	+1(35)	-1(130)	0	4,8X10 <sup>7</sup>	0,6
5	-1(28)	-1(25)	+1(170)	0,072	9,910 <sup>7</sup>	6,36
6	+1(32)	-1(25)	+1(170)	0,073	6,3X10 <sup>7</sup>	0
7	-1(28)	+1(35)	+1(170)	0,14	7,7X10 <sup>7</sup>	0
8	+1(32)	+1(35)	+1(170)	0,087	6,8X10 <sup>7</sup>	2,18

“Tabela 8, conclusão”

Ensaio	$x_1$	$x_2$	$x_3$	Ácido citríco (g/L)	População (Ufc/mL)	Glicerol Consumido (g/L)
9	-1,68(26,6)	0(30)	0(150)	0,053	8,3X10 <sup>7</sup>	3,45
10	+1,68(33,4)	0(30)	0(150)	0,015	4,8X10 <sup>7</sup>	5,29
11	0(30)	-1,68(21,6)	0(150)	0,059	5,5X10 <sup>7</sup>	0,73
12	0(30)	+1,68(38,4)	0(150)	0,078	6,4X10 <sup>7</sup>	4,31
13	0(30)	0(30)	-1,68(116,4)	0	4,3X10 <sup>7</sup>	0
14	0(30)	0(30)	+1,68(203,6)	0,007	8,6X10 <sup>7</sup>	5,72
15	0(30)	0(30)	0(150)	0,033	7,6X10 <sup>7</sup>	3,216
16	0(30)	0(30)	0(150)	0,031	7,6X10 <sup>7</sup>	2,985
17	0(30)	0(30)	0(150)	0,038	7,6X10 <sup>7</sup>	2,37

Por meio dos resultados obtidos apresentados na Tabela 8, foi possível determinar os coeficientes de regressão (Tabela 9). Como podemos observar os parâmetros do modelo foram significativos ( $p \leq 0,1$ ) no nível de significância de 90% de confiança com exceção da temperatura quadrática.

Tabela 9 Coeficiente de regressão para resposta Ácida cítrico

	<b>Coeficiente de Regressão</b>	<b>Erro Puro</b>	<b>t(2)</b>	<b>p - valor</b>
Média	0,033	0,0020	15,963	0,003
(1) T (L)	-0,008	0,0009	-8,697	0,012
T (Q)	0,002	0,0010	2,610	0,120
(2) G (L)	0,007	0,0009	7,652	0,016
G (Q)	0,015	0,0010	13,978	0,005
(3) A (L)	0,027	0,0009	27,913	0,001
A (Q)	-0,007	0,0010	-7,438	0,017
1L x 2L	-0,006	0,0012	-5,295	0,033
1L x 3L	-0,006	0,0012	-5,099	0,036
2L x 3L	0,011	0,0012	9,217	0,011

$$R^2 = 71,876$$

Com os parâmetros significativos foi possível elaborar o seguinte modelo com as variáveis codificadas:

$$Y = 0,0331 - 0,0084x_1 + 0,0074x_2 + 0,0150x_2^2 + 0,0272x_3 - 0,0079x_3^2 - 0,0067x_1.x_2 - 0,0065x_1.x_3 + 0,0117x_2.x_3$$

A variável dependente população não apresentou valores significativos e por isso não foi possível uma equação que possa definir este modelo. O ajuste do modelo foi confirmado pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ). Neste caso, o valor do coeficiente de determinação ( $R^2=0,7187$ ) indica que 71,87% da variabilidade na resposta pode ser explicada pelo modelo.

A Figura 6 mostra uma correlação entre os valores preditos e os experimentais da produção de ácido cítrico, em que os pontos se aglomeram em torno da linha diagonal indicando o ajuste ideal do modelo. Observou-se que dois dos pontos ficaram mais distantes da linha principal, provavelmente devido o desvio entre os valores experimentais e previsto não ter sido o menor possível.

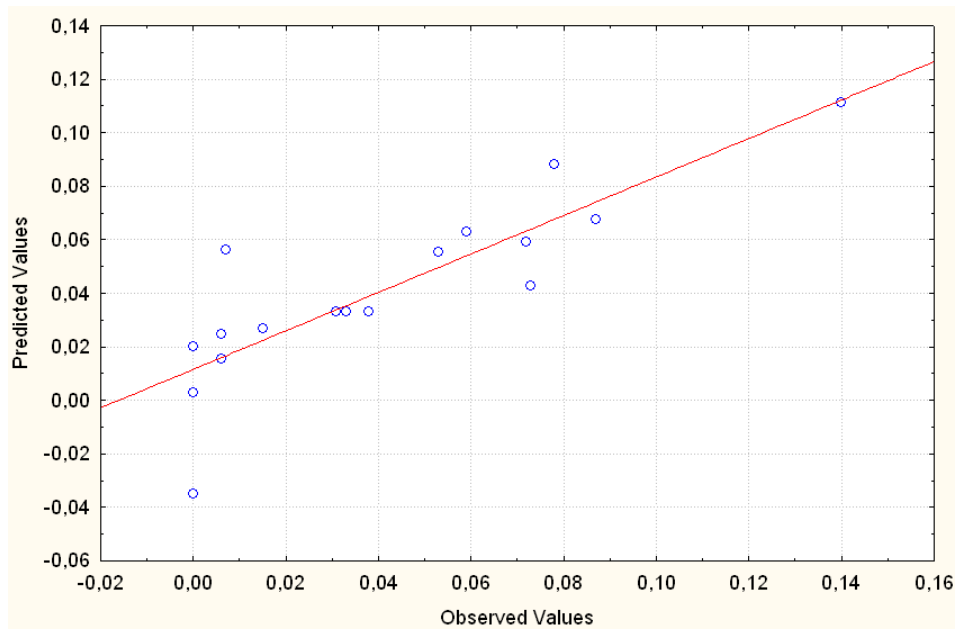


Figura 6 Valores experimentais *versus* valores estatisticamente significativos previstos pelo modelo para produção de ácido cítrico

Os efeitos das variáveis sobre a produção de ácido cítrico podem ser observados na Figura 7.

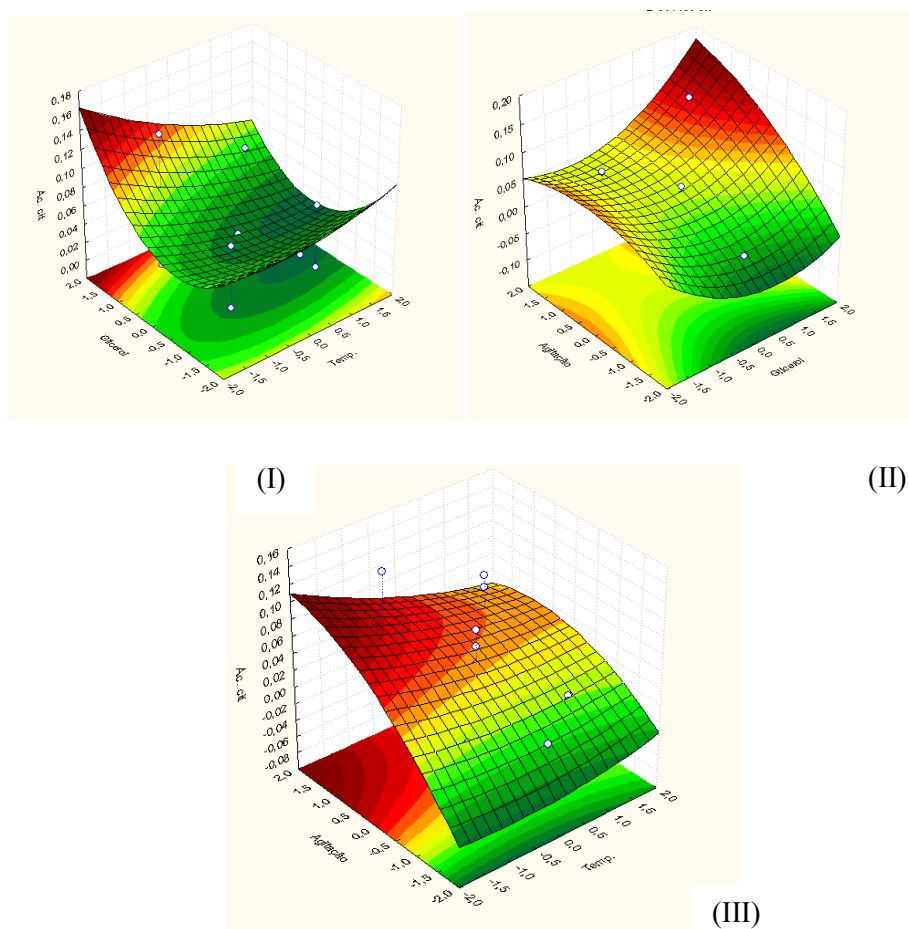


Figura 7 Gráficos de superfície de resposta da produção de ácido cítrico. (I) Produção em função da concentração de glicerol e temperatura. (II) Produção de ácido cítrico em função da agitação e concentração de glicerol e (III) Produção de ácido cítrico em função da agitação e temperatura

A produção de ácido cítrico exibiu diferentes respostas. O efeito da interação dos parâmetros está proeminente representado nos gráficos tridimensionais, que representam um número infinito de combinações das variáveis testes. O gráfico (I) mostra que a produção de ácido cítrico foi maior

quando se associou maiores concentrações de glicerol com menores valores de temperatura. No gráfico (II), a maior produção de ácido cítrico ocorreu em maiores concentrações de glicerol juntamente com maior agitação. O gráfico (III) ilustra que no maior valor de agitação e menor a temperatura maior será a produção de ácido cítrico.

A população não foi graficamente representada uma vez que os valores encontrados não podem ser relacionados à produção de ácido cítrico, já que a população foi aumentada ou diminuída independente dos valores de concentração de ácido cítrico.

Assim como a população, o consumo de glicerol também não pôde ser representado graficamente uma vez que os valores obtidos não podem ser explicados estatisticamente, já que o consumo teve grandes variações entre os ensaios. Esta falta de coerência também pode ser observada nos pontos centrais. Uma hipótese que explica as variações no consumo de glicerol pode ser a produção de glicerol pela levedura, neste caso a levedura também pode ter utilizado o glicerol bruto como fonte de carbono.

Na realização da validação dos resultados, o modelo foi testado em meio ideal, em frascos submetidos à agitação de 184 rpm com temperatura de 30 °C, a concentração de glicerol bruto utilizada foi de 38,4 g/L. A tabela 10 resume os resultados com o meio ideal e o meio inicial.

Tabela 10 Resultados da produção de ácido cítrico no meio inicial\* e ideal\*\*

	Ácido cítrico (g/L)	População (cél/mL)
<b>Meio inicial</b>	0,14	$7,7 \times 10^7$
<b>Meio ideal</b>	0,153	$1,13 \times 10^8$

Nota: Cultivo em frascos com pH inicial igual a 6,0 e tempo de incubação de 48 horas.

\*Condições do meio inicial: 35 g/L de glicerol bruto, 28 °C e agitação de 170 rpm.

\*\*Condições do meio ideal: 38,4 g/L de glicerol bruto, 30 °C e agitação de 184 rpm

A partir de experimentos da RSM e a validação a concentração de glicerol do meio ideal é composto por valores maiores do que 38,4 g/L. Em comparação com o meio inicial, o meio ótimo aumentou 1,09 vezes a produção de ácido cítrico e 1,46 vezes a população da levedura *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9. 4.

#### 4 DISCUSSÃO

Pelos resultados obtidos neste trabalho, o glicerol tem potencial como substrato adequado para a produção de produtos metabólicos, como lipídeos e ácidos orgânicos pela levedura *Yarrowia lipolytica* UFLA CM-Y9. 4. Os mecanismos bioquímicos do metabolismo de açúcares e sistemas que conduzem à síntese de lipídeos e ácidos cítricos pela levedura *Y. lipolytica* cultivadas em glicerol ainda não são totalmente conhecidos e necessitam de maiores esclarecimentos (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2009).

A seleção de leveduras para o crescimento em glicerol bruto e a otimização da produção de biomassa foi realizada utilizando a metodologia de superfície de resposta e observou-se que o rendimento da produção de biomassa por algumas espécies oleaginosas pode ser aumentado significativamente pela otimização da concentração do glicerol bruto e temperatura de crescimento. Leveduras são capazes de converter glicerol bruto em produtos de valores agregados que representam valorização para os subprodutos da indústria do biodiesel (TACCARI et al., 2012). *Yarrowia lipolytica* UFLA 9.4 mesmo tendo apresentado crescimento 24,5% menor que *Lidnera saturnus* UFLA CES-Y677 é a espécie relatada na literatura por sua habilidade em crescer em glicerol bruto, além da sua capacidade em produzir lipídeos e ácido orgânicos (MAKRI; FAKAS; AGGELIS, 2010).

A levedura *Cryptococcus curvatus* apresentou crescimento celular restrito quando as concentrações de glicerol foram superiores a 64 g/L (MEESTERS; HUIJBERTS; EGGINK, 1996). Os resultados da literatura diferem dos relatados neste trabalho, pois a levedura *Cryptococcus curvatus* NCYC476 testada apresentou crescimento celular até 96 horas na concentração de 300 g/L de glicerol bruto, o mesmo ocorreu com a levedura *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9. 4, *Rhodotorula glutinis* NCYC 2439 se manteve viável em



concentrações de 300 g/L até 120 horas. A espécie *Lidnera saturnus* UFLACES-Y677 suportou a concentração de 300 g/L por apenas 48 horas. Com estas comparações da literatura e os dados encontrados podemos inferir que o crescimento de espécies de leveduras em glicerol depende das condições de cultivo, tipo de glicerol e parece ser diferente entre cepas e não somente entre espécies.

Chi et al. (2007), ao estudarem glicerol bruto e puro no cultivo da alga *Schizochytrium limacinum* obtiveram maior crescimento celular em glicerol bruto. Este dado é compatível com este estudo, uma vez que as leveduras testadas, de um modo geral, apresentaram um maior crescimento em glicerol bruto. O glicerol bruto utilizado neste trabalho é composto em g/L por: 2 716 de metanol, 3, 171 de etanol, 0,21 sacarose, 7,63 de glicose e 729,67 de glicerol.

Verificou-se neste trabalho que o emprego do glicerol bruto proveniente da síntese de biodiesel apresentou aumento de 16,12% no crescimento das leveduras do que quando comparado com o glicerol comercial. Este resultado pode estar relacionado principalmente com as impurezas presentes no coproduto do biodiesel tais como elementos nutricionais que são utilizados por microrganismos durante o processo fermentativo como fósforo, enxofre, magnésio, cálcio, nitrogênio, sódio e ácidos graxos livres (THOMPSON; HE, 2006). Em contrapartida, nos testes em cultivo submerso em que foram utilizadas concentrações muito altas de glicerol bruto (200 e 300 g/L), o crescimento pode ter sido inibido pelas impurezas presentes, que em quantidades maiores pode ter influenciado negativamente na viabilidade celular.

Os rendimentos mais elevados de biomassa que são obtidos a partir do glicerol bruto são comparáveis aos da glicose, o que sugere que o glicerol bruto pode ser utilizado para a produção de biomassa por leveduras. Este resíduo também provou ser interessante para conversão em produtos de valores

agregados, sendo uma alternativa viável para as indústrias (TACCARI et al., 2012).

Rupcic, Blagovic e Maric (1996) avaliaram a produção de lipídeos pela espécie *Candida lipolytica* (atualmente conhecida como *Yarrowia lipolytica*) utilizando metanol como fonte de carbono. Eles acrescentaram 1% de metanol no meio de cultura e observaram que a levedura sintetizou 4,9% de lipídeos. O glicerol utilizado no presente trabalho era composto por apenas 2,716 g/L (0,27%) de metanol. Esta concentração pode não ter tido influência no crescimento e nem na produção de lipídeos por ser uma concentração baixa.

A composição de ácidos graxos encontrada neste estudo foi semelhante à encontrada por Chatzifragkou et al. (2011) utilizando o glicerol bruto para conversão em lipídeos microbianos. Em todas as concentrações testadas, os principais ácidos graxos celulares produzidos por leveduras foram os ácidos palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), esteárico (C18:0), oleico (C18:1) e linolênico (18:2), enquanto os ácidos graxos de cadeia média e cadeia longa foram produzidos em menores quantidades. O único ácido graxo que não foi encontrado foi o ácido linolênico, e os ácidos graxos que se destacaram foram o palmítico, esteárico e oleico. Em outro trabalho em que foi utilizado o melão de cana para a produção de lipídeos por *Yarrowia lipolytica*, os ácidos graxos encontrados em maiores quantidades foram o ácido esteárico e o palmítico (KARATAY; DONMEZ, 2010). Estes dados são de grande relevância, pois além da produção de lipídeos por leveduras ser dependente da cepa utilizada, também o tipo de substrato de cultivo influenciará na quantidade e qualidade dos lipídeos produzidos.

Altos rendimentos na produção de lipídeos foram obtidos por El Bialy, Gomaa e Azab (2011), depois de seis dias de incubação e em meio contendo 20 g/L de glicose. Os perfis de ácidos graxos também podem variar de acordo com a concentração do substrato. A concentração de ácidos graxos difere

significativamente nas diferentes fases de crescimento e em diferentes concentrações de glicerol (ANDRE et al., 2009). Esta afirmação pode ser confirmada com as concentrações de ácidos graxos encontradas neste estudo, uma vez que nas concentrações de 25 e 30 g/L de glicerol bruto foram encontrados 77,16 e 87,45% respectivamente dos ácidos graxos analisados.

Resíduos agroindustriais são frequentemente utilizados na produção de ácido cítrico, entre eles estão o melão, resíduos de cenoura, batata e banana (ANGUMEENAL; VENKAPPAYYA, 2013). Makri, Fakas e Aggelis (2010) e Papanikolaou et al. (2002) utilizaram glicerol para a produção de ácido cítrico e observaram que a maior produção de ácido cítrico foi obtida a partir do glicerol bruto, cerca de 35 g/L. A produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica* em meio contendo glicerol necessita de condições específicas para conversão do glicerol em ácido cítrico, entre elas está a taxa de aeração de 0,24-0,36. A concentração de oxigênio dissolvido deve ser de 30 a 80% de saturação e o tempo de fermentação que pode variar entre 7 a 15 dias (RYWINSKA et al., 2013).

Durante a fermentação, a formação do ácido cítrico ocorreu após a fase estacionária de crescimento, quando o nitrogênio extracelular se tornou fator limitante para o crescimento. O glicerol bruto é um importante aliado para produção de ácido cítrico. O uso do substrato em altas concentrações, como 80 e 120 g/L resulta em um significativo aumento da produção de ácido cítrico (33-35 g/L) (PAPANIKOLAOU et al., 2002).

A levedura *Y. lipolytica* é uma das leveduras “não-convencionais” mais estudadas e muitas tecnologias incluindo diferentes sistemas de cultivos têm sido aplicadas para a produção de lipídeos utilizando vários subprodutos e resíduos agroindustriais além de produzir ácido cítrico devido aos bons rendimentos e produtividade (RYWINSKA et al., 2013).

No presente estudo foram encontradas concentrações relativamente baixas de ácido cítrico atribuído ao tempo de fermentação e a taxa de agitação.

Concluindo que o glicerol é um substrato metabolicamente adequado para produzir ácido cítrico pela levedura *Yarrowia lipolytica* UFLA CM-Y9. 4

## 5 CONCLUSÃO

Após testes realizados em meio de cultivo contendo glicerol puro e bruto, observou-se que as leveduras *Lidnera saturnus* UFLA CES-Y677, *Yarrowia lipolytica* UFLA CM-Y9. 4, *Rhodotorula glutinis* NCYC 2439 e *Cryptococcus curvatus* NCYC 476 apresentaram melhor crescimento em meio contendo glicerol bruto.

Em testes posteriores a levedura *Yarrowia lipolytica* UFLA CM-Y 9.4 destacou-se por consumir altas quantidades de glicerol bruto e foi então selecionada para testes para produção de lipídeos e ácido cítrico.

Com relação ao teste para produção de lipídeos, na concentração de 30 g/L de glicerol bruto obtivemos a melhor produção de lipídeos, cerca de 63,4%, sendo este um excelente resultado e que merece destaque para futuros experimentos, como a produção de lipídeos em escala maior para aplicação na indústria de biodiesel.

A produção de ácido cítrico foi otimizada, sendo as melhores condições atribuídas a 38,4 g/L de glicerol bruto, agitação de 184 rpm e temperatura de 30 °C, no entanto, baixas concentrações foram encontradas quando comparadas a literatura. Este processo ainda deve ser ajustado para que se possam obter valores mais altos.

A levedura *Yarrowia lipolytica* UFLA CM-Y9. 4 é capaz de converter com sucesso glicerol bruto em lipídeos microbianos bem como em ácido cítrico. Devido ao contínuo aumento da produção de biodiesel, o glicerol bruto pode ser viável para a produção de lipídeos e ácido cítrico. E os lipídeos produzidos podem ser utilizados novamente para a produção de biodiesel

## REFERÊNCIAS

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

ANGUMEENAL, A. R.; VENKAPPAYYA, D. Na overview of citric acid production. **Food Science and Technology**, Oxford, v. 50, n. 2, p. 367-370, Mar. 2013.

BEOPOULOS, A. et al. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. **Progress in Lipid Research**, Bethesda, v. 48, n. 6, p. 375-387, Nov. 2009.

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

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.

CHEN, C. Y. et al. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 102, n. 1, p. 71-81, Jan. 2011.

CHI, Z. et al. A laboratory study of producing docosaheptaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. **Process Biochemistry**, London, v. 42, n. 11, p. 1537-1545, Nov. 2007.

EL BIALY, H.; GOMAA, O. M.; AZAB, K. S. Conversion of oil waste to valuable fatty acids using Oleaginous yeast. **World Journal of Microbiology & Biotechnological**, Oxford, v. 27, n. 12, p. 2791-2798, Apr. 2011.

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

GUARIEIRO, L. L. N.; VASCONCELLOS, P. C.; SOLCI, M. C. Poluentes atmosféricos provenientes da queima de combustíveis fósseis e biocombustíveis: uma breve revisão. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 3, n. 5, p. 434-445, nov. 2011.

KARATAY, S. E.; DONMEZ, G. Improving the lipid accumulation properties of the yeast cells for biodiesel production using molasses. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 20, p. 7988-7990, Oct. 2010.

KIMURA, K.; YAMAOKA, M.; KAMISAKA, Y. Rapid estimation of lipids in oleaginous fungi and yeast using Nile red fluorescence. **Journal of Microbiology Methods**, Essex, v. 56, n. 3, p. 331-338, Mar. 2004.

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.

MEESTERS, P.A. E. P.; HUIJBERTS, G. N. M.; EGGINK, G. High cell density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 45, n. 5, p. 575-579, Jan. 1996.

METCALFE, L. D.; SCHIMITZ, A. A.; PELKA, J. R. Rapid preparation of fatty acids esters from lipid for gas chromatography. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 38, p. 514, 1966.

PAPANIKOLAU, S. et al. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. **Applied Microbiology**, Oxford, v. 92, n. 4, p. 737-744, Apr. 2002.

PAPANIKOLAU, 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.

RIVALDI, J. D. et al. Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção do biodiesel. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 37, p. 44-51, mar. 2008.

RUPCIC, J.; BLAGOVIC, B.; MARIC, V. Celllipidsof the *Candida lipolytica* yeast grown on methanol. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 755, p. 75-80, June 1996.

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.

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.

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, Dec. 2006.